

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των επιπτώσεων επαγωγής των πρωτεοστατικών μηχανισμών στη γήρανση και σε ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες

**ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ**

Παναγιωτίδου Ελένη

ΑΘΗΝΑ 2024

**Μελέτη των επιπτώσεων επαγωγής των πρωτεοστατικών
μηχανισμών στη γήρανση και σε ηλικιοεξαρτώμενες
ασθένειες**

**Effects of proteostasis modulation in aging and age-related
diseases**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Νίκη Χονδρογιάννη, Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (επιβλέπουσα)

Δημήτριος Κλέτσας, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος"

Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Νίκη Χονδρογιάννη, Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (επιβλέπουσα)

Δημήτριος Κλέτσας, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος"

Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Μπαλατσός, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γεωργία Χαχάμη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Άννα Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Δρ. Νίκης Χονδρογιάννη.

Πριν αναφερθώ σε πρόσωπα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) για την απομονή υποτροφίας για την υλοποίηση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τη Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη για την εμπιστοσύνη της και την τιμή που μου έκανε να ενταχθώ στην επιστημονική της ομάδα. Την ευχαριστώ θερμά για τις γνώσεις που αποκόμισα δίπλα της, τις συμβουλές και την πολύτιμη καθοδήγησή της κατά την εκπόνηση και τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα και τον Δρ. Δημήτριο Κλέτσα για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου και που ήταν πάντα πρόθυμοι να προσφέρουν την καθοδήγησή τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον διευθυντή του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Δρ Αλέξανδρο Ν. Πίντζα που με δέχθηκε στο ινστιτούτο και με μεγάλη προθυμία ανταποκρίθηκε οποτεδήποτε τον χρειάστηκα. Μαζί, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του ινστιτούτου που είχα τη χαρά να συνεργαστώ κατά την εκπόνηση της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό, τον αναπληρωτή καθηγητή Δημήτριο Στραβοπόδη, την επίκουρο καθηγήτρια Γεωργία Χαχάμη και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Άννα Μαρία Ψαρρά που δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην επταμελή επιτροπή και να αξιολογήσουν τη διατριβή μου.

Ένα εγκάρδιο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην Δρ. Άννα Γιοράν για τις γνώσεις που μοιράστηκε με χαρά μαζί μου. Την ευχαριστώ για τις αμέτρητες επιστημονικές συζητήσεις μας αλλά και την ηθική και πνευματική στήριξή της κατά την εκπόνηση της διατριβής. Έκανε κάθε δυσκολία να μοιάζει ευχάριστη εμπειρία.

Ευχαριστώ όλα τα παλαιότερα και νεότερα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης, Νικόλ Παπαευγενίου, Μαίρη Βασιλοπούλου, Φωτεινή Ακτύπη, Παρασκευή Κούκα, Δήμητρα Ράντη, Αθηνά Σουλιώτη, Απόστολο Πέτσα, Γιώργο Παϊκόπουλο, Σοφία Λαγουμτζή και Μαριάννα Καπετάνου για τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός του εργαστηρίου. Καθώς και την Σοφία Αθανασοπούλου για την ενθάρρυνση, την ηθική της στήριξη και τις πολύπλευρες γνώσεις της που μοιράστηκε μαζί μου.

Ευχαριστώ όλους τους φίλους μου που έχω την τύχη και τη χαρά να τους έχω πάντα δίπλα μου να με στηρίζουν σε κάθε μου στόχο.

Τέλος, δεν θα μπορούσα φυσικά να μην πω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στον μεγαλύτερο υποστηρικτή μου, την οικογένεια μου, για την αδιάκοπη και αληθινή συμπαράστασή τους! Χωρίς αυτούς δεν θα τα είχα καταφέρει!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	9
Abstract.....	11
A. Εισαγωγή.....	13
A.1 Η γήρανση	14
A.1.1. Θεωρίες της γήρανσης.....	14
A.1.1.1. Θεωρίες προγραμματισμένης γήρανσης (γενετικές θεωρίες)	14
A.1.1.2. Θεωρίες φθοράς (στοχαστικές θεωρίες)	15
A.1.1.3. Συνδυαστικές θεωρίες	16
A.1.2. Τα χαρακτηριστικά (hallmarks) της γήρανσης.....	16
A.1.2.1. Πρωτογενή χαρακτηριστικά	17
A.1.2.2. Ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά	19
A.1.2.3. Ολιστικά χαρακτηριστικά	20
A.1.3. Ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις: η νόσος του Alzheimer (AD)	21
A.2. Το δίκτυο της πρωτεόστασης	24
A.2.1. Πρωτεϊνοσύνθεση	25
A.2.2. Αναδίπλωση	25
A.2.3. Αποικοδόμηση	27
A.2.4. Το πρωτεάσωμα	29
A.2.4.1. Το 20S πρωτεάσωμα.....	29
Δόμηση (assembly)	30
Εντοπισμός	31
A.2.4.2. Το 26S πρωτεάσωμα.....	31
A.2.4.4. Άλλες μορφές του πρωτεασώματος	32
Ανοσοπρωτεάσωμα.....	32
Υβριδικά πρωτεασώματα	33
Το θυμοπρωτεάσωμα	33
A.2.4.5. Η ρύθμιση του πρωτεασώματος	33
Γενετικοί χειρισμοί.....	33
Τροποποιήσεις της διαμόρφωσης της δομής του 20S.....	35
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	35
A.2.4.6. Το πρωτεάσωμα στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες πρωτεϊνοπάθειες.....	36
Γήρανση	36

Γ. Αποτελέσματα.....	71
Γ.1 Ιστοειδική ρύθμιση του πρωτεασώματος στον <i>C. elegans</i> και η επίδρασή της στη γήρανση και την AD.....	72
Γ.1.1 Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> στους νευρώνες, στο έντερο ή στους μυς ενισχύει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στους μυς – αυτόνομη/μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση	72
Γ.1.2 Η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> καθολικά ή στους μυς μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στο έντερο.....	78
Γ.1.3 Επίδραση της ιστοειδικής υπερέκφρασης του πρωτεασώματος στη γήρανση	80
Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> επηρεάζει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του οργανισμού, η διατήρηση των οποίων έχει συσχετιστεί με αυξημένη ευζωία.....	80
Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> επηρεάζει το προσδόκιμο ζωής του οργανισμού	83
Γ.1.4 Μη αυτόνομη και αυτόνομη κυτταρική προστασία έναντι του πρωτεοτοξικού στρες στα στελέχη με ιστοειδική υπερέκφραση του <i>pbs-5</i> γονιδίου	84
Η ιστοειδική υπερέκφραση του <i>pbs-5</i> γονιδίου στους μυς καθυστερεί την εμφάνιση φαινοτύπου παράλυσης που σχετίζεται με τη συσσώρευση του ανθρώπινου Αβ πεπτιδίου στους μυς – αυτόνομη κυτταρική δράση	85
Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> στους νευρώνες καθυστερεί τον επαγόμενο από το ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο εκφυλισμό των γλουταμινεργικών νευρώνων – αυτόνομη κυτταρική δράση	86
Η ιστοειδική υπερέκφραση του <i>pbs-5</i> γονιδίου στους νευρώνες ή στο έντερο καθυστερεί την εμφάνιση φαινοτύπου που σχετίζεται με τη συσσώρευση του ανθρώπινου Αβ ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς -μη αυτόνομη κυτταρική δράση	88
Γ.1.5 Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> δεν ενισχύει την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες.....	90
Γ.2 Διαλεύκανση του μηχανισμού της μη αυτόνομης πρωτεασωμικής ρύθμισης που παρατηρείται μεταξύ νευρικού-μυϊκού ιστού.....	92
Γ.2.1 Η μη αυτόνομη κυτταρική δράση στους μυς των στελεχών με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου <i>pbs-5</i> διαμεσολαβείται από τα SCVs	92
Γ.2.2 Το γλουταμινικό οξύ αποκαθιστά τη μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στους μυς των <i>pbs-5</i> -νευρώνων στελεχών που στερούνται των SCVs.....	97
Δ. Συζήτηση	107
Βιβλιογραφία	116
Παράρτημα	132

Δημοσιεύσεις.....	132
-------------------	-----

Περίληψη

Οι οργανισμοί κατά τη διάρκεια της ζωής τους εκτίθενται σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες. Τα κύτταρα προκειμένου να διατηρήσουν την ακεραιότητα του πρωτεώματός τους (του συνόλου των πρωτεϊνών), τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες, έχουν αναπτύξει ένα εξαιρετικά διατηρημένο και σύνθετο δίκτυο, γνωστό ως το δίκτυο της πρωτεόστασης (ΔΠ). Οι μηχανισμοί του ΔΠ ελέγχουν την ποιότητα των πρωτεϊνών κατά τη σύνθεση, αναδίπλωση και αποικοδόμησή τους. Η τελευταία επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του συστήματος ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS) ή μέσω του μηχανισμού αυτοφαγίας-λυσosώματος (autophagy-lysosome pathway, ALP). Δεδομένου ότι οι ιστοί δεν επηρεάζονται εξίσου από τους περιβαλλοντικούς και τους ενδογενείς στρεσογόνους παράγοντες, η ιστική επικοινωνία του ΔΠ υπό αντίξοες συνθήκες μέσω μη αυτόνομων κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης (δηλαδή μονοπατιών που δρουν σε κύτταρα απομακρυσμένων ιστών και όχι στα κύτταρα του ιστού που αρχικά παράγει το σήμα), είναι κρίσιμη για την ακεραιότητα του πρωτεώματος σε επίπεδο οργανισμού. Τα τελευταία χρόνια, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών διερευνά τη ρύθμιση των πρωτεοστατικών μηχανισμών σε μη αυτόνομο κυτταρικό επίπεδο. Λαμβάνοντας υπόψη πως η λειτουργία του ΔΠ φθίνει με την εξέλιξη της γήρανσης, η διαλεύκανση των μηχανισμών της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης του ΔΠ μπορεί να προσφέρει νέες προσεγγίσεις στη ρύθμιση των πρωτεοστατικών μηχανισμών, με στόχο την καθυστέρηση των επιπτώσεων της γήρανσης και των ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων.

Το πρωτεάσωμα αποτελεί έναν σημαντικό αντιγηραντικό στόχο, καθώς αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως αύξηση της ενεργότητάς του έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής (lifespan) τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε πολυκύτταρους οργανισμούς όπως ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) και η μύγα *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). Επιπλέον, σημαντικός δείχνει να είναι ο ρόλος του πρωτεασώματος και σε ηλικιοεξαρτώμενες παθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος του Alzheimer (AD), μέσω της παρεμπόδισης της δημιουργίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που χαρακτηρίζουν τις συγκεκριμένες ασθένειες. Ωστόσο, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η αύξηση της ενεργότητάς του επιδρά θετικά στο προσδόκιμο ζωής δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Επιπλέον, παρά τον εξαιρετικά σημαντικό ρόλο του πρωτεασώματος στο ΔΠ, ελάχιστες μελέτες μέχρι στιγμής αναφέρονται στην πιθανή μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμισή του.

Το βασικό σύμπλοκο του πρωτεασώματος ονομάζεται «20S πυρήνας» και αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους επτά διαφορετικών α (εξωτερικοί δακτύλιοι) και β (εσωτερικοί δακτύλιοι) υπομονάδων. Οι υπομονάδες $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ αποτελούν τα καταλυτικά κέντρα του συμπλόκου. Σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας, η υπερέκφραση της $\beta 5$ υπομονάδας του πρωτεασώματος σε όλους τους ιστούς του *C. elegans* (γονίδιο *pbs-5*) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος και οδηγεί σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής και σε ανθεκτικότητα έναντι οξειδωτικού και πρωτεοτοξικού στρες.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την ενδεχόμενη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος, δημιουργήσαμε διαγονιδιακά στελέχη *C. elegans* τα οποία υπερεκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5* στον νευρικό ιστό (*pbs-5*-νευρώνες),

στο έντερο (*pbs-5*-έντερο) και στους μυς (*pbs-5*-μυς) του ζώου και μελετήσαμε αρχικά την επίδραση αυτής της έκφρασης στην ενεργότητα του πρωτεασώματος σε άλλους ιστούς. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η επίδραση της ρύθμισης αυτής στο προσδόκιμο ζωής και στην απόκριση και ανθεκτικότητα σε οξειδωτικό και πρωτεοτοξικό στρες.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* ιστοειδικά στους νευρώνες ή στο έντερο του *C. elegans* οδηγεί σε ενίσχυση της πρωτεασωματικής ενεργότητας στους μυς του ζώου, υποδηλώνοντας την παρουσία μη αυτόνομου κυτταρικού μηχανισμού ρύθμισης του πρωτεασώματος. Επιπλέον, στα συγκεκριμένα στελέχη, *pbs-5*-νευρώνες και *pbs-5*-έντερο, παρατηρείται μη αυτόνομη κυτταρική προστατευτική δράση έναντι της πρωτεοτοξικότητας του ανθρώπινου Αβ πεπτιδίου (η συσσώρευση του οποίου αποτελεί χαρακτηριστικό της AD) που εκφράζεται στους μυς του σκώληκα. Η ενίσχυση της πρωτεασωματικής ενεργότητας στους μυς και η προστασία έναντι της πρωτεοτοξικότητας του Αβ πεπτιδίου παρατηρούνται και σε αυτόνομο επίπεδο όπως αποκαλύφθηκε μέσω της υπερέκφρασης του γονιδίου *pbs-5* στον ίδιο ιστό (μυς). Ανάλογη αυτόνομη κυτταρική δράση έναντι του πρωτεοτοξικού στρες παρατηρήθηκε και στα στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* και το ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο στους νευρώνες.

Όσον αφορά στο προσδόκιμο ζωής, αποκαλύψαμε πως η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* μόνο στο έντερο ή μόνο στους μυς δεν αρκεί για να ενισχύσει τη μακροβιότητα του ζώου. Αντίθετα, η υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου στο νευρικό ιστό του *C. elegans* φαίνεται να διατηρεί σε καλύτερα επίπεδα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την ευζωία του ζώου (healthspan) και οδηγεί σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής του. Ωστόσο, η ενίσχυση του προσδόκιμου ζωής δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής προστασίας, καθώς δεν παρατηρήθηκε προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες.

Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα στοχεύσαμε στη διαλεύκανση του τρόπου επικοινωνίας μεταξύ του νευρικού και του μυϊκού ιστού όσον αφορά στη ρύθμιση του πρωτεασώματος. Αποκαλύψαμε πως κομβικό ρόλο σε αυτή την επικοινωνία έχουν τα μικρά διαυγή κυστίδια (small clear vesicles - SCVs), τα οποία εντοπίζονται στον προσυναπτικό νευρώνα και το περιεχόμενό τους αποτελείται από νευροδιαβιβαστές. Παράλληλα, ταυτοποιήσαμε το γλουταμινικό οξύ ως έναν από τους νευροδιαβιβαστές που συμβάλλουν σε αυτήν τη ρύθμιση.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν την υπόθεση της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης της λειτουργίας του πρωτεασώματος. Η επίδραση της ιστοειδικής έκφρασης του πρωτεασώματος σε απομακρυσμένους ιστούς μπορεί να αποτελέσει σημαντική γνώση για τον σχεδιασμό παρεμβάσεων που στοχεύουν στην ιστοειδική ενίσχυση ή αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος.

Abstract

Organisms are exposed to various stress conditions throughout their lifespan. To maintain their proteome integrity, the cells have developed a highly conserved network, namely the Proteostasis Network (PN). The PN mechanisms are responsible for the protein quality control, under normal and stress conditions, from synthesis to folding and degradation. The latter is mediated mainly through the ubiquitin-proteasome system (UPS) and the autophagy lysosomal pathway (ALP). Deregulation of the PN is considered as one of the hallmarks of aging. Impaired proteostasis balance upon aging leads to the accumulation of misfolded proteins and aggregates, contributing to the onset and progression of proteinopathies. Recent studies suggest that the PN regulation is subjected to both cell-autonomous and cell non-autonomous levels. Given that tissues are not affected equally by endogenous and external stress factors, tissue communication under adverse conditions through cell non-autonomous signaling pathways is crucial for the quality of the proteome. The elucidation of the mechanisms underlying the cell non-autonomous regulation of the PN, may provide new approaches to the regulation of proteostasis, including the potential for improvement of proteostasis by targeting only a small number of cells to alleviate the effects of aging and age-related diseases.

The proteasome is considered as a potent antiaging target since various studies support that its increased activity results in enhanced lifespan in cells and multicellular organisms such as the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and the fly *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). Moreover, the role of the proteasome appears to be important in age-related pathological conditions such as proteinopathies, including Alzheimer's disease (AD), by preventing the formation of protein aggregates, a phenomenon that characterizes these disorders. However, the mechanisms through which the proteasome activation affects lifespan and aggregation-related pathologies have not been fully elucidated. More importantly, despite the highly important role of the proteasome in the PN, its potential cell non-autonomous regulation has never been studied.

The main proteasome complex is the "20S core", composed of four rings of seven different α (α 1-7, outer rings) and seven different β (β 1-7, inner rings) subunits. The two inner rings exert proteolysis through β 1 (caspase-like/ C-L), β 2 (trypsin-like/ T-L) and β 5 (chymotrypsin-like/ CT-L) subunits. We have previously revealed that overexpression of the β 5 proteasome subunit in all tissues of *C. elegans* is sufficient to enhance the proteasome activity which in turn leads to lifespan extension and confers resistance to oxidative and proteotoxic stress.

To investigate the potent cell non-autonomous regulation of the proteasome, we generated transgenic *C. elegans* strains that overexpress the *pbs-5* (β 5 ortholog in the nematode) gene in a tissue specific manner in the neurons (*pbs-5*-neurons), the intestine (*pbs-5*-intestine) and the muscles (*pbs-5*-muscles), and we studied the effect of this expression on proteasome activity in distal tissues. Furthermore, we investigated the effects of tissue-specific *pbs-5* overexpression on lifespan and resistance to oxidative and proteotoxic stress.

Our results reveal that the activation of the proteasome in a single tissue can affect proteostasis in distal tissues in the nematode. More specifically, tissue-specific *pbs-5* overexpression in the neurons or in the intestine can enhance the proteasome activity in the muscles, revealing for the first time the cell non-autonomous proteasome regulation. Furthermore, we show that this cell non-autonomous regulation is sufficient to prevent the proteotoxic effects of the amyloid- β (A β) peptide (a peptide strongly correlated with AD) in the muscles of nematode models for AD. We also observed that muscle-specific *pbs-5* overexpression can cell-autonomously enhance the proteasome activity and resistance to the A β -mediated proteotoxicity in the same tissue (muscles). Likewise, cell-autonomous resistance to A β proteotoxicity is also observed in strains that overexpress the *pbs-5* gene and the A β peptide in neurons.

In respect to the effects of tissue-specific *pbs-5* overexpression on lifespan, we observed that the overexpression of the *pbs-5* gene only in the intestine or in the muscles of *C. elegans* is not sufficient to enhance the lifespan of the nematode. In contrast, *pbs-5* overexpression in the neurons of *C. elegans*, maintains the levels of phenotypic characteristics related to the healthspan of the animal and leads to lifespan extension. Nevertheless, the enhancement of life expectancy does not seem to be related to enhanced antioxidant protection, since no resistance to oxidative stress was observed.

Finally, we further investigated the mechanisms underlying the cell non-autonomous regulation of the proteasome between neurons and muscles. We provide evidence that this interconnection occurs via a specific type of synaptic vesicles, the small clear vesicles (SCVs) and we identified glutamate as at least one of the responsible neurotransmitters.

Our results confirm the hypothesis of cell non-autonomous regulation of the proteasome. The effects of tissue-specific proteasome overexpression in distal tissues, may provide important knowledge for the design of interventions that target tissue-specific manipulation of proteasome activity.

Α. Εισαγωγή

A.1 Η γήρανση

Η γήρανση αποτελεί ένα θέμα που έχει απασχολήσει στην ιστορία επιστήμονες και φιλοσόφους. Η ευρεία έννοια της γήρανσης αναφέρεται στις αλλαγές που συμβαίνουν σε όλα τα επίπεδα ζωής (μοριακό, κυτταρικό, ιστικό, οργανισμικό) κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στη γήρανση δεν είναι απαραίτητα επιβλαβείς, όπως για παράδειγμα οι ρυτίδες και το γκριζάρισμα των μαλλιών. Ωστόσο, η παρακμή των φυσιολογικών λειτουργιών κατά τη γήρανση οδηγεί σε μείωση της γονιμότητας, σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών (παθολογική γήρανση) και τελικά στον θάνατο. Η διαλεύκανση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη γήρανση φαίνεται απροσδόκητα περίπλοκη και είναι δύσκολο να αποδοθεί σε μία ενιαία, συνολική θεωρία. Έρευνες συνεχώς αποκαλύπτουν την εμπλοκή ποικίλων διεργασιών που συνδυάζονται και αλληλεπιδρούν σε πολλαπλά επίπεδα και λαμβάνουν χώρα τόσο σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο ιστών και οργάνων.

Τα κύρια ερωτήματα που θέτονται γύρω από τη γήρανση είναι «γιατί γερνάμε;» και «πώς γερνάμε;». Οι θεωρίες που επιχειρούν να απαντήσουν στο ερώτημα «γιατί γερνάμε» είναι πολυάριθμες και έχουν αποτελέσει διαχρονικά αντικείμενο αντιπαράθεσων, καθιστώντας σχεδόν αδύνατο μέχρι σήμερα να δοθεί μια πλήρης επισκόπηση των θεωριών γήρανσης που έχουν διατυπωθεί. Οι περισσότερες θεωρίες ωστόσο, μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες: τις θεωρίες προγραμματισμένης γήρανσης ή γενετικές θεωρίες, τις θεωρίες φθοράς ή στοχαστικές θεωρίες, καθώς και τις συνδυασμένες θεωρίες οι οποίες περιλαμβάνουν στοιχεία και των δύο ομάδων (Jin, 2010; Goldsmith, 2014). Αν και παραμένει ανοιχτή η διαμάχη στην απάντηση του ερωτήματος «γιατί γερνάμε;», προηγμένες αναλυτικές μελέτες παρατήρησης και εντοπισμού των αλλαγών που σχετίζονται με την ηλικία, έχουν συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό στην περιγραφή των βασικών χαρακτηριστικών της γήρανσης, στοχεύοντας να απαντήσουν στο ερώτημα «πώς γερνάμε;». Τα βασικά χαρακτηριστικά της γήρανσης (hallmarks) είναι κοινώς αποδεκτά εντός της επιστημονικής κοινότητας και ακολουθεί η περιγραφή τους στην ενότητα A.1.2 (López-Otín *et al*, 2023).

A.1.1. Θεωρίες της γήρανσης

A.1.1.1. Θεωρίες προγραμματισμένης γήρανσης (γενετικές θεωρίες)

Οι θεωρίες προγραμματισμένης γήρανσης, που αναφέρονται και ως θεωρίες ενεργητικής ή προσαρμοστικής γήρανσης, υποδηλώνουν τη σκόπιμη επιδείνωση της λειτουργίας του οργανισμού με την ηλικία, καθώς η περιορισμένη διάρκεια ζωής έχει ως αποτέλεσμα ποικίλα εξελικτικά οφέλη (Goldsmith, 2012). Η ιδέα διατυπώθηκε από τον August Weismann το 1882, ο οποίος πρότεινε πως η απομάκρυνση του γηραιότερου πληθυσμού είναι αποτέλεσμα φυσικής επιλογής, προκειμένου να μειωθεί ο ανταγωνισμός ως προς τους φυσικούς πόρους, δίνοντας έτσι μεγαλύτερες πιθανότητες στην επιβίωση των νέων απογόνων (Kirkwood & Cremer, 1982). Αρκετές θεωρίες υποστηρίζουν από μηχανιστικής άποψης την προγραμματισμένη γήρανση και μπορούν να διακριθούν σε τρεις υποκατηγορίες:

1) **Την προγραμματισμένη μακροβιότητα**, σύμφωνα με την οποία η γήρανση είναι το αποτέλεσμα μιας προγραμματισμένης διαδοχικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης ορισμένων γονιδίων αποτρέποντας έτσι την επανόρθωση της φθοράς (Davidovic *et al*, 2010).

2) **Την ενδοκρινική θεωρία**, κατά την οποία ο ρυθμός της γήρανσης ελέγχεται μέσω των ορμονικών μεταβολών. Παράδειγμα αποτελεί το εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και του παράγοντα IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1 – IGF-1), το οποίο έχει βασικό ρόλο στην ορμονική ρύθμιση της γήρανσης (van Heemst, 2010).

3) **Την ανοσολογική θεωρία**, η οποία υποστηρίζει την προγραμματισμένη εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος με την πάροδο του χρόνου με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας σε ασθένειες. Κατά τη γήρανση, τα αντισώματα χάνουν την αποτελεσματικότητά τους οδηγώντας σε κυτταρικό στρες και θάνατο (Fulop *et al*, 2014).

A.1.1.2. Θεωρίες φθοράς (στοχαστικές θεωρίες)

Σε αντίθεση με τις θεωρίες προγραμματισμένης γήρανσης, οι θεωρίες φθοράς ή στοχαστικές θεωρίες δίνουν μεγαλύτερη έμφαση στην επίδραση του περιβάλλοντος στην εξέλιξη της γήρανσης. Σύμφωνα με τις θεωρίες φθοράς, η γήρανση είναι το αποτέλεσμα της συσσώρευσης βλαβών που οδηγούν τελικά στον θάνατο.

Οι πρώτες παρατηρήσεις διατυπώθηκαν από τον Peter Medawar (1952), ο οποίος υποστήριξε πως η γήρανση είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης μεταλλαγών και βλαβών σε μεγάλη ηλικία. Ο Medawar πρότεινε ότι η δύναμη της φυσικής επιλογής φθίνει όταν ένας οργανισμός ξεπεράσει το ηλικιακό στάδιο της αναπαραγωγής. Στην περίπτωση που ένας οργανισμός είχε ένα χαρακτηριστικό που θα οδηγούσε στον θάνατο πριν την αναπαραγωγική περίοδο, το χαρακτηριστικό αυτό θα είχε αρνητική επιλογή εξελικτικά, καθώς οι οργανισμοί που θα διέθεταν αυτό το χαρακτηριστικό θα πέθαιναν πριν αποκτήσουν απογόνους. Αντίθετα, η απομάκρυνση μεταλλαγών με καταστροφικές συνέπειες μετά την αναπαραγωγική περίοδο δεν επηρεάζει ουσιαστικά την επιβίωση των απογόνων (Medawar, 1953). Λίγα χρόνια αργότερα οι Williams (1957) και Hamilton (1966) κατέληξαν στη θεωρία των πλειοτροπικών μεταλλαγών σύμφωνα με την οποία οι μεταλλαγές μπορεί να έχουν διττή φύση με θετικό πλεονέκτημα στα νεαρά άτομα και αρνητικές συνέπειες σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (Williams, 2001; Hamilton, 1966).

Το 1977 ο Kirkwood πρότεινε τη θεωρία του φθαρτού σώματος, σύμφωνα με την οποία η γήρανση αποτελεί τη φθορά ενός οργανισμού λόγω της λειτουργίας του (Kirkwood, 1977). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Kirkwood, τα ζώα προωθούν την ενέργεια από τους σωματικούς ιστούς προς τη βλαστική σειρά προκειμένου να διατηρήσουν την αναπαραγωγική τους ακεραιότητα. Προς υποστήριξη της συγκεκριμένης υπόθεσης, έχει παρατηρηθεί πως η αφαίρεση των γεννητικών κυττάρων σε ζώα, προωθεί το προσδόκιμο ζωής και την ανθεκτικότητα στο στρες (Arantes-Oliveira *et al*, 2002).

Η πιο δημοφιλής θεωρία ανάμεσα στους μηχανισμούς που συμβάλλουν στη φθορά και οδηγούν στη γήρανση είναι η θεωρία των ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη θεωρία δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species- ROS) αλλά και άλλες ελεύθερες ρίζες, προκαλούν βλάβες στα μακρομοριακά συστατικά του κυττάρου, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια, τα σάκχαρα και οι πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών και την παρεμπόδιση της λειτουργίας του κυττάρου και κατ' επέκταση του ιστού και τελικά του οργανισμού. Επιπλέον, ανάμεσα στους μηχανισμούς φθοράς βρίσκεται η θεωρία σωματικής βλάβης του DNA, οι διαμοριακές συνδέσεις (cross-linking) και η ελαττωματική κωδικοποίηση (Bjorksten & Tenhu, 1990).

A.1.1.3. Συνδυαστικές θεωρίες

Όπως ήδη αναφέρθηκε, έχουν προταθεί πολλαπλές θεωρίες γήρανσης. Παρόλο ότι δεν υπάρχει μία ενιαία προσέγγιση, φαίνεται ότι οι προτεινόμενοι μηχανισμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες συνδυασμού των διαφορετικών απόψεων και θεωριών για τη γήρανση (Jin, 2010; Barja, 2013). Μία από τις πρώτες προσπάθειες ανάπτυξης μία ενιαίας θεωρίας έγινε από τον Strehler το 1976 ο οποίος διατύπωσε τέσσερα αξιώματα: 1) η γήρανση είναι καθολική, 2) οι αιτίες της γήρανσης πρέπει να είναι ενδογενείς και να μην εξαρτώνται από εξωγενείς παράγοντες, 3) η γήρανση είναι προοδευτική και συμβαίνει σταδιακά σε όλη τη διάρκεια της ζωής και, 4) η γήρανση πρέπει να είναι επιβλαβής.

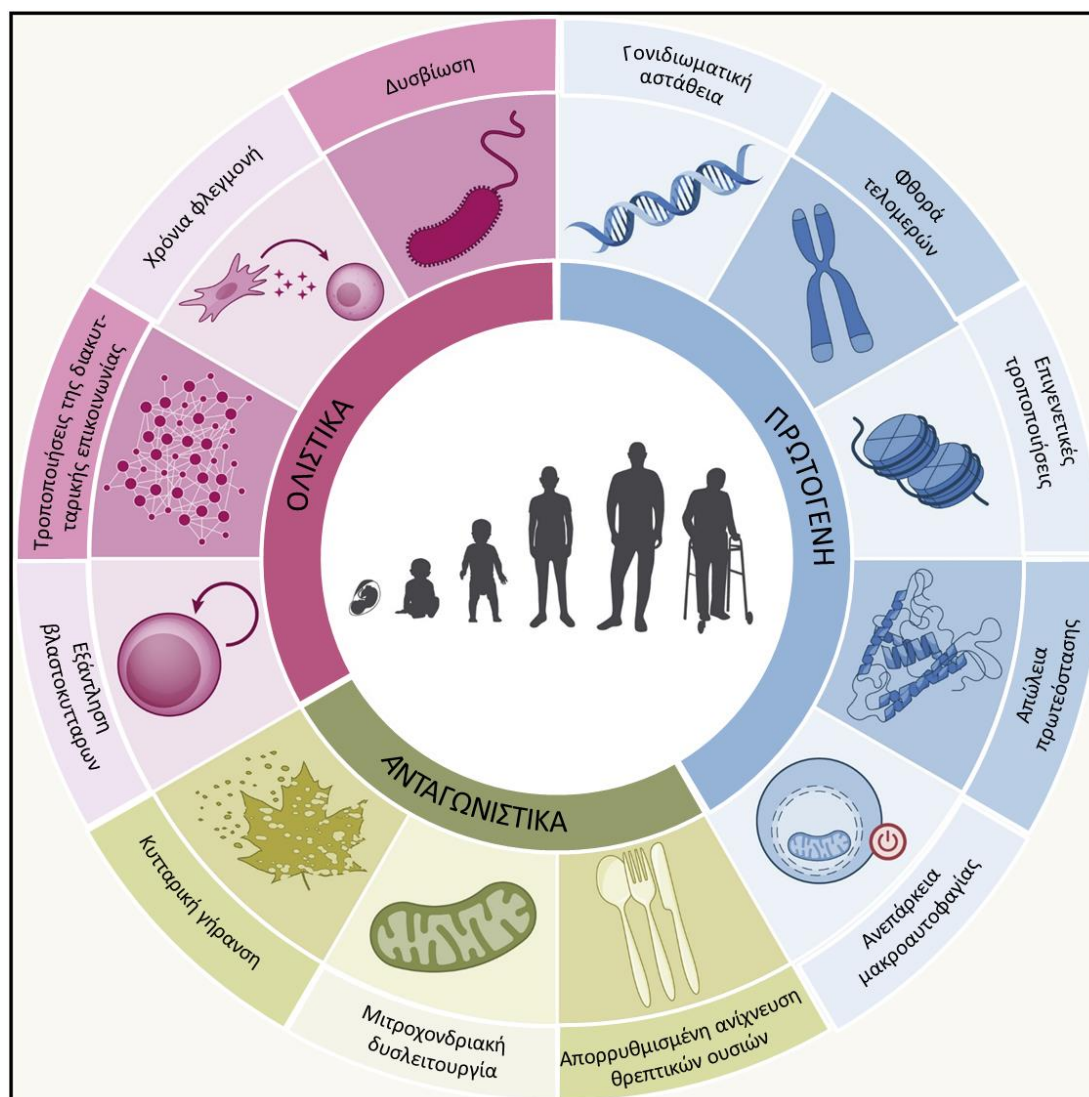
A.1.2. Τα χαρακτηριστικά (hallmarks) της γήρανσης

Παρόλο που οι θεωρίες γύρω από τις αιτίες της γήρανσης συνεχίζουν να βρίσκονται σε ανοιχτή συζήτηση με αντιπαραθέσεις, τα βασικά χαρακτηριστικά της γήρανσης αναγνωρίζονται ευρέως εντός της επιστημονικής κοινότητας. Τα χαρακτηριστικά που διέπουν τη γήρανση πληρούν τρεις προϋποθέσεις:

- 1) η εκδήλωσή τους σχετίζεται με την ηλικία,
- 2) η επιδείνωσή τους επιταχύνει τη γήρανση και,
- 3) η βελτίωσή τους καθυστερεί τη γήρανση.

Το 2013 διατυπώθηκαν από τους Carlos López-Otín και συνεργάτες τα βασικά χαρακτηριστικά της γήρανσης που έχουν παρατηρηθεί κυρίως σε θηλαστικά αλλά και σε κατώτερους οργανισμούς (López-Otín *et al*, 2013). Σε ακόμα πιο πρόσφατη ανασκόπηση προστέθηκαν επιπλέον χαρακτηριστικά, τα οποία είναι αλληλένδετα μεταξύ τους και φτάνουν συνολικά τα 12 (**εικόνα A1**). Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά αυτά είναι: η γονιδιωματική αστάθεια, η φθορά των τελομερών, οι επιγενετικές τροποποιήσεις, η απώλεια της πρωτεόστασης, η ανεπάρκεια της μακροαντοφαγίας, η απορρύθμιση ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η κυτταρική γήρανση, η εξάντληση των βλαστοκυττάρων, οι τροποποιήσεις της διακυτταρικής επικοινωνίας, η χρόνια φλεγμονή και η δυσβίωση (López-Otín *et al*, 2023). Τα χαρακτηριστικά αυτά διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: 1) **τα πρωτογενή**, κοινό γνώρισμα των οποίων είναι ο αρνητικός τους χαρακτήρας καθώς ωθούν τη γήρανση, 2) **τα ανταγωνιστικά**, τα οποία έχουν ευεργετικά

αποτελέσματα σε χαμηλά επίπεδα και αποκτούν αρνητικό χαρακτήρα σε υψηλά επίπεδα, και 3) **τα ολιστικά χαρακτηριστικά**, τα οποία προκύπτουν όταν η συσσώρευση βλαβών που προκαλείται από τα πρωτογενή και τα ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς των ιστών.



Εικόνα Α1: Τα χαρακτηριστικά της γήρανσης. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα 12 ευρέως αποδεκτά χαρακτηριστικά της γήρανσης.

Τροποποιημένο από Lopez-Otin C. *et al*, Cell, 2023. 186(2): p 243-278

A.1.2.1. Πρωτογενή χαρακτηριστικά

Ι Γονιδιωματική αστάθεια

Ποικίλοι παράγοντες τόσο εξωγενείς (χημικοί και φυσικοί) όσο και ενδογενείς (λάθη κατά την αντιγραφή του DNA και κατά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, οξειδωτικές διεργασίες κ.α.) μπορούν να επηρεάσουν την ακεραιότητα του

γονιδιώματος. Οι γενετικές αλλοιώσεις που προκύπτουν περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, διαγραφές, μετατοπίσεις, βράχυνση τελομερών, θραύσεις της μονής και της διπλής αλυσίδας DNA, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, ελαττώματα στη δομή του πυρήνα και γονιδιακή διαταραχή, που προκαλείται από την ενσωμάτωση τρανσποζονίων. Όλες αυτές οι βλάβες συμβάλλουν τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική γήρανση. Για τον λόγο αυτό οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει συστήματα επιδιόρθωσης και διατήρησης της ακεραιότητας του DNA, τα οποία φαίνεται να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους κατά τη γήρανση, επιτείνοντας τη συσσώρευση γενετικών βλαβών.

II Φθορά τελομερών

Βλάβες του DNA στις άκρες των χρωμοσωμάτων (τελομερή) συμβάλλουν στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις (Blackburn *et al*, 2015). Οι DNA πολυμεράσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή του DNA, αδυνατούν να ολοκληρώσουν την αντιγραφή της περιοχής των τελομερών του ευκαρυωτικού DNA. Τη διεργασία αυτή επιτελεί η τελομεράση, μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη που επιμηκώνει τα τελομερή προκειμένου να διατηρηθεί το μήκος τους (Greider & Blackburn, 1985; Chakravarti *et al*, 2021). Ωστόσο, στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα των θηλαστικών δεν εκφράζεται η τελομεράση, οδηγώντας σε μείωση τους μήκους των τελομερών σε κάθε κύκλο αντιγραφής. Η βράγχυνση των τελομερών έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια της γήρανσης σε πολλά είδη συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου και του ποντικού (Whittemore *et al*, 2019). Επιπλέον, σε ποντίκια μοντέλα για την AD στα οποία έχει προωθηθεί γενετικά η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της τελομεράσης, παρατηρείται διατήρηση της επιβίωσης των ενήλικων νευρώνων και της γνωστικής λειτουργίας, χαρακτηριστικά τα οποία φθίνουν με την εξέλιξη της νόσου (Shim *et al*, 2021).

III Επιγενετικές τροποποιήσεις

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που μπορούν να συμβάλλουν στη γήρανση περιλαμβάνουν μία μεγάλη ποικιλία όπως αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, μη φυσιολογικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, μη ορθή αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και απορρύθμιση της λειτουργίας των μη κωδικών RNA (ncRNAs). Οι απομεθυλάσες των ιστονών μπορούν να επηρεάσουν το προσδόκιμο ζωής στοχεύοντας βασικά μονοπάτια γήρανσης όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι ινσουλίνης/IGF-1. Η απώλεια των ιστονών και οι ιστοεξαρτώμενες μεταβολές στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους συνδέονται στενά με τη γήρανση. Η ενίσχυση της έκφρασης των ιστονών παρατείνει τη διάρκεια ζωής της *D. melanogaster*, ενώ αυξημένη ακετυλίωση της ιστόνης H4K16 ή τριμεθυλίωση της H3K4 και μειωμένα επίπεδα τριμεθυλίωσης της H3K9 ή της H3K27, παρατηρούνται σε ινοβλάστες ηλικιωμένων ατόμων και ασθενών με προγηρία (Lu *et al*, 2021). Στην υγιή γήρανση φαίνεται επίσης να συμβάλλουν και άλλα ένζυμα τροποποίησης των ιστονών όπως τα μέλη της οικογένειας των σιρτουϊνών (αποακετυλάσες πρωτεϊνών SIRT) και των ADP-ριβοσυλτρανσφερασών (Bhatt & Tiwari, 2023). Εκτός από τις τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών, παράγοντες που συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, όπως η πρωτεΐνη HP1α (Heterochromatin protein 1α) και οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb που εμπλέκονται στη γονιδιακή σταθερότητα

και στην επιδιόρθωση του DNA, μπορούν επίσης να ρυθμίσουν τη γήρανση (Swier & Sharma, 2021). Μεταβολές σε αυτούς τους επιγενετικούς παράγοντες οδηγούν σε αλλαγές της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης, κάτι που παρατηρείται στα γηρασμένα κύτταρα. Τέλος, ncRNA συμπεριλαμβανομένων των microRNA (miRNA) και των κυκλικών RNA, έχουν αναδειχθεί ως επιγενετικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη γήρανση. Τα ncRNA μπορούν να συμβάλλουν στην εξέλιξη της γήρανσης στοχεύοντας στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση συστατικών που εμπλέκονται σε μονοπάτια της γήρανσης ή ρυθμίζοντας τη συμπεριφορά των βλαστοκυττάρων (Jusic *et al*, 2022).

IV Απώλεια πρωτεόστασης

Η εξασθένηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (πρωτεόστασης) έχει σχετιστεί με τη γήρανση και με ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις όπως η AD, η νόσος του Parkinson (PD) και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (ALS). Η εξασθένηση της πρωτεόστασης οδηγεί στη συσσώρευση λάθος αναδιπλωμένων, οξειδωμένων, γλυκοζυλιωμένων ή ουμπικιτινυλιωμένων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Η ακεραιότητα της πρωτεόστασης διασφαλίζεται από ένα εξειδικευμένο δίκτυο, το δίκτυο της πρωτεόστασης (ΔΠ) (περιγράφεται πιο αναλυτικά στην ενότητα A.2). Το ΔΠ δρα μέσω της διασφάλισης της ορθής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών με τη βοήθεια των μοριακών συνοδών/πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Chaperones/Heat Shock Proteins - HSP) και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μέσω του UPS και του ALP. Η λειτουργία του δικτύου πρωτεόστασης φθίνει κατά τη γήρανση ενώ έχει παρατηρηθεί πως ενίσχυσή του σε διάφορους οργανισμούς οδηγεί σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής (Chondrogianni *et al*, 2014; Hipp *et al*, 2019).

V Ανεπάρκεια μακροαυτοφαγίας

Η μακροαυτοφαγία (θα αναφέρεται εφεξής ως αυτοφαγία) περιλαμβάνει τη δέσμευση κυτταροπλασματικού υλικού από τα αυτοφαγοσώματα τα οποία συντήκονται με τα λυσοσώματα και πέπτουν το περιεχόμενο των αυτοφαγοσωμάτων. Έτσι, η αυτοφαγία δεν εμπλέκεται μόνο στην πρωτεόσταση αλλά επηρεάζει και μη πρωτεϊνικά μακρομόρια, ολόκληρα οργανίδια (όπως μη λειτουργικά μιτοχόνδρια – μιτοφαγία (mitophagy)) και ενδοκυτταρικά παθογόνα (όπως βακτήρια, ιούς και παράσιτα – ξενοφαγία (xenophagy)). Η εξασθένηση της αυτοφαγίας κατά τη γήρανση συνδέεται -εκτός από την εξασθένηση της πρωτεόστασης- με την εξασθένηση της ομοιόστασης των οργανιδίων που αποικοδομούνται μέσω αυτής (Levine & Kroemer, 2019).

A.1.2.2. Ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά

I Απορρύθμιση της ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών

Το δίκτυο της ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών είναι καλά διατηρημένο εξελικτικά και ο στόχος του είναι να αντιλαμβάνεται τα επίπεδα πρόσληψης θρεπτικών ουσιών, έτσι ώστε να ανταποκρίνεται σε αυτά μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού. Στο δίκτυο συμμετέχουν εξωκυτταρικοί προσδέτες όπως η ινσουλίνη και ο IGF, που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, καθώς και ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Στα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβάνονται τα

μονοπάτια PI3K-AKT και Ras-MEK-ERK και οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO (Forkhead box class O) και E26 (transformation-specific, ETS) και ενεργοποιούν γονίδια που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Εξίσου σημαντική είναι και η ανταπόκριση του συμπλόκου mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), το οποίο ανταποκρίνεται σε θρεπτικά συστατικά όπως η γλυκόζη και τα αμινοξέα, παρουσία των οποίων οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταβολισμού, ενώ σε συνθήκες στρες, όπως η υποξία και τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας, διεγείρει μονοπάτια κυτταρικής άμυνας. Μείωση της σηματοδότησης της διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής διάφορων ζωικών μοντέλων (Singh *et al*, 2019; Houtkooper *et al*, 2010).

II Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Εκτός από πηγή ενέργειας για το κύτταρο, τα μιτοχόνδρια αποτελούν πηγή οξειδωτικού στρες κατά τη γήρανση λόγω της διαρροής ηλεκτρονίων (και κατ' επέκταση ROS). Κατά την κυτταρική γήρανση, παρατηρείται μείωση της ορθής λειτουργικότητας της αναπνευστικής αλυσίδας (Electron Transport Chain- ETC) με αποτέλεσμα την αύξηση των ROS και μείωση της παραγωγής του ATP. Ωστόσο, υπάρχουν και δεδομένα που υποστηρίζουν πως ήπια αυξημένα επίπεδα ROS, μέχρι ένα κατώφλι, συμβάλλουν στην καθυστέρηση της γήρανσης, καθώς προωθούν την ενεργοποίηση μηχανισμών επιβίωσης. Κατά τη γήρανση, η εξασθένηση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων αποδίδεται σε πολλαπλούς αλληλένδετους μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων της συσσώρευσης μεταλλάξεων του mtDNA, της ελλιπούς πρωτεόστασης που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των συμπλόκων της ETC και των μεταβολών του μιτοχονδριακού δυναμικού (Amorim *et al*, 2022).

III Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση είναι μία απόκριση σε οξεία ή χρόνια βλάβη και ορίζεται ως η μόνιμη παύση τους κυτταρικού κύκλου προκειμένου να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός κυττάρων που φέρουν βλάβες (Gorgoulis *et al*, 2019). Στον άνθρωπο τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται σε πολλούς ιστούς με διαφορετικό ρυθμό επηρεάζοντας σε μεγαλύτερο βαθμό τους ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (Xu *et al*, 2022). Η κυτταρική γήρανση αποτελεί ένα ισχυρό ογκοκατασταλτικό μηχανισμό. Ωστόσο, η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων φαίνεται να ενεργοποιεί τη στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού τα οποία προάγουν την απομάκρυνση των πρώτων. Οι παθολογικές συνέπειες της γήρανσης γίνονται ορατές όταν δεν επιτυγχάνεται το στάδιο της ανοσολογικής απομάκρυνσης των γηρασμένων κυττάρων (Zhang *et al*, 2022).

A.1.2.3. Ολιστικά χαρακτηριστικά

I Εξάντληση βλαστοκυττάρων

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της γήρανσης αποτελεί η αδυναμία αναγέννησης των ιστών καθώς και η αδυναμία αποκατάστασης έπειτα από τραυματισμό, με το κάθε όργανο να έχει τη δική του στρατηγική ανανέωσης και επιδιόρθωσης (Clevers & Watt, 2018). Είναι γνωστό πως τα βλαστοκύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την ανανέωση και την αναγέννηση των ιστών. Ωστόσο, όπως όλα τα κύτταρα, τα

βλαστοκύτταρα επηρεάζονται με τον χρόνο, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών που οδηγούν τόσο σε μείωση του αριθμού όσο και της λειτουργίας τους και κατ' επέκταση του αναγεννητικού δυναμικού τους (Liu *et al*, 2022).

II Τροποποιήσεις της διακυτταρικής επικοινωνίας

Εκτός από τις αυτόνομες κυτταρικές αλλαγές, στην εξέλιξη της γήρανσης συμβάλλουν και αλλαγές στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Τέτοιου είδους αλλαγές αποτελούν η ανεπάρκεια νευρικής, νευροενδοκρινικής και ορμονικής σηματοδότησης και μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση στη φλεγμονή, την ανοσοαπόκριση έναντι παθογόνων και προκαρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης και την αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ ανθρώπινου γονιδιώματος και μικροβιώματος, οδηγώντας σε δυσβίωση (Miller *et al*, 2020).

III Χρόνια φλεγμονή

Κατά τη γήρανση παρατηρείται αύξηση των επιπέδων φλεγμονής με επακόλουθο την εκδήλωση συστημικών και τοπικών παθολογικών φαινοτύπων όπως είναι η αρτηριοσκλήρυνση, η φλεγμονή των νευρώνων και η οστεοαρθρίτιδα. Τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 στο πλάσμα αποτελούν έναν προγνωστικό βιοδείκτη θνησιμότητας σε γηρασμένους ανθρώπινους πληθυσμούς (Hirata *et al*, 2020). Έχει παρατηρηθεί πως συγκεκριμένοι χειρισμοί της απόκρισης στη φλεγμονή μπορούν επηρεάσουν τον ρυθμό γήρανσης (Ferrucci & Fabbri, 2018).

IV Δυσβίωση

Τα τελευταία χρόνια, το μικροβίωμα του εντέρου έχει αναδειχθεί ως βασικός παράγοντας σε πολλαπλές φυσιολογικές διεργασίες όπως η πέψη και η απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών, η προστασία από παθογόνα και η παραγωγή βασικών μεταβολιτών. Το μικροβίωμα του εντέρου σηματοδοτεί επίσης στο περιφερικό και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς και σε απομακρυσμένα όργανα, επηρεάζοντας τη συνολική διατήρηση της υγείας του ξενιστή (López-Otín & Kroemer, 2021). Διαταραχή της αμφίδρομης επικοινωνίας μεταξύ βακτηρίων και ξενιστή έχει ως αποτέλεσμα τη δυσβίωση, η οποία μπορεί να συμβάλλει σε μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων όπως παχυσαρκία, διαβήτης τύπου 2, νευρολογικές διαταραχές, καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνος (Zmora *et al*, 2019). Μελέτες υποστηρίζουν πως η δυσβίωση αποτελεί αιτία φλεγμονής και μείωσης της προσαρμοστικής ανοσίας που σχετίζεται με τη γήρανση και τις ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις (Fransen *et al*, 2017).

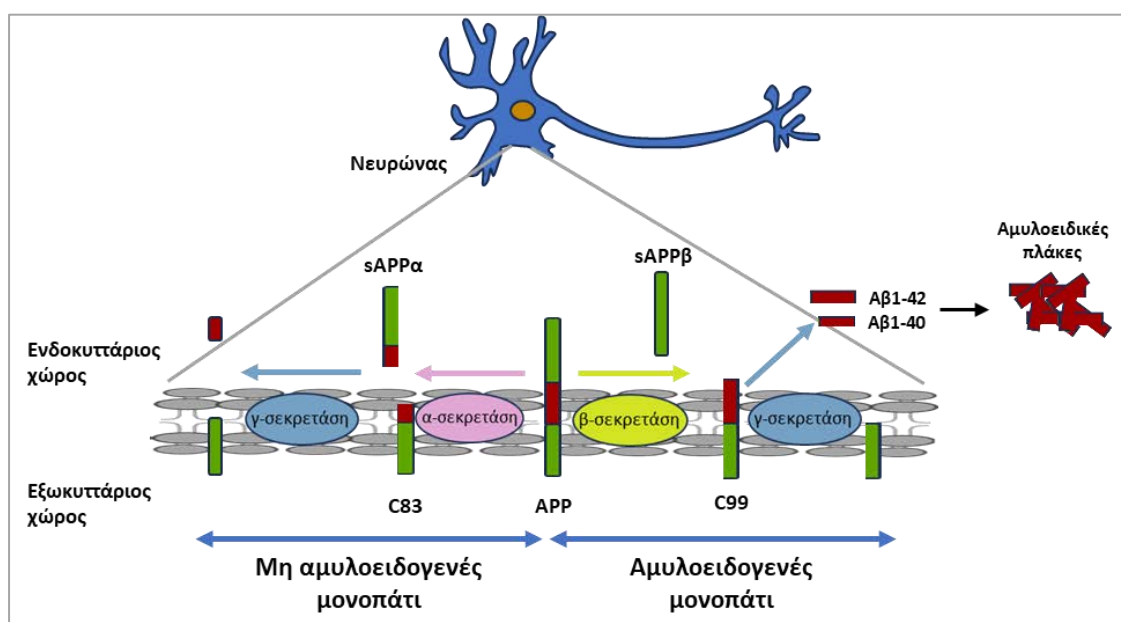
A.1.3. Ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις: η νόσος του Alzheimer (AD)

Αν και η γήρανση είναι μια φυσιολογική διαδικασία, συχνά αποτελεί τον κινητήριο παράγοντα εμφάνισης και εξέλιξης ασθενειών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις, τα καρδιαγγειακά νοσήματα αλλά και ο καρκίνος. Στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως είναι η AD και η PD, σημαντικό ρόλο στην παθολογία τους έχει η συσσώρευση και η συσσωμάτωση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται και ως πρωτεϊνοπάθειες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κατάρρευση των μηχανισμών πρωτεόστασης -η οποία συνδέεται με την ικανότητα του κυττάρου να απομακρύνει μη

φυσιολογικές πρωτεΐνες- ανήκει στα χαρακτηριστικά της γήρανσης. Καθώς στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της επαγωγής των πρωτεοστατικών μηχανισμών στην AD, η ενότητα αυτή επικεντρώνεται στην συγκεκριμένη ηλικιοεξαρτώμενη πάθηση.

Η AD είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου και αποτελεί τη συχνότερη αιτία της άνοιας. Χαρακτηριστικά της νόσου αποτελούν δύο τύποι πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων: α) το εξωκυττάριο β-αμυλοειδές πεπτίδιο (Aβ) το οποίο συσσωρεύεται δημιουργώντας πλάκες και, β) η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη tau η οποία συσσωρεύεται σε νευροϊνιδιακά πλέγματα στον εγκεφαλικό φλοιό.

Το Aβ πεπτίδιο σχηματίζεται από την πρωτεΐνη APP (amyloid precursor protein) η οποία είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται καθολικά σε όλους τους νευρικούς τύπους κυττάρων. Η APP υπόκειται σε μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική τροποποίηση μέσω δύο διακριτών μονοπατιών, το μη αμυλοειδογενές (amyloidogenic pathway) και το αμυλοειδογενές (non-amyloidogenic) (**εικόνα A2**). Στο μη αμυλοειδογενές μονοπάτι η APP διασπάται αρχικά από την α-σεκρετάση που οδηγεί στη δημιουργία μίας μεγάλης διαλυτής δομής, της sAPPα και ενός C-καρβοξυτελικού πεπτιδίου (C83). Το C83 διασπάται από τη γ-σεκρετάση με αποτέλεσμα τη δημιουργία του πεπτιδίου p3 και της αμινοτελικής ενδοκυτταρικής δομής AICD (amino-terminal APP intracellular domain). Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι, η APP διασπάται από τη β-σεκρετάση οδηγώντας στη δημιουργία μίας μεγάλης διαλυτής δομής της APP (sAPPβ) και ενός C-τελικού πεπτιδίου (C99). Από την περαιτέρω διάσπαση του C99 από τη γ-σεκρετάση προκύπτει το Aβ πεπτίδιο. Η γ-σεκρετάση διασπά την APP σε διάφορες θέσεις δημιουργώντας Aβ πεπτίδια ποικίλων μηκών. Συγκεκριμένες θέσεις διάσπασης έχουν καθοριστικό ρόλο στην τάση των Aβ πεπτιδίων προς συσσωμάτωση. Το 42 αμινοξέων πεπτίδιο (Aβ₁₋₄₂) έχει μεγαλύτερη προδιάθεση προς συσσωμάτωση και νευροτοξικότητα σε σχέση με το πεπτίδιο Aβ₁₋₄₀.



Εικόνα A2. Το μη αμυλοειδογενές και το αμυλοειδογενές μονοπάτι. Στο μη αμυλοειδογενές μονοπάτι η APP διασπάται από την α-σεκρετάση οδηγώντας στον

σχηματισμό της πρωτεΐνης sAPPα και του C83 το οποίο διασπάται από τη γ-σεκρετάση οδηγώντας στη δημιουργία μη τοξικών πεπτιδίων. Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι η APP διασπάται από την β-σεκρετάση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της πρωτεΐνης sAPPβ και του C99 το οποίο διασπάται από τη γ-σεκρετάση οδηγώντας στη δημιουργία Αβ πεπτιδίων με τάση προς συσσωμάτωση.

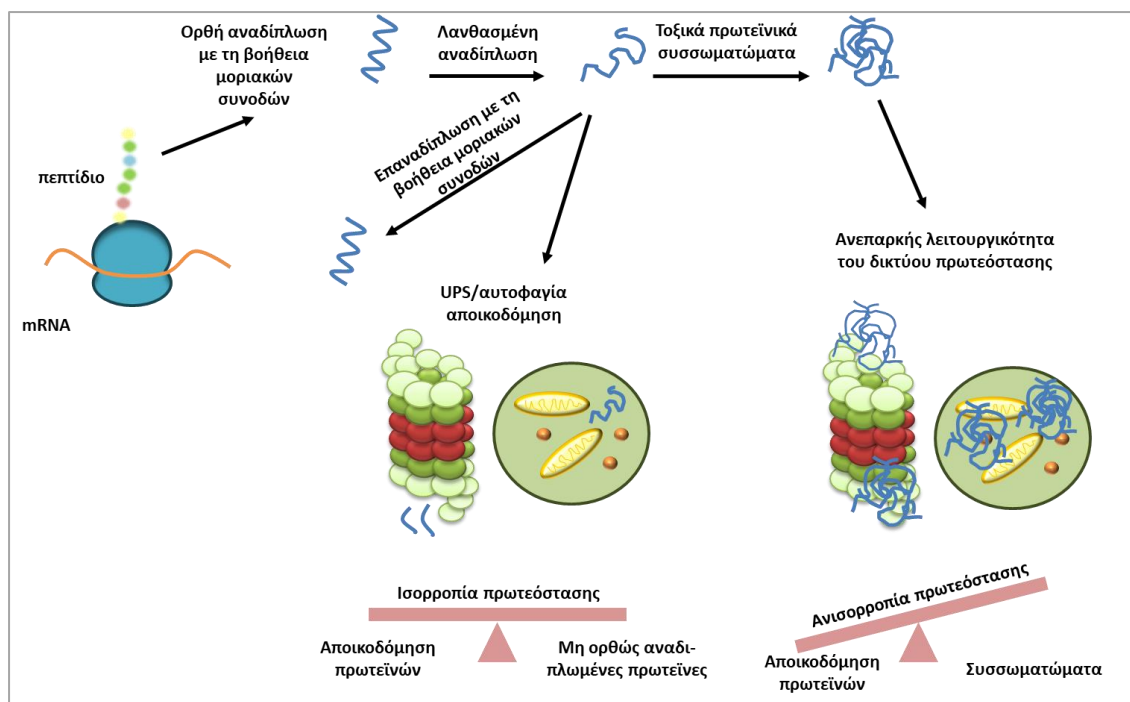
Εκτός από το πεπτίδιο Αβ και την αμυλοειδική υπόθεση, πολλά παθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με AD συσχετίζονται με τη συσσωμάτωση της tau. Η tau είναι μία φωσφοπρωτεΐνη η οποία κωδικοποιείται μέσω εναλλακτικού ματίσματος του MAPT (microtubule-associate protein tau) γονιδίου (Andreadis *et al*, 1992). Η tau εντοπίζεται στους άξονες των νευρώνων, όπου ρυθμίζει τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων διασφαλίζοντας την ορθή οργάνωση του κυτταροσκελετού. Η φωσφορυλίωση της tau είναι θεμελιώδης για τη λειτουργία της. Ωστόσο, μη φυσιολογική υπερφωσφορυλίωση της tau έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μη λειτουργικής πρωτεΐνης και τη συσσώρευσή της. Η ενδοκυτταρική συσσώρευση της tau στους νευρώνες οδηγεί με τη σειρά της στη δημιουργία νευροϊνιδιακών πλεγμάτων.

A.2. Το δίκτυο της πρωτεόστασης

Τα κύτταρα, προκειμένου να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους, εκφράζουν έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών, οι οποίες πρέπει να αναδιπλωθούν σε καλά καθορισμένες τρισδιάστατες δομές (Kulak *et al*, 2017). Πολλές πρωτεΐνες χρειάζονται τη βοήθεια μοριακών συνοδών και άλλων παραγόντων προκειμένου να αναδιπλωθούν αποτελεσματικά (Balchin *et al*, 2016). Ωστόσο, υπό συνθήκες στρες, οι πρωτεΐνες μπορεί να χάσουν τη λειτουργική δομή τους και να καταλήξουν στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Οι λάθος αναδιπλούμενες πρωτεΐνες αλλά και οι πρωτεΐνες που δεν είναι πλέον λειτουργικές, θα πρέπει να αποικοδομούνται προκειμένου να αποφευχθούν βλάβες λόγω της συνεχούς παρουσίας τους. Συνεπώς, η διατήρηση της πρωτεόστασης απαιτεί όχι μόνο αυστηρό έλεγχο της σύνθεσης και αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης, αλλά και τη διατήρηση της διαμόρφωσής της, τον έλεγχο της επάρκειας και του κυτταρικού εντοπισμού της και, τέλος, την αποικοδόμησή της.

Η ακεραιότητα του πρωτεώματος επιτυγχάνεται μέσω του ΔΠ. Το ΔΠ είναι ένα εξαιρετικά διατηρημένο και σύνθετο δίκτυο, το οποίο επιστρατεύει μία μεγάλη ποικιλία μοριακών συνοδών και παραγόντων που ελέγχουν την ποιότητα μιας πρωτεΐνης, οι οποίοι είναι λειτουργικά συνδεδεμένοι με μηχανισμούς αποικοδόμησης πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, σε συνθήκες που δεν ευνοούν την αναδίπλωση, ορισμένοι μοριακοί συνοδοί δρουν στοχεύοντας τις λάθος αναδιπλούμενες πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση (Balchin *et al*, 2016). Λειτουργικά το ΔΠ μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις κύριες αλληλένδετες διεργασίες: 1) την πρωτεϊνοσύνθεση, 2) την αναδίπλωση και τη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης και, 3) την αποικοδόμησή της, κυρίως μέσω του UPS ή μέσω του ALP.

Διαταραχές στη λειτουργία του ΔΠ, έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση κατεστραμμένων και μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και τοξικών συσσωματωμάτων. Διαταραχές μπορεί να προκύψουν λόγω της κατάρρευσης των πρωτεοστατικών μηχανισμών που προκύπτει με την εξέλιξη της γήρανσης αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων οδηγώντας στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Άλλη αιτία διαταραχής του ΔΠ είναι η συνεχής έκφραση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, η υπέρμετρη συσσώρευση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία του ΔΠ να ανταπεξέλθει στην επεξεργασία και απομάκρυνσή τους, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός φαύλου κύκλου κατάρρευσης των μηχανισμών του ΔΠ και δημιουργίας περισσότερων συσσωματωμάτων (εικόνα A3).



Εικόνα Α3. Το δίκτυο της πρωτεόστασης. Οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται προκειμένου να αποκτήσουν τη φυσιολογική τους διαμόρφωση και τη θερμοδυναμική σταθεροποίησή τους. Η διαδικασία της αναδίπλωσης επιτελείται υπό την αυστηρή επιτήρηση πρωτεϊνών μοριακών συνοδών οι οποίες εξασφαλίζουν την ορθή αναδίπλωση. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες που έχουν επιτελέσει τη λειτουργία τους ή οι λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες που μπορεί να προκύψουν αποικοδομούνται και απομακρύνονται κυρίως μέσω του UPS είτε μέσω του ALP. Ωστόσο, κατά τη γήρανση αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, η λειτουργία του ΔΠ φθίνει οδηγώντας σε διαταραχή της ισορροπίας της πρωτεόστασης.

Τροποποιημένο από Vasilopoulou M. *et al*, Proteostasis and proteolysis, 2021, pp: 152-166

A.2.1. Πρωτεϊνοσύνθεση

Προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, τα επίπεδα της σύνθεσής τους πρέπει να προσαρμόζονται στην ικανότητα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης του κυττάρου. Πράγματι, σε κύρια μονοπάτια επιμήκυνσης του προσδόκιμου ζωής όπως ο θερμιδικός περιορισμός, η αυξημένη ικανότητα πρωτεόστασης αποδίδεται, εν μέρη, στη μείωση της μετάφρασης. Η μείωση των επιπέδων της μετάφρασης, φαίνεται να είναι επίσης κρίσιμη σε συνθήκες υπερφόρτωσης του ΔΠ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Αυτό συνήθως προκαλείται από την αναστολή του παράγοντα eIF2α (eukaryotic initiation factor 2). Για παράδειγμα, κατά την ενεργοποίηση του συστήματος απόκρισης στις λάθος αναδιπλούμενες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου (unfolded protein response in endoplasmic reticulum, UPR^{ER}, ενότητα A.2.2), η κινάση PERK στη μεμβράνη του ER φωσφορυλιώνει τον eIF2α αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία του στη μετάφραση (Harding *et al*, 2001).

A.2.2. Αναδίπλωση

Η διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης στο χώρο απαιτεί τη συμμετοχή μοριακών συνοδών. Ως μοριακός συνοδός ορίζεται οποιοσδήποτε παράγοντας

αλληλεπιδρά και βοηθά στην αναδίπλωση ή τη συναρμολόγηση μιας άλλης πρωτεΐνης χωρίς να αποτελεί μέρος της τελικής της δομής (Hartl, 1996). Μηχανιστικά, οι μοριακοί συνοδοί παρεμποδίζουν τη συσσώματωση και προάγουν την αναδίπλωση μέσω ATP-εξαρτώμενων και μη, μηχανισμών πρωτεϊνικής δέσμευσης και απελευθέρωσης (Balchin *et al*, 2016; Lee *et al*, 2018). Ταξινομούνται σε διάφορες οικογένειες πρωτεϊνών όπως στις μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (small heat shock proteins, sHSPs), HSP60, HSP70 και HSP90 και αναγνωρίζουν το εκτεθειμένο υδρόφοβο αμινοτελικό κατάλοιπο και τις μη δομημένες πολυπεπτιδικές πλευρές των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων τους. Οι μοριακοί συνοδοί που συμμετέχουν στην αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, δρουν τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά τη μετάφραση, προκειμένου να αποτρέψουν ή να αντιστρέψουν τη μη ορθή αναδίπλωση και συσσώματωση.

Η αναδίπλωση και η ωρίμανση των πρωτεϊνών στα μετάζωα λαμβάνει χώρα κυρίως στο ER. Παρουσία μη φυσιολογικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, το ER έχει στη διάθεσή του τον μηχανισμό UPR^{ER}. Η ενεργοποίηση του UPR^{ER} στοχεύει στη μείωση της μεταγραφής εκκρινόμενων πρωτεϊνών και στην ενίσχυση της απομάκρυνσης λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω του μονοπατιού ERAD (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) και της αποικοδόμησης από τα λυσοσώματα. Επιπλέον, το UPR^{ER} προωθεί τη σύνθεση μοριακών συνοδών προκειμένου να ενισχύσει την ικανότητα αναδίπλωσης στο ER (Read & Schröder, 2021). Στα κύτταρα των θηλαστικών, το UPR^{ER} ελέγχεται από τρεις βασικούς διαμεμβρανικούς ενεργοποιητές, το ένζυμο IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), την κινάση PERK και από τον μεταγραφικό παράγοντα ATF6 (Activating transcription factor 6). Όταν το IRE1 ενεργοποιείται με την παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, αυτοφωσφορυλιώνεται ενεργοποιώντας την ενεργότητα ενδοριβονουκλεάσης, καταλύοντας έτσι το μάτισμα των μεταγράφων mRNA της πρωτεΐνης XBP-1 (X-box-binding protein 1) με αποτέλεσμα τη δημιουργία του μεταγραφικού ενεργοποιητή XBP-1s (Calfon *et al*, 2002). Ο XBP-1s ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του ER που σχετίζονται με την αναδίπλωση και τον ποιοτικό έλεγχο. Το PERK από την άλλη πλευρά, όταν ενεργοποιείται φωσφορυλιώνει τον παράγοντα eIF2α μειώνοντας έτσι τη μετάφραση και την εισροή πρωτεϊνών στο ER (Ron & Walter, 2007). Τέλος, με την παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, ο ATF6 μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου επάγει την έκφραση ενός συνόλου γονιδίων του UPR^{ER} (Wang *et al*, 2000).

Μηχανισμός απόκριση στις λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες υπάρχει και στα μιτοχόνδρια (unfolded protein response in mitochondria, UPR^{mt}). Τα μιτοχόνδρια είναι τα πιο επιρρεπή κυτταρικά οργανίδια στο οξειδωτικό στρες λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS από την ETC, επομένως εξασφαλίζουν τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών τους μέσω του μηχανισμού UPR^{mt}. Ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1 είναι ένα από τα κύρια συστατικά του UPR^{mt} και υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες είναι υπεύθυνος για την έκφραση μιτοχονδριακών ειδικών μοριακών συνοδών όπως οι HSP6, mtHSP60 και mtHSP70. Το ATFS-1, υπό φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και αποικοδομείται από την πρωτεάση Lon. Όταν η ομοιόσταση των μιτοχονδρίων διαταράσσεται, το ATFS-1 μετατοπίζεται στον πυρήνα προάγοντας την έκφραση των μιτοχονδριακών μοριακών συνοδών (Pellegrino *et al*, 2013).

Τέλος, ένας από τους στρεσογόνους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι το θερμικό στρες. Η απόκριση στο θερμικό στρες είναι ένας από τους πιο καλά διατηρημένους κυτταρικούς αμυντικούς μηχανισμούς απόκρισης στη θερμοκρασία, καθώς και σε άλλες συνθήκες στρες, που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Morimoto, 1998). Στόχος του HSR, είναι η ανάκτηση της πρωτεόστασης αυξάνοντας την ποσότητα των διαθέσιμων μοριακών συνοδών. Ο βασικός παράγοντας της απόκρισης θερμικού σοκ είναι ο HSF1 (heat shock factor 1) που στοχεύει γονίδια θερμικού σοκ και επάγει την έκφραση βασικών μοριακών συνοδών όπως οι Hsp70, Hsp90 και Hsp10. Ο HSF1 σχηματίζει σύμπλοκα με τους μοριακούς συνοδούς Hsp90, Hsp70 και υπό συνθήκες στρες απελευθερώνεται από αυτό το σύμπλοκο και μετατοπίζεται στον πυρήνα σε τριμερή μορφή, όπου πυροδοτεί την έκφραση των προαναφερθέντων μοριακών συνοδών (Dayalan Naidu & Dinkova-Kostova, 2017).

A.2.3. Αποικοδόμηση

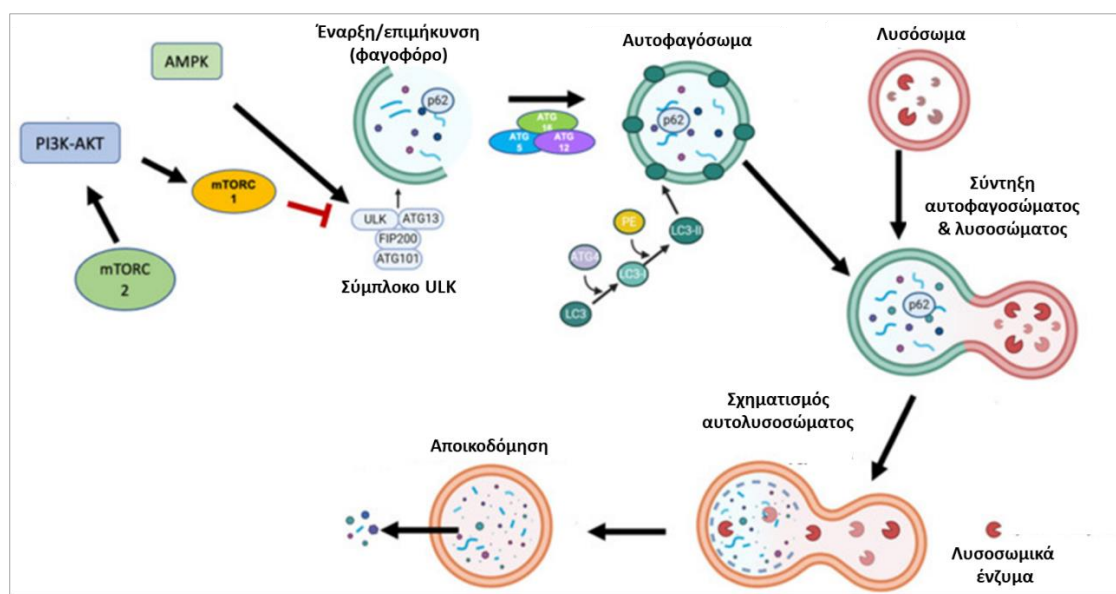
Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός μηχανισμός διατήρησης των επιπέδων των λειτουργικών πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας έτσι σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η μίτωση και η προσαρμογή των επιπέδων των πρωτεϊνών σε απόκριση στις περιβαλλοντικές μεταβολές (Glutzer *et al*, 1991). Επιπλέον, η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αποτελεί έναν μηχανισμό-κλειδί έναντι της συσσώρευσης λάθος αναδιπλούμενων πρωτεϊνών και συσσωματωμάτων. Τα δύο κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια είναι το UPS και το ALP (Ciechanover, 2017; Dikic, 2017).

Ο μηχανισμός αυτοφαγίας-λυσosώματος (ALP)

Η πρωτεϊνική αποικοδόμηση από τα λυσοσώματα επιτυγχάνεται με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς, τη μακροαυτοφαγία, τη μικροαυτοφαγία και την μεσολαβούμενη από μοριακούς συνοδούς αυτοφαγία (chaperon mediated autophagy, CMA) (Khandia *et al*, 2019). Η μακροαυτοφαγία (θα αναφέρεται εφεξής ως αυτοφαγία) είναι το κύριο μονοπάτι το οποίο μεταφέρει ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες στα λυσοσώματα, αφού προηγηθεί η δέσμευσή του προς αποικοδόμηση υποστρώματος στο αυτοφαγόσωμα (autophagosome). Η μικροαυτοφαγία πρόκειται για τη διαδικασία κατά την οποία τα λυσοσώματα διασπούν απευθείας μικρά κυτοσολικά υποστρώματα. Τέλος, η CMA απαιτεί την αναγνώριση του υποστρώματος από την HSP70 (Kaushik & Cuervo, 2012).

Το πρωταρχικό στάδιο της αυτοφαγίας (έναρξη) είναι ο σχηματισμός μιας δομής διπλής μεμβράνης σε σχήμα κυπέλλου, που ονομάζεται φαγοφόρο. Η βιογένεση του φαγοφόρου σηματοδοτείται από την κινάση ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1). Η ενεργοποίηση της ULK1 ρυθμίζεται από τον παράγοντα mTORC1 (mammalian target of rapamycin) υπό συνθήκες πείνας και από την κινάση AMP (AMPK) υπό συνθήκες χαμηλών επιπέδων ενέργειας. Τόσο ο mTORC1 όσο και η AMPK φωσφορυλιώνουν απευθείας την ULK1 (Kim *et al*, 2011). Υπό φυσιολογικές συνθήκες φωσφορυλίωση της ULK1 από τον παράγοντα mTORC1 οδηγεί σε ανενεργή μορφή της, ενώ αναστολή του mTORC1 ωθεί την ενεργοποίηση του συμπλόκου ULK1. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου ULK1, το οποίο αποτελείται από την κινάση ULK1 ή την κινάση ULK2 και ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι ATG13 (Autophagy-related

protein 13), FIP200 (FAK family–interacting protein of 200 kD) και ATG101 (Autophagy-related protein 101), πυροδοτεί την ενεργοποίηση του συμπλόκου PI3K (Phosphoinositide 3-kinases). Το σύμπλοκο PI3K σχηματίζεται από την Beclin1, την VPS34, VPS15/p150, και την ATG14L1 (autophagy-related gene 14) και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του συμπλόκου PI3P στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγώντας στον σχηματισμό μίας μεμβρανικής δομής που ονομάζεται ωμεγάσωμα (omegasome) (Axe *et al*, 2008). Ακολουθώντας, το PI3P διευκολύνει τη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών απαραίτητων για την αυτοφαγία όπως οι DFCP1 (double FYVE domain–containing protein 1) και WIPIs (WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides). Οι παράγοντες WIPIs συμμετέχουν στη στρατολόγηση του συστήματος σύζευξης ATG16L1–ATG5–ATG12 στην PI3P-θετική μεμβράνη, οδηγώντας στη λιπιδίωση της πρωτεΐνης LC3. Η λιπιδίωση της LC3 προωθεί την ωρίμανση του ωμεγασώματος σε αυτοφαγοφόρο (autophagosome) (Shen & Mizushima, 2014). Το ώριμο αυτοφαγόσωμα συντήκεται με το λυσόσωμα, δημιουργώντας το αυτολυσόσωμα. Υπεύθυνες για αυτή τη διαδικασία είναι η GTPάση Rab7 και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες LAMP-1 και LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein 1 and 2) (εικόνα A4).



Εικόνα A4. Μηχανισμός αυτοφαγίας. Ενεργοποίηση της κινάσης ULK από την κινάση AMPK ή την αναστολή του mTORC1, η οποία δίνει το έναυσμα για τον σχηματισμό του φαγοφόρου. Το αυτοφαγοφόρο ωριμάζει σε αυτοφαγόσωμα μέσω της στρατολόγησης ATG πρωτεϊνών και ακολουθεί σύντηξη με το λυσόσωμα. Μετά τη σύντηξη το φορτίο του αυτολυσοσώματος αποικοδομείται και τα συστατικά απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα.

Τροποποιημένο από Finnegan R. *et al.*, Cancers (Basel), 2022, 14(17):4289

Το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS)

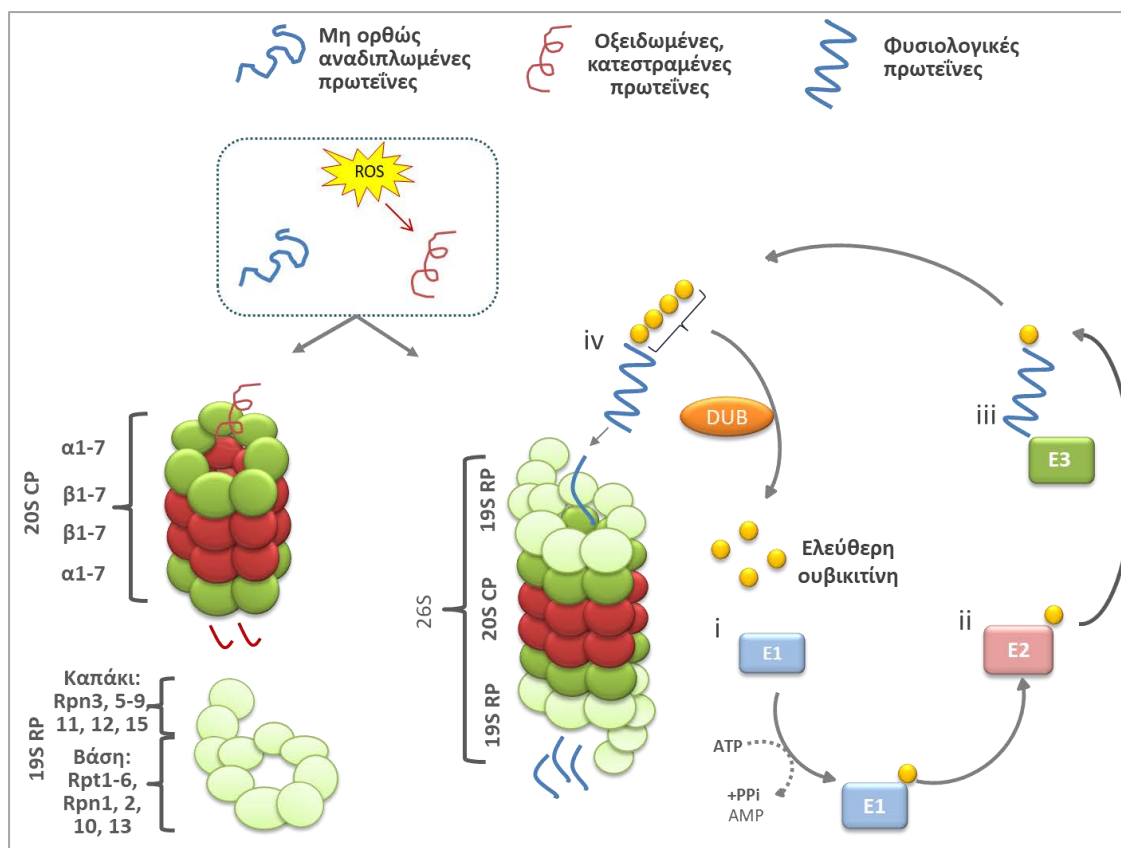
Το σύστημα UPS αποτελεί έναν από τους κύριους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Κεντρικός παίκτης του συστήματος αυτού είναι το πρωτεάσωμα. Το

πρωτεάσωμα είναι ένα πολυενζυμικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο με πολλαπλά καταλυτικά κέντρα και είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση τόσο φυσιολογικών πρωτεϊνών με μικρή διάρκεια ζωής όσο και μη λειτουργικών, οξειδωμένων ή με οποιονδήποτε άλλο τρόπο κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Ciechanover & Kwon, 2015; Schmidt & Finley, 2014; Davies, 2001). Η αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση, στη διαφοροποίηση, στην απόκριση στο στρες, σε ανοσολογικές αποκρίσεις και στον μεταβολισμό. Οι δύο κύριες μορφές του πρωτεασώματος είναι τα σύμπλοκα 20S και 26S/30S, ενώ στο σύστημα του πρωτεασώματος περιλαμβάνονται δύο ειδών πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, ο ATP-ανεξάρτητος (που πραγματοποιείται από το 20S πρωτεάσωμα) και ο ATP-εξαρτώμενος (που πραγματοποιείται από το 26S/30S πρωτεάσωμα). Καθώς το πρωτεάσωμα είναι ο κύριος μηχανισμός του ΔΠ που μελετάται στη συγκεκριμένη διατριβή, ακολουθεί αναλυτική περιγραφή της δομής, του μηχανισμού δράσης, τη ρύθμισης αλλά και της συμβολής του στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες πρωτεϊνοπάθειες.

A.2.4. Το πρωτεάσωμα

A.2.4.1. Το 20S πρωτεάσωμα

Το 20S σύμπλοκο ή αλλιώς 20S πυρήνας (Core Particle - 20S CP), είναι το σύμπλοκο στο οποίο βρίσκονται οι καταλυτικές ενεργότητες του πολυενζύμου, ενώ διάφοροι ρυθμιστές μπορούν να προσδεθούν είτε στο ένα είτε και στα δύο άκρα του δημιουργώντας κατά αυτόν τον τρόπο νέες υπερδομές του πρωτεασώματος. Η δομή του 20S πρωτεασώματος μοιάζει με βαρέλι που αποτελείται από 28 υπομονάδες, 14 τύπου α και 14 τύπου β, διατεταγμένες σε τέσσερις επταμελείς δακτυλίους με μοριακό βάρος 700 kDa και διάμετρο 120-160 Å (**εικόνα A5**). Οι υπομονάδες τύπου α σχηματίζουν τους δύο εξωτερικούς δακτυλίους και δημιουργούν ένα άνοιγμα μέσω του οποίου το πρωτεϊνικό υπόστρωμα εισέρχεται προκειμένου να φτάσει στα τρία καταλυτικά κέντρα που βρίσκονται στους εσωτερικούς β δακτυλίους. Οι υπομονάδες β1, β2 και β5 αποτελούν τα τρία καταλυτικά κέντρα και διαθέτουν ενεργότητα κασπάσης (caspase like, C-L), τρυψίνης (trypsin like, T-L) και χυμοθρυψίνης (chymotrypsin like, CT-L), αντίστοιχα.



Εικόνα Α5. Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Αποικοδόμηση των φυσιολογικών, των λάθος αναδιπλωμένων και των οξειδωμένων/κατεστραμμένων πρωτεϊνών μέσω του 26S και 20S πρωτεασώματος με ATP-εξαρτώμενο και ATP-ανεξάρτητο τρόπο, αντίστοιχα.

Δόμηση (assembly)

Η δόμηση του 20S πρωτεασώματος στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι απόλυτα ρυθμιζόμενη. Η δόμηση ξεκινάει με τον σχηματισμό του α -δακτυλίου ο οποίος χρησιμεύει ως μήτρα πάνω στην οποία ενσωματώνονται οι β -υπομονάδες. Η διαδικασία της σύνθεσης απαιτεί τη συμμετοχή μοριακών συνοδών. Πιο συγκεκριμένα, έχουν απομονωθεί τέσσερις διαφορετικοί μοριακοί συνοδοί συναρμολόγησης του πρωτεασώματος, οι PAC1-PAC4 (proteasome assembly chaperone 1-4) ή Pba1-4 (proteasome chaperone 1-4) στη ζύμη και ο παράγοντας ωρίμανσης του πρωτεασώματος Ump1 (ubiquitin-mediated proteolysis 1) στη ζύμη στην οποία αρχικά ταυτοποιήθηκε ή POMP (proteasome maturation protein) στα ανώτερα ευκαρυωτικά (Hirano *et al*, 2005; Witt *et al*, 2000; Schnell *et al*, 2021). Το ετεροδιμερές PCA1-PCA2 είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του α -δακτυλίου, ενώ το ετεροδιμερές PCA3-PCA4 βοηθά στην ενσωμάτωση του προ-πεπτιδίου β 2, η οποία ακολουθείται από την ενσωμάτωση των β 3, β 4, προ- β 5, προ- β 6, προ- β 1 και προ- β 7 υπομονάδων (Hirano *et al*, 2008). Το PCA3-PCA4 αποκόπτεται με την είσοδο της υπομονάδας β 4 και του παράγοντα POMP στο σύμπλοκο. Ο POMP έχει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση της προ- β 5 υπομονάδας. Κατά τον διμερισμό των προ-συμπλόκων και συνεπώς κατά τον τελικό σχηματισμό του 20S, οι υπομονάδες β 1, β 2 και β 5 ενεργοποιούνται αποκόπτοντας τα προ-πεπτιδία και ο POMP αποτελεί το πρώτο υπόστρωμα του νεοσυντηθέμενου 20S πρωτεασώματος (Gu & Enenkel, 2014).

Εντοπισμός

Τα ενδοκυτταρικά πρωτεασώματα εντοπίζονται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο και μπορεί να αποτελούν περίπου έως και το 5% της συνολικής πρωτεϊνικής περιεκτικότητας του κυττάρου ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Marguerat *et al*, 2012). Ωστόσο, η ικανότητα σύνδεσης του 20S πρωτεασώματος με την πλασματική μεμβράνη προτείνει την ενδεχόμενη απελευθέρωσή του στον εξωκυττάριο χώρο. Ενεργές μορφές του πρωτεασώματος (κυκλοφορούντα πρωτεασώματα -circulating proteasomes) έχουν εντοπιστεί σε πλάσμα τόσο υγιών ανθρώπων όσο και σε πλάσμα ασθενών που πάσχουν από διάφορες μορφές κακοηθειών, αυτοάνοσων νοσημάτων, σηπτικών ασθενών και τραυματιών (Dwivedi *et al*, 2021).

A.2.4.2. Το 26S πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα 26S/30S (στο εξής θα αναφέρεται ως πρωτεάσωμα 26S) σχηματίζεται μετά την πρόσδεση του ενός συμπλόκου 19S (PA700) στο ένα (26S) ή στα δύο (30S) άκρα του συμπλόκου 20S. Το 19S σύμπλοκο (regulatory particle- 19S RP) είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των συμπερικιτυλιωμένων υποστρωμάτων, την αποδιάταξη και την προώθησή τους στην πρωτεολυτική κοιλότητα του 20S. Το 19S υποδιαιρείται σε δύο μικρότερα συμπλέγματα, τη βάση (base) και το καπάκι (lid) (Tomko & Hochstrasser, 2013). Η βάση αποτελείται από έξι AAA-ATPάσες (Rpt1-6) και τρεις μη-ATPάσες τις Rpn1, Rpn2, Rpn10 και Rpn13. Οι ATPάσες είναι υπεύθυνες για την αποδιάταξη του πρωτεϊνικού υποστρώματος, τη διάνοιξη του πόρου του 20S συμπλόκου και μετατόπιση της αποδιαταγμένης πρωτεΐνης προς την εσωτερική πρωτεολυτική κοιλότητα του πρωτεασώματος. Οι Rpn1 και Rpn2 μαζί με τις ATPάσες είναι απαραίτητες για τη μετατόπιση του πρωτεϊνικού υποστρώματος, ενώ η Rpn13 μαζί με την Rpn10 λειτουργούν ως υποδοχείς συμπεικιτίνης αναγνωρίζοντας έτσι το υπόστρωμα. Επιπλέον, η Rpn10 σταθεροποιεί τη σύνδεση την βάσης με το καπάκι. Το καπάκι αποτελείται από 9 υπομονάδες, τις Rpn3, 5–9, 11, 12 και 15 (πίνακας A1).

A.2.4.3. Μηχανισμός δράσης του 20S και 26S πρωτεασώματος

Ο μηχανισμός δράσης του 26S πρωτεασώματος είναι ATP-εξαρτώμενος. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση σημαίνονται με αλυσίδες συμπεικιτίνης. Η συμπεικιτίνη είναι μία συντηρημένη πρωτεΐνη που τροποποιεί και σημαίνει πρωτεΐνες μέσω της διαδικασίας της συμπεικιτινυλίωσης, η οποία περιλαμβάνει τρία στάδια: 1) το ένζυμο ενεργοποίησης της συμπεικιτίνης E1 ενεργοποιεί την συμπεικιτίνη η οποία μεταφέρεται στο ένζυμο σύζευξης της συμπεικιτίνης E2, 2) στη συνέχεια, το E2 που φέρει την συμπεικιτίνη συνδέεται με το ένζυμο λιγάσης της συμπεικιτίνης E3 το οποίο καταλύει το τελικό στάδιο της συμπεικιτινυλίωσης και, 3) η E3 μεταφέρει την συμπεικιτίνη στο υπόστρωμα και το υπόστρωμα γίνεται πλέον ορατό στο πρωτεάσωμα. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται οδηγώντας στην πολυ-συμπεικιτινυλίωση της πρωτεΐνης στόχου, η οποία με τη σειρά της αναγνωρίζεται και αποικοδομείται από το 26S, αφού πρώτα γίνει αποδέσμευση των μορίων συμπεικιτίνης μέσω των πρωτεασών συμπεικιτίνης. Τα μόρια συμπεικιτίνης που απελευθερώνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκ νέου για τη σήμανση άλλων υποστρωμάτων (Ciechanover & Stanhill, 2014). Στόχοι του 26S είναι κυρίως φυσιολογικές προς αποικοδόμηση πρωτεΐνες οι οποίες έχουν σημανθεί με συμπεικιτίνη, ωστόσο δύναται να αποικοδομήσει

και μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες με συμπικτινο-ανεξάρτητο τρόπο (εικόνα A5) (Erales & Coffino, 2014).

Αντίθετα με το 26S, το 20S δεν απαιτεί τη σήμανση των υποστρωμάτων του με ουμπικιτίνη και δρα απευθείας στους στόχους του, αν και έχει αναφερθεί και η ικανότητα του να αποικοδομεί ουμπικιτινυλιωμένα υποστρώματα (Sahu *et al*, 2021). Στόχοι του 20S αποτελούν οι οξειδωμένες και λάθος αναδιπλούμενες πρωτεΐνες. Το πρωτεάσωμα 20S υπάρχει κυρίως στη κλειστή πύλη (closed gate)/λανθάνουσα διαμόρφωση (latent form) στην οποία η πρόσβαση στον καταλυτική κοιλότητα αποφράσσεται καθώς καλύπτεται από το N-τελικό άκρο της $\alpha 3$ υπομονάδας (Tanaka *et al*, 1988). Η πρωτεόλυση μέσω του 20S, θεωρείται πως περιλαμβάνει την άμεση αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την $\alpha 3$ υπομονάδα, η οποία οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσής της και σε επακόλουθη αποικοδόμηση του στόχου. Ρυθμιστικά σύμπλοκα όπως το σύμπλοκο 11S (PA28) και το Bim10 (PA200) μπορούν αναστρέψιμα να συνδεθούν με το 20S, δημιουργώντας μία διαμόρφωση ανοιχτής πύλης η οποία προωθεί την πρωτεόλυση (Stadtmueller & Hill, 2011; Sadre-Bazzaz *et al*, 2010).

Πίνακας A1. Ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες πρωτεασώματος 26S/30S και 20S

20S				19S			
α υπομονάδες	Γονίδιο	β υπομονάδες	Γονίδιο	Υπομονάδες βάσης	Gene	Υπομονάδες καπακίου	Γονίδιο
$\alpha 6$	PSMA1	$\beta 1$	PSMB6	Rpt1	PSMC2	Rpn3	PSMD3
$\alpha 2$	PSMA2	$\beta 2$	PSMB7	Rpt2	PSMC1	Rpn5	PSMD12
$\alpha 7$	PSMA3	$\beta 3$	PSMB3	Rpt3	PSMC4	Rpn6	PSMD11
$\alpha 3$	PSMA4	$\beta 4$	PSMB2	Rpt4	PSMC6	Rpn7	PSMD6
$\alpha 5$	PSMA5	$\beta 5$	PSMB5	Rpt5	PSMC3	Rpn8	PSMD7
$\alpha 1$	PSMA6	$\beta 6$	PSMB1	Rpt6	PSMC5	Rpn9	PSMD13
$\alpha 4$	PSMA7	$\beta 7$	PSMB4	Rpn1	PSMD2	Rpn11	PSMD14
				Rpn2	PSMD1	Rpn12	PSMD8
				Rpn10	PSMD4	Rpn15	SEM1
				Rpn13	ADRM1		

A.2.4.4. Άλλες μορφές του πρωτεασώματος

Ανοσοπρωτεάσωμα

Κατά τη διέγερση μέσω της γ -ιντερφερόνης (INF- γ), η συνεχής έκφραση των καταλυτικών υπομονάδων $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ αντικαθίσταται από την έκφραση των υπομονάδων $\beta 1i$, $\beta 2i$ και $\beta 5i$ δημιουργώντας έτσι το ανοσοπρωτεάσωμα i20S (Murata *et al*, 2018). Το ανοσοπρωτεάσωμα παρουσιάζει αυξημένη ενεργότητα CT-L και μειωμένη ενεργότητα C-L και είναι πιο αποδοτικό στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων (πεπτίδια που είναι πιο κατάλληλα για την MHC-τάξης I παρουσίαση). Το ανοσοπρωτεάσωμα, φαίνεται να εμπλέκεται και σε διαδικασίες που δεν σχετίζονται με την αντιγονοπαρουσίαση. Παρόλο που το ανοσοπρωτεάσωμα εκφράζεται σταθερά στα κύτταρα του ανοποιητικού συστήματος, εντοπίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Η έκφραση του ανοσοπρωτεασώματος ενισχύεται

σε συνθήκες έκθεσης των κυττάρων σε οξειδωτικούς παράγοντες προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση (Pickering *et al*, 2010).

Οι ενεργότητες του ανοσοπρωτεασώματος μπορούν να τροποποιηθούν μέσω της σύνδεσης διαφόρων ενεργοποιητών όπως το RP αλλά και το σύμπλοκο 11S (γνωστό και ως PA28/REG/PA26). Το σύμπλοκο 11S συναντάται σε τρεις ισομορφές, τις PA28α, β, και γ, και μέσω της INF-γ επάγει την αποικοδόμηση μικρών πεπτιδίων με ATP-ανεξάρτητο τρόπο (Rechsteiner & Hill, 2005).

Υβριδικά πρωτεασώματα

Το 1998 περιεγράφηκαν για πρώτη φορά τα υβριδικά πρωτεασώματα. Πρόκειται για τις δομές που προκύπτουν από την πρόσδεση ενός 19S συμπλόκου στο ένα άκρο του 20S και ενός 11S ή PA200 στο άλλο άκρο (Hendil *et al*, 1998; Ustrell *et al*, 2002). Η έκφραση του συμπλόκου 11S έχει δείχθει πως επάγεται από την ιντερφερόνη γ ενώ το σύμπλοκο PA200 έχει δείχθει πως έχει ρόλο στη σπερματογένεση, ως απόκριση στην επιδιόρθωση του DNA και στη διατήρηση της μιτοχονδριακής κληρονομικότητας (Wang & Maldonado, 2006; Savulescu & Glickman, 2011).

Το θυμοπρωτεάσωμα

Το θυμοπρωτεάσωμα άρχισε να περιγράφεται το 2007, όταν απομονώθηκε η υπομονάδα β5t από θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ποντικού (Murata *et al*, 2007). Στη συνέχεια, μία παρόμοια υπομονάδα με θυμοειδική έκφραση επίσης αποκαλύφθηκε και στον άνθρωπο (Tomaru *et al*, 2009). Πιο συγκεκριμένα, η υπομονάδα β5i αντικαθίσταται από την υπομονάδα β5t στον συγκεκριμένο ιστό, δημιουργώντας έτσι το θυμοπρωτεάσωμα. Το θυμοπρωτεάσωμα περιλαμβάνει τις υπομονάδες β1i, β2i και β5t, αλλά σε αντίθεση με την υπομονάδα β5i, η υπομονάδα β5t οδηγεί σε μείωση της CT-L ενεργότητας, ένα χαρακτηριστικό που αποδείχθηκε απαραίτητο για τη θετική επιλογή των αναπτυσσόμενων θυμοκυττάρων στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (Murata *et al*, 2007; Xing *et al*, 2013).

A.2.4.5. Η ρύθμιση του πρωτεασώματος

Η ενεργότητα του πρωτεασώματος υπόκειται σε ακριβείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς προκειμένου να διασφαλιστεί η εξειδικευμένη δράση του και όχι η γενικευμένη πρωτεόλυση στο κύτταρο. Πρωταρχικό επίπεδο ρύθμισης αποτελεί η ίδια η δομή του πρωτεασώματος όπου τα ενεργά του κέντρα εσωκλείονται από τους α-δακτυλίους μειώνοντας έτσι την πιθανότητα μη ειδικής εισαγωγής υποστρώματος στο εσωτερικό του συμπλόκου. Ένα ακόμα επίπεδο ρύθμισης αποτελεί η αντικατάσταση των ενεργών υπομονάδων β1, β2 και β5 με τις υπομονάδες β1i, β2i και β5i ή τη β5t, υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Τέλος, η ενεργότητα του πρωτεασώματος μπορεί να ρυθμιστεί μέσω γενετικών χειρισμών ή μεταγραφικής ρύθμισης, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των υπομονάδων του αλλά μέσω μεταβολών της διαμόρφωσης της δομής του 20S (Chondrogianni *et al*, 2015b; Njomen & Tepe, 2019).

Γενετικοί χειρισμοί

Ενεργοποίηση της ρύθμισης τους πρωτεασώματος μέσω της υπερέκφρασης των υπομονάδων του. Η πρώτη προσπάθεια ρύθμισης του πρωτεασώματος μέσω

υπερέκφρασης των υπομονάδων του παρουσιάζεται σε λεμφοβλάστες και HeLa κύτταρα όπου η υπερέκφραση της β5i υπομονάδας οδηγεί σε αύξηση της CT-L ενεργότητας και η υπερέκφραση της β1i ενισχύει την T-L ενεργότητα (Gaczynska *et al*, 1996). Ακολούθως, μία μεγαλύτερη σε βάθος μελέτη από την ομάδα μας, έδειξε πως σταθερή υπερέκφραση του πρωτεασώματος σε ανθρώπινους πρωτογενείς ινοβλάστες οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των υπόλοιπων β υπομονάδων και τελικά, των επιπέδων δόμησης του πρωτεασώματος με την επακόλουθη ενίσχυση και των τριών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων. Επιπλέον, η υπερέκφραση της β5 υπομονάδας ενισχύει την προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες μέσω της αποικοδόμησης των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Chondrogianni *et al*, 2005). Υπερέκφραση της *pbs-5* (ορθόλογο της β5) υπομονάδας στον *C. elegans* οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων, προωθεί τη συναρμολόγησή του και ενισχύει την CT-L ενεργότητα (Chondrogianni *et al*, 2015a). Πιο πρόσφατα, παρόμοια αποτελέσματα ενίσχυσης της λειτουργίας του πρωτεασώματος προέκυψαν από την υπερέκφραση των ορθολόγων/ομολόγων της β5 υπομονάδας στη *Drosophila* (*Prosβ5*) και σε ποντίκι (PSMB5) (Nguyen *et al*, 2019; Chocron *et al*, 2022). Τέλος, παρόμοιος φαινότυπος έχει παρατηρηθεί από την υπερέκφραση της *rpn-6* υπομονάδας στον *C. elegans* (Vilchez *et al*, 2012).

Μεταγραφική ρύθμιση. Ο παράγοντας Nrf2 [Nuclear factor (erythroid-derived 2-like 2)] είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων και είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική απόκριση του κυττάρου σε οξειδωτικούς στρεσογόνους παράγοντες (Nguyen *et al*, 2004). Κύριος ρυθμιστής του Nrf2 είναι η πρωτεΐνη Keap1 η οποία διατηρεί τον Nrf2 στο κυτταρόπλασμα και μεσολαβεί στην πρωτεασωμική του αποικοδόμηση (Furukawa & Xiong, 2005). Σε συνθήκες στρες, η διαμόρφωση της Keap1 τροποποιείται με αποτέλεσμα την αναστολή του μηχανισμού αποικοδόμησης του Nrf2 από το πρωτεάσωμα, επιτρέποντας στον νεοσυντιθέμενο Nrf2 να εισέλθει στον πυρήνα και να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων στόχων (Baird *et al*, 2013). Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω της υπερέκφρασης της *pbs-5* υπομονάδας στον *C. elegans* (όπως περιγράφηκε νωρίτερα) φαίνεται να εξαρτάται έως ένα βαθμό από τον SKN-1 (ορθόλογο του Nrf2) μεταγραφικό παράγοντα (Chondrogianni *et al*, 2015a). Ένας αριθμός μελετών αναφέρει την υπερέκφραση του πρωτεασώματος μέσω μικρομοριακών ενεργοποιητών του Nrf2. Επίδραση του D3T (3H-1,2-dithiole-3-thione) σε ινοβλάστες φαίνεται να συμβάλλει στη θετική ρύθμιση των υπομονάδων του 20S και 19S μέσω του Nrf2 (Kwak *et al*, 2003). Το τριτερπενοειδές, 18α-γλυκυρκετινικό οξύ (18α-GA), έχει επίσης δειχθεί ότι ενισχύει τη θετική ρύθμιση των πρωτεασωμικών υπομονάδων και της ενεργότητας του πρωτεασώματος μέσω του Nrf2 καθυστερώντας την αναδιπλασιαστική γήρανση ανθρώπινων ινοβλαστών (Kapeta *et al*, 2010). Τέλος, ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας έχει επίσης επιτευχθεί μέσω της ενεργοποίησης του Nrf2 από το πρόσθετο τροφίμων t-BHQ (tert-butylhydroquinone) και τη σουλφοραφάνη (Jang *et al*, 2014; Panagiotidou & Chondrogianni, 2020).

Στη ζύμη ο μεταγραφικός παράγοντας Rpn4 ρυθμίζει την έκφραση πρωτεασωμικών γονιδίων και έχει δειχθεί πως παίζει ρόλο στην απόκριση

στρεσογόνων συνθηκών μέσω του ελέγχου της λειτουργίας του πρωτεασώματος (Mannhaupt *et al*, 1999; Schmidt *et al*, 2019).

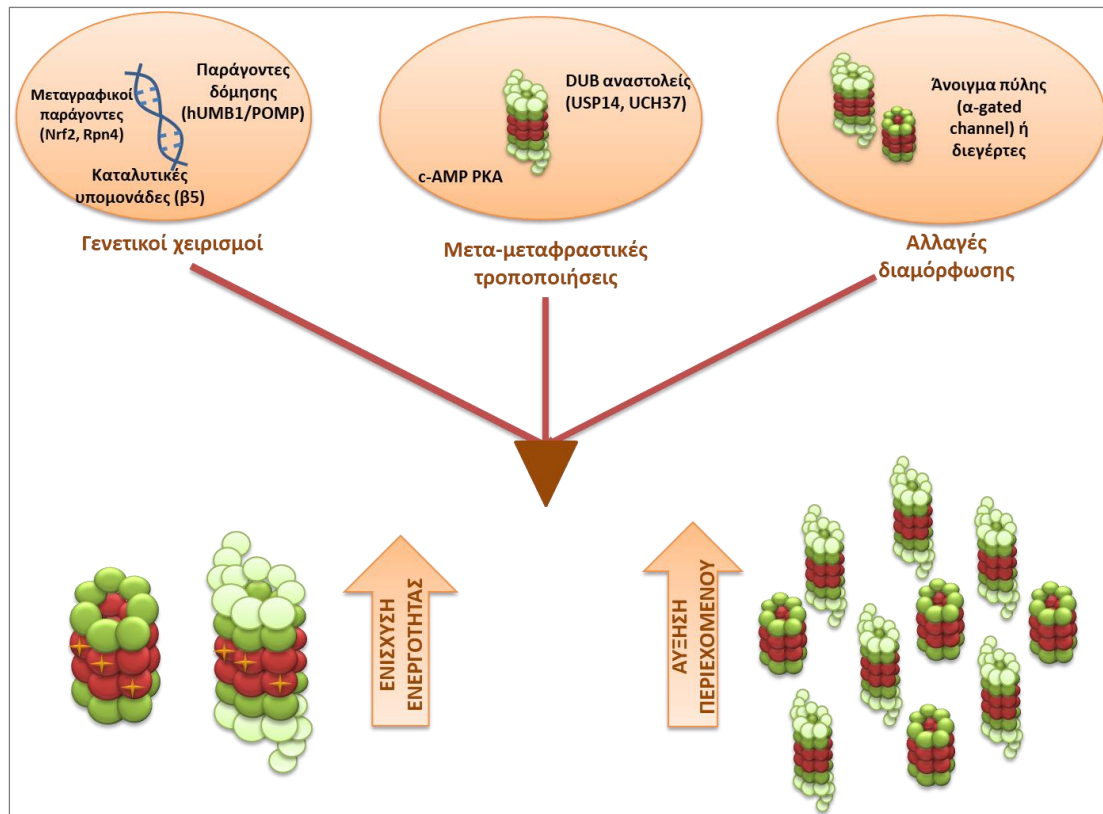
Τροποποιήσεις της διαμόρφωσης της δομής του 20S

Το 20S πρωτεάσωμα εντοπίζεται κυρίως στη λανθάνουσα διαμόρφωση κατά την οποία η είσοδος στον καταλυτική κοιλότητα αποφράσσεται από το N-τελικό άκρο των α-υπομονάδων δημιουργώντας ένα κλειστό κανάλι (Förster *et al*, 2003). Συνεπώς, η διευκόλυνση της προσβασιμότητας των πρωτεϊνών μέσω ανοίγματος των κλειστών αυτών καναλιών αποτελεί στόχο για την αύξηση των επιπέδων αποικοδόμησης τους. Απάλειψη του N-τελικού της α3 υπομονάδας οδηγεί στη δημιουργία πρωτεασώματος α3ΔN με διαμόρφωση ανοιχτής πύλης και αύξηση της αποικοδόμησης ενός μεγάλου αριθμού υποστρωμάτων (Choi *et al*, 2016).

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Μικρομοριακές ρυθμιστικές κινάσες. Το 26S πρωτεάσωμα υφίσταται αναστρέψιμη φωσφορυλίωση σε απόκριση μεταβολών της φυσιολογικής κατάστασης του κυττάρου (Guo *et al*, 2017). Η φωσφορυλίωση του 26S φαίνεται να εξυπηρετεί στη δόμηση, στη σταθεροποίηση και στην ενεργότητά του. Παράδειγμα αποτελεί το οσμωτικό στρες κατά το οποίο αναστέλλεται η ενεργότητα του πρωτεασώματος μέσω φωσφορυλίωσης της Rpn2 από την κινάση p38-MAPK (Lee *et al*, 2010b). Ρύθμιση της συγκρότησης του 26S και της ενεργότητας του πρωτεασώματος έχει αναφερθεί και από την cAMP-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της Rpt6 υπομονάδας. Τέλος, η φωσφορυλίωση της Rpn6 υπομονάδας μέσω της κινάσης PKA (protein kinase A) έχει δείχθει πως ενισχύει την αποικοδόμηση των συμπικτινιλυμένων πρωτεϊνών και των επιρρεπών προς συσσωμάτωση πρωτεϊνών, όπως της πρωτεΐνης tau (Lokireddy *et al*, 2015).

Αναστολείς των πρωτεασών ουμπικιτίνης. Οι πρωτεάσες ουμπικιτίνης αποδεσμεύουν τις αλυσίδες ουμπικιτίνης από τα πρωτεϊνικά υποστρώματα που έχουν σημανθεί προς αποικοδόμηση, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν εκ νέου για τη σήμανση νέων, προς αποικοδόμηση υποστρωμάτων. Η USP14 (Ubiquitin-specific protease 14) είναι μία πρωτεάση ουμπικιτίνης και φαίνεται πως κατά τη δράση της αναστέλλεται η αποικοδόμηση του υποστρώματος από το πρωτεάσωμα. Έχει παρατηρηθεί πως αναστολή της USP14 μέσω του ειδικού αναστολέα IU1 (USP14 inhibitor 1) ενισχύει την αποικοδόμηση διάφορων πρωτεασωμικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων οξειδωμένων πρωτεϊνών και της πρωτεΐνης tau (Lee *et al*, 2010a).



Εικόνα Α6. Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και ενίσχυση της δόμησης και του περιεχομένου του μπορεί να προκύψει μέσω γενετικών χειρισμών, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και αλλαγών στη διαμόρφωσή του. Επιπλέον, φυσικές ή συνθετικές ουσίες μπορούν να ρυθμίσουν την ενεργότητα του πρωτεασώματος είτε άμεσα ως διεγέρτες του είτε έμμεσα μέσω άλλων μορίων.

Α.2.4.6. Το πρωτεάσωμα στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες πρωτεϊνοπάθειες

Γήρανση

Ένα πλήθος μελετών υποστηρίζει πως η δράση και/ή η έκφραση του πρωτεασώματος εξασθενούν κατά τη γήρανση *in vitro* και *in vivo*. Συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης αλλά και μεταβολές των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των υπομονάδων του, αποδόμηση του 26S σε 20S και 19S αλλά και συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και συσσωματωμάτων τα οποία μπορεί να "φράξουν" το πρωτεάσωμα οδηγώντας σε μειωμένη λειτουργικότητα (Vilchez *et al*, 2014; Chondrogianni *et al*, 2014). Σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες η αναστολή του πρωτεασώματος φαίνεται να οδηγεί μη αναστρέψιμα σε γηρασμένο φαινότυπο (Chondrogianni *et al*, 2003; Chondrogianni & Gonos, 2004). Μείωση της λειτουργικότητας του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση έχει παρατηρηθεί σε διάφορους ιστούς θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, των σκελετικών μυών, της επιδερμίδας, του λιπώδους ιστού, του αμφιβληστροειδούς, του πνεύμονα, των μυών, της καρδιάς, του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, του

ιππόκαμπου και του φλοιού (Vilchez *et al*, 2014). Στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, υπερέκφραση του παράγοντα ωρίμανσης του πρωτεασώματος Upr1, οδηγεί σε αύξηση της CT-L ενεργότητας και επέκταση του προσδόκιμου ζωής του (Chen *et al*, 2006). Διαταραχές στη δόμηση του 26S πρωτεασώματος έχουν βρεθεί σε δείγματα γηρασμένων εγκεφάλων του ψαριού *Nothobranchius furzeri* και σε γηρασμένες μύγες (*D. melanogaster*) (Kelmer Sacramento *et al*, 2020; Vernace *et al*, 2007). Υπερέκφραση της β5 υπομονάδας στη *D. melanogaster* (Prosβ5) και στον *C. elegans* (*pbs-5*) ενισχύει την CT-L πρωτεασωμική ενεργότητα και οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Nguyen *et al*, 2019; Chondrogianni *et al*, 2015a). Παρόμοια αποτελέσματα στον *C. elegans* έχουν παρατηρηθεί και κατά την υπερέκφραση της *rpn-6* υπομονάδας καθώς επίσης και σε διαγονιδιακό μοντέλο με διαμόρφωση ανοιχτής πύλης του πρωτεασώματος ($\alpha 3\Delta N$) (Vilchez *et al*, 2012; Anderson *et al*, 2022). Μειωμένη CT-L ενεργότητα στο ποντίκι έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση γηρασμένου φαινοτύπου (Tomaru *et al*, 2012). Ο γυμνός τυφλοπόντικας *Heterocephalus glaber*, το μακροβιότερο τρωκτικό, παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα CT-L και C-L πρωτεασωμικών ενεργοτήτων συγκριτικά με ένα “συνηθισμένο” τρωκτικό (Rodriguez *et al*, 2012). Παρομοίως, μελέτες του πρωτεασώματος σε καλλιέργειες ινοβλαστών υγιών αιωνόβιων ανθρώπων αποκάλυψαν πως η λειτουργία του πρωτεασώματος παρέμεινε αναλλοίωτη σε σύγκριση με τις καλλιέργειες μη αιωνόβιων δοτών, τονίζοντας τον ιδιαίτερο ρόλο του πρωτεασώματος στη γήρανση (Chondrogianni *et al*, 2000).

Ηλικιοεξαρτώμενες πρωτεϊνοπάθειες

Η σύνδεση μεταξύ του UPS και της AD προτάθηκε όταν οι αμυλοειδικές πλάκες βρέθηκαν θετικές σε χρώση για ουμπικιτίνη ενώ ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα της UBB+1 (Ubiquitin-B+1, μία μεταλλαγμένη μορφή της ουμπικιτίνης) τόσο στη σποραδική όσο και στην οικογενή AD (Perry *et al*, 1987; van Leeuwen *et al*, 2006). Η υπόθεση της σύνδεσης μεταξύ UPS και της AD ενισχύθηκε από την παρατήρηση μειωμένων επιπέδων ενεργότητας του πρωτεασώματος σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου ασθενών με AD (Keller *et al*, 2000). Η μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε ποντίκια μοντέλα για την AD συμβάλλει στην ανεπάρκεια των συνάψεων και στη μνήμη (Ribeiro *et al*, 2023). Επιπλέον, στην AD, λιγότερες της ουμπικιτίνης E3 όπως η parkin και η HRD1 αλλά και πρωτεάσες της ουμπικιτίνης όπως η UCHL-1 φαίνεται να υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση τονίζοντας την ανάγκη της αποκατάστασης της λειτουργία του UPS στη συγκεκριμένη νόσο (Lonskaya *et al*, 2013; Kaneko *et al*, 2012; Guglielmotto *et al*, 2017).

Οι μελέτες της σύνδεσης του UPS με την AD έχουν οδηγήσει στην παρατήρηση ενός φαύλου κύκλου όπου το παθολογικό πεπτιδίον Αβ, η πρωτεΐνη tau καθώς και η UBB+1 λειτουργούν ως αναστολείς της λειτουργίας του πρωτεασώματος, δυσκολεύοντας έτσι την αποικοδόμησή τους με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου και της tau (Keck *et al*, 2003; Tseng *et al*, 2008). Η ενδεχόμενη θεραπευτική προσέγγιση που στοχεύει στην ενίσχυση του πρωτεασώματος έναντι της AD περιλαμβάνει τόσο γενετικούς χειρισμούς όσο και τη χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών. Η ενεργοποίηση του 20S πρωτεασώματος μέσω της υπερέκφρασης της *pbs-5* υπομονάδας στο στέλεχος CL4176 *C. elegans* (ένα μοντέλο της AD με

θερμοεπαγόμενη έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς η οποία οδηγεί σε παράλυση του ζώου) οδήγησε σε καθυστέρηση του φαινοτύπου της παράλυσης και σε μείωση των ολιγομερών του Αβ πεπτιδίου (Chondrogianni *et al*, 2015a). Παρόμοια αποτελέσματα μείωσης των επιπέδων του Αβ πεπτιδίου και καθυστέρησης του φαινοτύπου παράλυσης του στελέχους CL4176, παρατηρήθηκαν και μέσω της υπερέκφρασης της AIP-1 υπομονάδας του 19S σε μοντέλο *C. elegans* για την AD (Hassan *et al*, 2009). Επιπλέον, ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω της υπερέκφρασης της β5 υπομονάδας σε στελέχη μοντέλα για την AD τόσο της δροσόφιλας (*Prosβ5*) όσο και ποντικού (PSMB5) βελτίωσαν τους σχετιζόμενους με την AD φαινοτύπους (Chocron *et al*, 2022). Τέλος, αρκετές φυσικές ουσίες όπως η κερσετίνη, το 18α-γλυκυρχετινικό οξύ, η ελαιοκανθάλη και το D3T έχουν μελετηθεί για τη θετική τους επίδραση στην ενεργότητα του πρωτεασώματος σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα για την AD (Panagiotidou & Chondrogianni, 2020).

A.3. Ο νηματώδης σκώληκας *C. elegans*

Ο *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) είναι ένας ελεύθερος, αβλαβής νηματώδης σκώληκας που τρέφεται με μικροοργανισμούς. Είναι ιδιαίτερα οικονομικό και εύκολο στη συντήρηση μοντέλο σε εργαστηριακό περιβάλλον και αποτελεί ένα εξαιρετικό οργανισμό-μοντέλο για μελέτες γήρανσης. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Sydney Brenner, στις αρχές της δεκαετίας του 1970, ως ένα νέο μοντέλο στο πεδίο της αναπτυξιακής βιολογίας. Η ευκολία της συντήρησής του στο εργαστήριο, το διαφανές του σώμα για ανατομική παρατήρηση με τη χρήση απλής μικροσκοπίας Nomarski/DIC (differential interference contrast), η υψηλή γενετική ομολογία (60–80%) με τον άνθρωπο, το πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμά του, οι συντηρημένες βιολογικές μοριακές αποκρίσεις, τα υψηλά ποσοστά γονιμότητας (~300 αυγά/σκουλήκι μέσα σε αρκετές ημέρες) και η δυνατότητα εφαρμογής τεχνικών πρόσθιας και ανάστροφης γενετικής ανάλυσης, καθιστούν τον *C. elegans* ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη παραγόντων και μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στην εξέλιξη της γήρανσης (Matsunami, 2018). Επιπλέον, η σύντομη διάρκεια ζωής του (~3 εβδομάδες) και το μικρό μέγεθος (~1 χιλιοστό), είναι ευνοϊκά για τη μελέτη ουσιών με εν δυνάμει αντιγηραντική δράση, λόγω του μειωμένου πειραματικού κόστους και της χρηστικότητάς του για πειράματα διαλογής υψηλής απόδοσης (Choi *et al*, 2015). Πολλές καινοτόμες ανακαλύψεις στον τομέα της έρευνας για τη γήρανση έχουν επιτευχθεί με τη χρήση του *C. elegans* λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων (David *et al*, 2010).

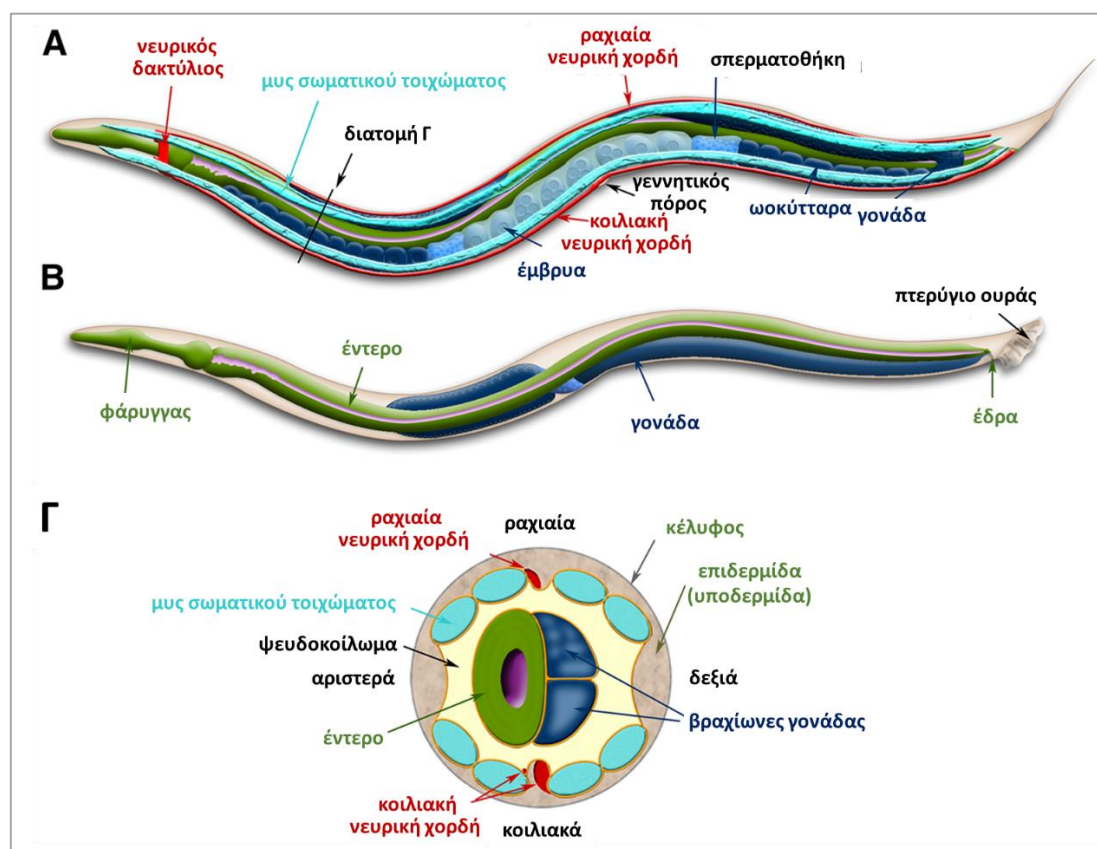
Η ανατομία του ενήλικου σκώληκα είναι απλή και αποτελείται από περίπου 1.000 σωματικά και 2.000 γαμετικά κύτταρα (ενότητα A.3.1). Ο καρυότυπος του συγκεκριμένου νηματώδους αποτελείται από 5 ζεύγη αυτοσωμικών και 2 φυλετικά χρωμοσώματα στα ερμαφρόδιτα ζώα (XX), ενώ τα αρσενικά διαθέτουν 5 ζεύγη αυτοσωμικών και ένα φυλετικό χρωμόσωμα (XO). Ο *C. elegans* είναι κυρίως ερμαφρόδιτος στη φύση, ενώ τα αρσενικά υπάρχουν μεταξύ των πληθυσμών ως αποτέλεσμα μη ορθού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Η ερμαφρόδιτη φύση του και η παρουσία αρσενικών ατόμων προσδίδουν στον *C. elegans* ένα σημαντικό πλεονέκτημα για γενετικές μελέτες. Μέσω της αυτοαναπαραγωγής είναι εύκολο να προκύψει ομοζυγωτία για μία μετάλλαξη, ενώ μέσω διασταυρώσεων των ερμαφρόδιτων με αρσενικά στελέχη διευκολύνεται η δημιουργία διπλά (ή πολλαπλά) μεταλλαγμένων στελεχών.

Η δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών μέσω της ένθεσης εξωγενούς DNA στον *C. elegans*, αποτελεί ένα σύνηθες εργαλείο για τη δημιουργία στελεχών με υπερέκφραση ή εκτοπική έκφραση (ectopic gene expression) του επιθυμητού γονιδίου. Το γονίδιο ενδιαφέροντος μπορεί να κλωνοποιηθεί κατάλληλα σε πλασμιδιακούς φορείς, ώστε η έκφρασή του να ελέγχεται από έναν ενδογενή υποκινητή, ο οποίος επιτρέπει την έκφραση είτε σε όλους (καθολικά) ή σε επιλεγμένους ιστούς (ιστοειδικά), ή ακόμα και σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο ή στάδιο ανάπτυξης. Το επιθυμητό γονίδιο μπορεί να συζευχθεί με έναν δείκτη (για παράδειγμα τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP ή mCherry), ο οποίος μπορεί να δώσει τη δυνατότητα ανάλυσης του εντοπισμού και της λειτουργίας των πρωτεϊνών (Chalfie *et al*, 1994; Mello & Fire, 1995). Η ένθεση του εξωγενούς DNA πραγματοποιείται με μικροέγχυση στη γονάδα του σκώληκα (εικόνα A7), όπου τελικά διατάσσεται σε μεγάλες εξωχρωμοσωμικές συστοιχίες DNA

που αποτελούνται από 50-300 αντίγραφα. Αυτή η τεχνική μετασχηματισμού οδηγεί σε ισχυρή υπερέκφραση των εισαγόμενων διαγονιδίων τα οποία κληρονομούνται με μη μεντελικό τρόπο στις επόμενες γενιές (Mello *et al*, 1991). Πρόσφατα, οι προσεγγίσεις δημιουργίας διαγονιδιακών στελεχών έχουν στραφεί στην χρήση του συστήματος CRISPR/CAS9, που επιτρέπει την εισαγωγή ενός αντιγράφου της επιθυμητής αλληλουχίας στοχευμένα σε μία οποιαδήποτε επιθυμητή περιοχή (Kim & Colaiáccono, 2019). Τέλος, ένα ακόμα σημαντικό εργαλείο αποτελεί η ανακάλυψη και η εφαρμογή του μηχανισμού μοριακής σιγής μέσω παρεμπόδισης RNA (RNA interference-RNAi), η οποία έφερε επανάσταση στη φαινοτυπική ανάλυση στον *C. elegans*. Η εφαρμογή του μηχανισμού μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω της διατροφής, και συγκεκριμένα μέσω της κατανάλωσης βακτηρίων *E. coli* που παράγουν δίκλωνο RNA (dsRNA) έναντι του στόχου ενδιαφέροντος, είτε μέσω εμβάπτισης των ατόμων *C. elegans* μέσα σε διάλυμα dsRNA, είτε μέσω απευθείας ένεσης του dsRNA στον σκώληκα (Timmons *et al*, 2001).

Στη συγκεκριμένη ενότητα, ακολουθεί σύντομη περιγραφή της ανατομίας του *C. elegans* και του κύκλου ζωής του, και εκθέτονται τα πλεονεκτήματά του ως μοντέλο για μελέτες γήρανσης και ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων με έμφαση στην AD. Τέλος, γίνεται μία ανασκόπηση στο πρωτεάσωμα του *C. elegans* και στη συμβολή του στη γήρανση αυτού του οργανισμού.

A.3.1. Η ανατομία του *C. elegans*



Εικόνα A7. Η ανατομία του *C. elegans*. Πλευρική όψη των κύριων ανατομικών χαρακτηριστικών Α) ενός ερμαφρόδιτου και Β) ενός αρσενικού σκώληκα. Α) Η ραχιαία και η κοιλιακή νευρική χορδή διανύουν κατά μήκος το ζώο από τον νευρικό δακτύλιο. Απεικονίζονται οι δύο από τις τέσσερις σειρές μυϊκών κυττάρων. Β) Το νευρικό σύστημα και οι μυς παραλείπονται σε αυτήν την όψη, αποκαλύπτοντας πιο καθαρά τον φάρυγγα και το έντερο. Γ) Διατομή στην πρόσθια περιοχή του ερμαφρόδιτου *C. elegans* (θέση που σημειώνεται με μαύρη γραμμή στο Α).

Τροποποιημένο από <https://www.wormatlas.org/> (Altun *et al*, 2002-2024).

Η βασική ανατομία του *C. elegans* είναι απλή. Έχει ένα σχεδόν αμφίπλευρα συμμετρικό, επίμηκες σώμα το οποίο αποτελείται από την επιδερμίδα, τους μυς, το έντερο και τους νευρώνες. Στο μπροστινό τμήμα βρίσκεται το στόμα του ζώου και στο οπίσθιο το ορθό/έδρα.

Συνοπτικά, το μοτίβο του σώματος του *C. elegans*, όπως και άλλων νηματωδών, είναι ένα μη τμηματοποιημένο, κυλινδρικό σχήμα με κωνικά άκρα. Η βασική του οργάνωση αποτελείται από δύο ομόκεντρους σωλήνες οι οποίοι χωρίζονται από έναν χώρο γεμάτο υγρό το οποίο ονομάζεται ψευδοκοίλωμα (pseudocoelom). Το ψευδοκοίλωμα αποτελεί την κύρια κοιλότητα του ζώου μέσα στην οποία βρίσκονται τα κύρια όργανα του σκώληκα. Ο εξωτερικός σωλήνας (το τοίχωμα του σώματος) αποτελείται από το κέλυφος (ένα παχύ περίβλημα), την επιδερμίδα (η οποία καλείται και υποδερμίδα), το απεκκριτικό σύστημα, τους νευρώνες και τους μυς. Ο εσωτερικός σωλήνας περιλαμβάνει τον φάρυγγα, το έντερο και, στο ενήλικο ζώο, τη γονάδα. Όλοι αυτοί οι ιστοί βρίσκονται κάτω από μια εσωτερική υδροστατική πίεση, που ρυθμίζεται από ένα ωσμορρυθμιστικό σύστημα.

Πιο αναλυτικά, το κέλυφος του *C. elegans* αποτελεί έναν προστατευτικό φραγμό μεταξύ του ζώου και του περιβάλλοντος. Πρόκειται για μία εξειδικευμένη εξωκυτταρική ουσία που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο, λιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες. Το κέλυφος καλύπτει το ζώο από τον φάρυγγα μέχρι την έδρα και επιτρέπει την επικοινωνία συγκεκριμένων εσωτερικών συστημάτων, όπως τον εκκριτικό και τον γεννητικό πόρο, με το περιβάλλον. Επιπλέον, διαθέτει ανοίγματα στην κεφαλή και στην ουρά του ζώου, μέσω των οποίων προσλαμβάνουν ερεθίσματα πολλοί αισθητήριοι νευρώνες. Το κέλυφος καθορίζει το σχήμα του σώματος του ζώου και παρέχει σημεία αγκύρωσης για τη σύσπαση των μυών, μέσω της σύνδεσης της επιδερμίδας με τους μυς (Page & Johnstone, 2007).

Οι μυς του κυτταρικού τοιχώματος (σωματικοί μυς) οι οποίοι βρίσκονται συνδεδεμένοι με την επιδερμίδα αποτελούνται από 95 κύτταρα και διατρέχουν το σώμα σε όλο του το μήκος. Οι σωματικοί μυς είναι γραμμωτοί, με πολλά σαρκομερή ανά κύτταρο και διαθέτουν έναν πυρήνα, καθώς τα μυϊκά κύτταρα του νηματώδους δεν συγχωνεύονται όπως συμβαίνει στα σπονδυλωτά. Η τακτική σύσπαση και χαλάρωση των μυϊκών κυττάρων οδηγεί στην χαρακτηριστική ημιτονοειδή κίνηση του ζώου (Moerman & Fire, 1997). Η νεύρωση αυτών των μυών είναι επίσης ασυνήθιστη. Τα μυϊκά κύτταρα δημιουργούν προεκβολές προς την κοιλιακή και τη ραχιαία νευρική χορδή για να λάβουν συνάψεις από τους κινητικούς νευρώνες, αντί της πιο συνηθισμένης λήψης των αξονικών προεκβολών από τους κινητικούς νευρώνες (White

et al, 1986). Εκτός από τους σωματικούς μυς, ο *C. elegans* διαθέτει μυς που ελέγχουν τη θρέψη (μυς του φάρυγγα), την ωστοκία, τη σύζευξη (ειδικοί μυς της ουράς για το αρσενικό) και την αφόδευση (εντερικοί μυς).

Η τροφή (βακτήρια) εισέρχεται από το στόμα στο μπροστινό μέρος των ζώων και διέρχεται από τον φάρυγγα. Ο φάρυγγας είναι μια νευρομυϊκή αντλία με δύο λοβούς η οποία πάλλεται και αλέθει την τροφή πριν περάσει στο έντερο για πέψη. Αποτελείται από 9 επιθηλιακά κύτταρα, 20 μυϊκά, 9 διαχωριστικά κύτταρα συνδετικής φύσης, 4 αδενοκύτταρα και 20 νευρώνες. Ο φάρυγγας απομονώνεται από το υπόλοιπο ζώο με μία εξειδικευμένη βασική μεμβράνη που καλύπτει την επιφάνεια των φαρυγγικών κυττάρων και απομονώνει τον φάρυγγα από το ψευδοκοίλωμα. Οι παλμοί του φάρυγγα αποτελούν χαρακτηριστική συμπεριφορά του ζώου η οποία εξαρτάται από την ποιότητα και τη διαθεσιμότητα της τροφής (Avery & Shtonda, 2003). Συνδεδεμένο με το οπίσθιο τμήμα του φάρυγγα βρίσκεται το έντερο του *C. elegans* το οποίο αποτελείται από 20 μεγάλα επιθηλιακά κύτταρα διατεταγμένα σε ζεύγη τα οποία σχηματίζουν ένα σωλήνα που διατρέχει το ζώο κατά μήκος. Ο φάρυγγας και το έντερο αποτελούν το πεπτικό σύστημα του νηματώδους. Στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου εντοπίζεται η ορθική βαλβίδα υπό τον έλεγχο της οποίας αποβάλλεται το περιεχόμενο του εντέρου μετά την πέψη μέσω του ορθού.

Μαζί με το πεπτικό σύστημα στον εσωτερικό σωλήνα βρίσκεται και το αναπαραγωγικό. Στα ερμαφρόδιτα το αναπαραγωγικό σύστημα μπορεί διακριθεί σε τρία κύρια μέρη, τη σωματική γονάδα, τη γαμετική σειρά και το σύστημα εναπόθεσης αυγών. Η σωματική γονάδα βρίσκεται στο κέντρο του σώματος παράλληλα με το έντερο, και μαζί με τη γαμετική σειρά σχηματίζουν δύο αντικατοπτρικά συμμετρικούς σωλήνες σχήματος U. Οι δομές που συνθέτουν τη σωματική γονάδα είναι το στρώμα της γονάδας, η σπερματοθήκη, η βαλβίδα σπερματοθήκης-μήτρας και η μήτρα η οποία αποτελεί τμήμα και του συστήματος εναπόθεσης αυγών. Η σωματική γονάδα φιλοξενεί τα κύτταρα της γαμετικής σειράς τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ωοκυττάρων και σπερματοζωαρίων (Hubbard & Greenstein, 2005). Τα σπερματοζωάρια που παράγονται αποθηκεύονται στη σπερματοθήκη. Τα ωοκύτταρα παράγονται ως απόκριση στα σπερματοζωάρια και η ωρίμανση και η γονιμοποίησή τους γίνεται στο άπω άκρο της γονάδας όπου έρχονται σε επαφή με τη σπερματοθήκη. Στη συνέχεια μέσω της βαλβίδας σπερματοθήκης-μήτρας το νεοσχηματισμένο έμβρυο περνάει στη μήτρα. Ακολούθως, η ενεργοποίηση του συστήματος εναπόθεσης αυγών ωθεί τα αυγά να βγουν στο περιβάλλον περνώντας μέσα από ένα κοιλιακό άνοιγμα, τον γεννητικό πόρο (Singson, 2001). Το σύστημα εναπόθεσης αυγών αποτελείται από τη μήτρα, τον γεννητικό πόρο και τους σχετιζόμενους μυς και νευρώνες.

Το νευρικό σύστημα του *C. elegans* αποτελεί το πιο πολύπλοκο όργανο του ζώου. Επιτελεί τόσο βασικές συμπεριφορές του ζώου, όπως η μετακίνηση, η αναζήτηση τροφής, η σίτιση και η αφόδευση, αλλά και πιο σύνθετες όπως η δυνατότητα να διακρίνει και να μετακινηθεί προς ή να απομακρυνθεί από χημικές ουσίες, οσμές, θερμοκρασίες και πηγές τροφής. Μπορεί επίσης να ανιχνεύσει την πυκνότητα του πληθυσμού και το φύλο των κοντινών νηματωδών. Το νευρικό σύστημα του ενήλικου ερμαφρόδιτου αποτελείται από 302 νευρώνες και του ενήλικου αρσενικού από 383 (Sulston & Horvitz, 1977; White *et al*, 1986). Στην πλειοψηφία τους τα 282 από τα νευρικά κύτταρα βρίσκονται ως αμφίπλευρα συμμετρικά ζεύγη και είναι διατεταγμένα

σε λίγα γάγγλια στο κεφάλι, στην κοιλιακή νευρική χορδή και στην ουρά (η εξειδικευμένη αρσενική ουρά έχει την πλειοψηφία των επιπλέον νευρώνων) και αποτελούν το μεγάλο σωματικό νευρικό σύστημα, ενώ 20 νευρικά κύτταρα εντοπίζονται στον φάρυγγα και συγκροτούν το μικρό φαρυγγικό νευρικό σύστημα. Οι σωματικοί νευρώνες και οι διεργασίες τους εντοπίζονται κυρίως μεταξύ των μυών και της επιδερμίδας με την οποία μοιράζονται τη βασική μεμβράνη που τους χωρίζει από τους μυς. Αντίθετα, οι νευρώνες του φάρυγγα, εντοπίζονται μεταξύ των μυών του φάρυγγα και δεν διαχωρίζονται με κάποια μεμβράνη από αυτούς (Ward *et al*, 1975; Sulston & Horvitz, 1977; Sulston *et al*, 1983; White *et al*, 1986).

Οι νευρώνες διακρίνονται ανάλογα με τη λειτουργία τους σε 4 κατηγορίες: 1) τους κινητικούς νευρώνες, οι οποίοι πραγματοποιούν συναπτικές επαφές με μυϊκά κύτταρα, (2) τους αισθητήριους νευρώνες, 3) τους διάμεσους νευρώνες, οι οποίοι λαμβάνουν συνάψεις από άλλους νευρώνες και στέλνουν συνάψεις σε άλλους νευρώνες και, 4) τους πολυτροπικούς νευρώνες, οι οποίοι εκτελούν περισσότερες από μία από αυτές τις λειτουργίες. Στην πλειοψηφία τους οι νευρώνες έχουν μια απλή δομή με μία ή δύο αποφυάδες που εξέρχονται από το κυτταρικό σώμα ενώ ένας μικρότερος αριθμός κυττάρων, όπως οι μηχανοαισθητήριοι νευρώνες FLP (FLaP-like Dendritic Ending) και PVD (Posterior Ventral Process D), έχουν περίτεχνα διακλαδισμένες αποφυάδες (Dong *et al*, 2013). Οι περισσότερες αποφυάδες δεν μπορούν να διακριθούν ως νευράξονες ή δενδρίτες επειδή αμφότεροι δίνουν και λαμβάνουν συνάψεις και αναφέρονται ως νευρίτες. Οι νευρώνες του *C. elegans* σχηματίζουν περισσότερες από 7000 χημικές συνάψεις και χασμοσυνδέσμους (White *et al*, 1986). Σε αντίθεση με τα νευρικά συστήματα των σπονδυλωτών, οι νευρώνες του *C. elegans* δεν έχουν τελικά κομβία για να κάνουν συνάψεις. Οι περισσότερες από τις συνδέσεις γίνονται *en passant* (πλάι-πλάι καθώς οι νευρίτες περνούν ο ένας δίπλα από τον άλλον), αν και πολλοί αμφίπλευρα συμμετρικοί νευρώνες ενώνουν τις άκρες τους μέσω χασμοσυνδέσμων. Στην πλειοψηφία τους οι συνάψεις είναι χημικές και πραγματοποιούνται με τη μεσολάβηση νευροδιαβιβαστών. Ο *C. elegans* χρησιμοποιεί πολλούς από τους πιο κοινούς νευροδιαβιβαστές, συμπεριλαμβανομένων της ακετυλοχολίνης, του γλουταμινικού οξέος, του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης και διαθέτει αρκετούς υποδοχείς για την ανίχνευσή τους (Hobert, 2013).

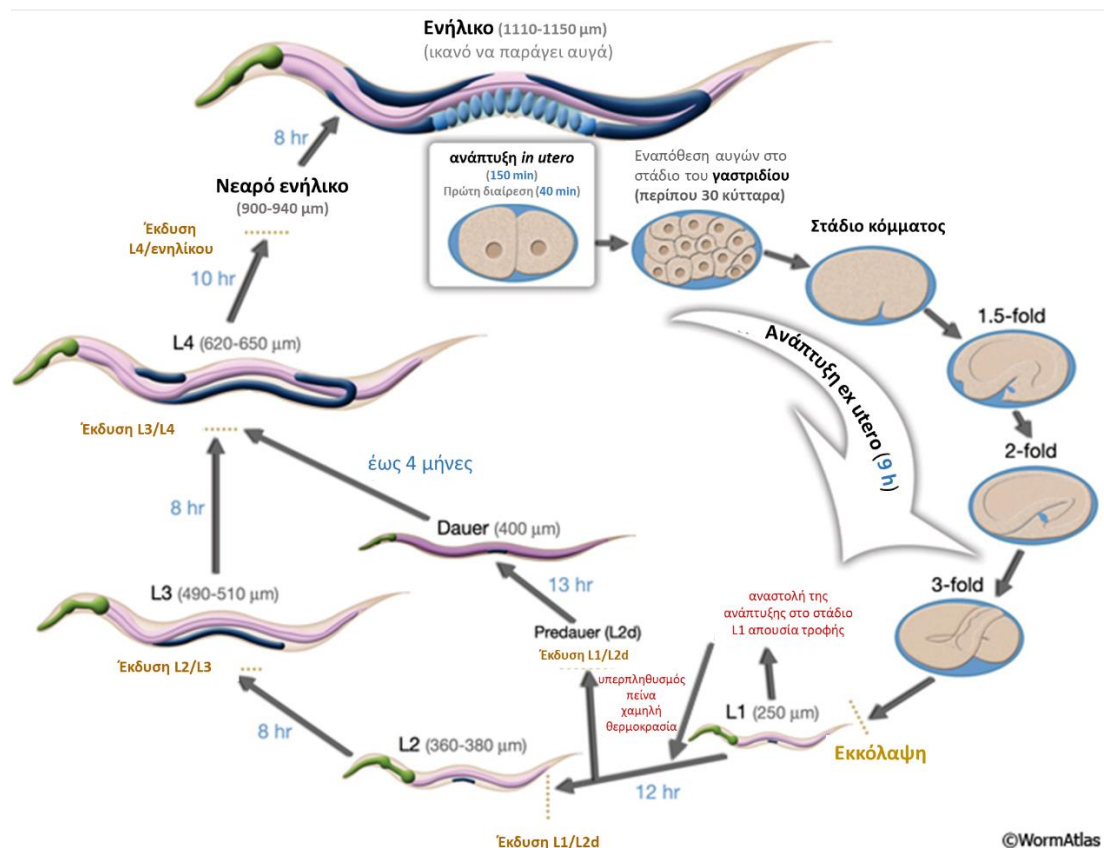
A.3.2. Ο κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής του *C. elegans* διακρίνεται από τρία βασικά στάδια, το εμβρυϊκό στάδιο (αυγό), τέσσερα στάδια προνύμφης (L1, L2, L3 και L4) και την ενηλικίωση.

Η εμβρυογένεση στον *C. elegans* διακρίνεται σε δύο στάδια, το στάδιο του πολλαπλασιασμού και της οργανογένεσης (Sulston *et al*, 1983). Το στάδιο του πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει κυτταρικές διαιρέσεις από ένα μόνο κύτταρο σε περίπου 550 αδιαφοροποίητα κύτταρα (Schierenberg *et al*, 1980). Στο τέλος του σταδίου του πολλαπλασιασμού, το έμβρυο έχει ένα σφαιροειδές σχήμα κυττάρων οργανωμένο σε τρεις βλαστικές στοιβάδες: 1) το εξώδερμα, το οποίο δημιουργεί την υποδερμίδα και τους νευρώνες, 2) το μεσόδερμα, που δημιουργεί τον φάρυγγα και τους μυς και, 3) το ενδόδερμα, το οποίο δημιουργεί τη βλαστική σειρά και το έντερο. Κατά το στάδιο της οργανογένεσης, η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων συμβαίνει χωρίς πολλές πρόσθετες κυτταρικές διαιρέσεις και το έμβρυο επιμηκύνεται και παίρνει μορφή ως ζώο με πλήρως διαφοροποιημένους ιστούς και όργανα.

Μετά την εκκόλαψη και παρουσία τροφής ξεκινάει η μετεμβρυϊκή ανάπτυξη. Κατά το στάδιο αυτό οι κυτταρικές διαιρέσεις ξαναρχίζουν και το ζώο περνάει από τέσσερα στάδια προνύμφης (L1 - L4) μέχρι να φτάσει στην ενήλικη, ώριμη μορφή του (Ambros, 2000). Το τέλος κάθε σταδίου προνύμφης χαρακτηρίζεται από τη σύνθεση μίας νέας επιδερμίδα, ειδικής για το κάθε στάδιο και την αποβολή της παλιάς. Ο *C. elegans* μπορεί είτε να αναπτυχθεί απευθείας στα τέσσερα στάδια προνύμφης είτε να προχωρήσει στο στάδιο της προνύμφης dauer. Η προνύμφη dauer σχηματίζεται μετά το στάδιο της προνύμφης L2, αντί για το στάδιο της προνύμφης L3. Το στάδιο της προνύμφης dauer είναι ένα αναπτυξιακά στάσιμο στάδιο που αξιοποιείται για να επιβιώσει ο οργανισμός υπό αντίξοες συνθήκες. Μόλις οι συνθήκες το επιτρέψουν, ο *C. elegans* μπορεί να ανακάμψει και να προχωρήσει στο στάδιο της προνύμφης L4, συνεχίζοντας την κανονική ανάπτυξη.

Τα ώριμα ερμαφρόδιτα ξεκινούν να γεννούν τα πρώτα τους αυγά περίπου 45-50 ώρες μετά την εκκόλαψη στους 22-25°C, ολοκληρώνοντας έτσι τον τριήμερο αναπαραγωγικό κύκλο ζωής. Το ενήλικο ζώο παράγει ωάρια για περίπου 4 ημέρες και συνεχίζει να ζει για 10-15 ημέρες μετά τη γόνιμη περίοδο (Byerly *et al*, 1976; Lewis & Fleming, 1995). Ένα ερμαφρόδιτο που αυτογονιμοποιείται μπορεί να παράγει σχεδόν 300 απογόνους. Ο αριθμός των απογόνων περιορίζεται από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, εάν συμβεί ζευγάρωμα με ένα αρσενικό, ο αριθμός των απογόνων μπορεί να αυξηθεί σε 1200-1400 άτομα.



Εικόνα Α8. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του *C. elegans* στους 22 °C. Οι αριθμοί με μπλε χρώμα κατά μήκος των βελών υποδεικνύουν τη διάρκεια του χρόνου που παραμένει το ζώο σε ένα συγκεκριμένο στάδιο. Η πρώτη διαίρεση συμβαίνει περίπου στα 40 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση. Τα αυγά εναποτίθεται έξω σε περίπου 150 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση (0 λεπτά) και κατά το στάδιο της γαστριδίωσης. Το μήκος του ζώου σε κάθε στάδιο σημειώνεται σε μικρόμετρα (μm).

Τροποποιημένο από <https://www.wormatlas.org/> (Altun *et al*, 2002-2024)

Α.3.3. Ο *C. elegans* ως μοντέλο γήρανσης

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο *C. elegans* λόγω του μικρού χρόνου ζωής και αναπαραγωγής, της ευκολίας του χειρισμού του και της υψηλής γενετικής ομολογίας με τον άνθρωπο, αποτελεί ένα από τα ιδανικά μοντέλα για μελέτες γήρανσης. Ο *C. elegans* έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη διεξαγωγή ερευνών τόσο για τα αίτια όσο και για τις επιπτώσεις της κυτταρικής γήρανσης αλλά και της γήρανσης ολόκληρου του οργανισμού.

Από την δεκαετία του '70, οι πρώτες μελέτες γήρανσης στον *C. elegans* επικεντρώθηκαν στη δυνατότητα εκτίμησης του προσδόκιμου ζωής του (Klass, 1977). Η μέτρηση του χρόνου ζωής στην πορεία συνδυάστηκε με γενετικές και βιοχημικές αναλύσεις. Από τις κομβικές ανακαλύψεις των μελετών γήρανσης είναι η ανακάλυψη του γονιδίου *age-1*, οι μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε επέκταση του προσδόκιμου ζωής (Klass, 1983; Friedman & Johnson, 1988). Η μελέτη αυτή αποκάλυψε πως είναι εφικτή η ταυτοποίηση μεταλλάξεων που επηρεάζουν τη μακροζωία αλλά και ότι μεμονωμένα γονίδια μπορούν να μεταβάλλουν το προσδόκιμο ζωής.

Από τις αρχικές μελέτες του χαρακτηρισμού των μεταλλάξεων που επηρεάζουν το προσδόκιμο ζωής, οι έννοιες του προσδόκιμου ζωής και της γήρανσης συχνά χρησιμοποιούνται ως όμοιες. Ωστόσο, το προσδόκιμο ζωής (lifespan) είναι μία μετρήσιμη παράμετρος που καθορίζει το χρονικό διάστημα που ένας οργανισμός είναι ζωντανός. Αυτή η μέτρηση εν τούτοις δεν δείχνει κάποια ένδειξη για το πώς γερνάει το ζώο ούτε λεπτομέρειες για την βιολογική του κατάσταση στον χρόνο. Το χρονικό διάστημα της υγιούς κατάστασης ενός οργανισμού (healthspan) κατά το οποίο παραμένει λειτουργικό, παραγωγικό και απαλλαγμένο από ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι στην έρευνα της γήρανσης. Αρκετές μεταβολές του φαινοτύπου του *C. elegans* αποτελούν δείκτες για την εκτίμηση του υγιούς προσδόκιμου ζωής (ευζωίας).

Ακολουθεί μία σύντομη ανασκόπηση των ηλικιοεξαρτώμενων αλλαγών στον *C. elegans*. Επιπλέον, παρουσιάζεται ο ρόλος του ως μοντέλο της ηλικιοεξαρτώμενης ασθένειας στην οποία επικεντρώνεται η συγκεκριμένη διατριβή, της AD.

A.3.3.1 Ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές και βιοδείκτες γήρανσης στον *C. elegans*

Οι φυσιολογικές και μοριακές μεταβολές κατά την εξέλιξη της γήρανσης μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς βιοδείκτες γήρανσης. Στον *C. elegans* έχουν παρατηρηθεί αρκετές ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, και ιστούς, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες για τη μελέτη της ευζωίας του ζώου (Herndon *et al*, 2017).

Ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές σε επίπεδο ιστού

Κατά τη γήρανση του *C. elegans* έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σε όλους τους ιστούς του ζώου. Με την αύξηση της ηλικίας φθίνει η λειτουργικότητα και η ακεραιότητα των μυών του σκώληκα η οποία, μεταξύ άλλων μεταβολών, οδηγεί σε μειωμένη κινητικότητα και αύξηση της ευαισθησίας σε λοιμώξεις (Chow *et al*, 2006). Η διατήρηση της κινητικότητας κατά την αύξηση της ηλικίας είναι ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του σκώληκα που ανήκει στους δείκτες ευζωίας. Παράλληλα, στα ηλικιωμένα άτομα μειώνεται ο αριθμός των μυϊκών ινιδίων και οι φαρυγγικοί μυς έχουν αλλοιωμένη εμφάνιση και παρουσιάζονται σκουρόχρωμες περιοχές. Αυτές οι ηλικιοεξαρτώμενες λειτουργικές και δομικές ανωμαλίες των φαρυγγικών μυών, φαίνεται να σχετίζονται με τη συσσώρευση βακτηρίων (Podshivalova *et al*, 2017). Όπως περιεγράφηκε και στην ενότητα A.3.1., ο φάρυγγας αποτελεί μία νευρομυϊκή αντλία υπεύθυνη για τη σίτιση του ζώου μέσω της ρυθμικής σύσπασης και χαλάρωσής του. Περιβάλλεται από μυϊκά κύτταρα τα οποία αποκρίνονται σε νευροδιαβιβαστές και πάλλονται κατά τη διάρκεια ζωής του ζώου (Avery & Horvitz, 1990). Ο ρυθμός των φαρυγγικών παλμών του *C. elegans* μειώνεται με την ηλικία και η διατήρηση του ρυθμού αυτού ή η καθυστερημένη μείωση του ρυθμού αυτού κατά τη γήρανση συμπεριλαμβάνεται στους δείκτες γήρανσης/ευζωίας (Huang *et al*, 2004).

Ο νευρικός ιστός του *C. elegans* είχε αναφερθεί αρχικά πως φαίνεται να παραμένει αμετάβλητος κατά τη γήρανση, ωστόσο έχουν παρατηρηθεί μικρές αλλά σημαντικά επαναλαμβανόμενες μεταβολές με την αύξηση της ηλικίας (Collins *et al*,

2008; Chen *et al*, 2013). Στους υποδοχείς των αισθητήριων νευρώνων, ο αριθμός των συναπτικών κυστιδίων είναι μικρότερος στα ηλικιωμένα ζώα (Toth *et al*, 2012). Επιπλέον, σε αισθητήριους νευρώνες όπως ο ALM (Anterior Lateral Microtubule Neuron) έχουν παρατηρηθεί αλλοιώσεις (σταδιακή σφαιροποίηση και φυσαλίδες) με την ηλικία υποδηλώνοντας τη διατάραξη της συναπτικής ακεραιότητας του *C. elegans* κατά τη γήρανση (Pan *et al*, 2011). Εκτός από τους αισθητήριους νευρώνες, οι κινητικοί GABAεργικοί νευρώνες εμφανίζουν διακλάδωση των αποφυάδων με τη γήρανση (Toth *et al*, 2012). Η έκταση των αλλαγών του νευρικού ιστού ποικίλλει μεταξύ των σκουληκιών της ίδιας ηλικίας και η ακεραιότητα των νευρώνων φαίνεται να σχετίζεται με τη συντονισμένη κινητικότητα του ζώου. Σκουλήκια τα οποία εμφανίζουν έντονη κίνηση κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους ή διατηρούν την κίνησή τους στη μέση ηλικία τείνουν να έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής (Hahm *et al*, 2015; Hsu *et al*, 2009).

Τέλος, όπως και σε πολλούς άλλους οργανισμούς, η λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος του *C. elegans* φθίνει με τη γήρανση (Garigan *et al*, 2002; Pickett *et al*, 2013). Η δημιουργία απογόνων ελαττώνεται με την ηλικία και ένας από τους λόγους είναι ο περιορισμένος αριθμός σπερματοζωαρίων των ερμαφρόδιτων στελεχών. Η γονιμοποίηση των ερμαφρόδιτων από αρσενικά στελέχη μπορεί να συνεχιστεί και σε μεγαλύτερη ηλικία σε σύγκριση με την αυτογονιμοποίηση. Ωστόσο, και πάλι η αναπαραγωγή σταματάει με την αύξηση της ηλικίας, συνεπώς ο περιορισμένος αριθμός των σπερματοζωαρίων δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας περιορισμού της αναπαραγωγικής περιόδου (Hughes *et al*, 2007). Στη βλαστική σειρά των ηλικιωμένων ζώων, παρατηρείται μείωση του αριθμού των πυρήνων και αλλοιώσεις στο πυρηνόπλασμα, όπως η αυξημένη συσσώρευση κοκκώδους υλικού και κοιλοτήτων (Garigan *et al*, 2002). Παράλληλα, το μέγεθος των ωαρίων μειώνεται, γεγονός που συσχετίζεται αρνητικά με την ποιότητά τους (Andux & Ellis, 2008). Ο μεγάλος αριθμός των απογόνων μετά τη γονιμοποίηση συσχετίζεται επίσης θετικά με το προσδόκιμο ζωής (Pickett *et al*, 2013).

Ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο

Ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο έχουν παρατηρηθεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα. Η ακεραιότητα του ενδοπλασματικού δικτύου και η απόκρισή του στο πρωτεοτοξικό στρες μειώνεται με την ηλικία (Martínez *et al*, 2017). Σημαντικό ρόλο στη γήρανση του *C. elegans*, όπως και σε άλλους οργανισμούς, φαίνεται να έχει η απόκριση του UPR^{ER}. Η δράση του UPR^{ER} μειώνεται με την ηλικία ενώ η υπερέκφραση του XBP-1 στους νευρώνες μπορεί να ενισχύσει την ανθεκτικότητα στο στρες και τη μακροζωία (Taylor & Dillin, 2013). Τα μιτοχόνδρια κατά τη γήρανση υφίστανται τόσο δομικές όσο και λειτουργικές αλλαγές (Yasuda *et al*, 2006). Στα γηρασμένα ζώα παρατηρούνται κατακερματισμένα μιτοχόνδρια τα οποία έχουν συσχετιστεί με ασυντόνιστη κίνηση (Hahm *et al*, 2015). Επιπλέον, το μέγεθος το μιτοχονδρίων φαίνεται να αυξάνεται κάτι που μάλλον αποδίδεται σε μεταξύ τους σύζευξη, ενώ αύξηση παρουσιάζουν τα επίπεδα των ROS, των καρβονυλιωμένων πεπτιδίων και του κατεστραμμένου μιτοχονδριακού DNA (Cui *et al*, 2012; Yasuda *et al*, 2006). Τέλος, έχει παρατηρηθεί φθορά των πυρήνων των κυττάρων του *C. elegans* η οποία παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των ιστών (Golden *et*

al, 2007). Οι πυρήνες των κυττάρων του εντέρου αρχίζουν να εκφυλίζονται από τη δωδέκατη μέρα της ενηλικίωσης (McGee *et al*, 2011). Οι πυρήνες των μυϊκών κυττάρων αναπτύσσουν επίσης σκούρες κηλίδες και το μέγεθός τους αυξάνεται με τη γήρανση (Tiku *et al*, 2017). Ομοίως, οι πυρήνες των υποδερμικών και των φαρυγγικών κυττάρων εμφανίζουν ανωμαλίες που σχετίζονται με την ηλικία, ενώ τα γεννητικά κύτταρα παρουσιάζουν μείωση του αριθμού των πυρήνων (Haithcock *et al*, 2005; Pan *et al*, 2011).

Ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές σε μοριακό επίπεδο

Η γονιδιακή έκφραση στον *C. elegans* μεταβάλλεται κατά τη γήρανση. Παρατηρείται μείωση της έκφρασης γονιδίων κολλαγόνου, η υπερέκφραση των οποίων ενισχύει το προσδόκιμο ζωής, καθώς επίσης και μείωση των επιπέδων mRNA των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικού σοκ, αλλά και μεταβολές σε μη κωδικά RNA (Golden *et al*, 2008). Επιπλέον, οι μηχανισμοί ελέγχου ποιότητας του RNA φθίνουν επηρεάζοντας αρνητικά το προσδόκιμο ζωής (Son *et al*, 2017).

Κατά τη γήρανση, στον *C. elegans* παρατηρείται αύξηση των επιπέδων λιποφουσκίνης (Xu *et al*, 2008). Η λιποφουσκίνη είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης ενδολυσοσωμικού υλικού το οποίο δεν μπορεί να αποικοδομηθεί και προέρχεται από τα αυτοφαγοκυτταρικά συστατικά που έχουν οξειδωθεί έξω ή μέσα στο λυσόσωμα. Τόσο η λιποφουσκίνη, καθώς και άλλες ουσίες που συσσωρεύονται με την ηλικία όπως τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products, AGEs), αποτελούν φθοριζόντα υλικά τα οποία μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μέσω *in vivo* φασματοσκοπίας φθορισμού (Gerstbrein *et al*, 2005). Η συσσώρευση τέτοιων φθοριζουσών ουσιών είναι σταδιακή μέχρι την πρώιμη ενήλικη ζωή στον *C. elegans* και ταχεία στη μέση ηλικία, ενώ η απόλυτη ποσότητά τους συσχετίζεται αρνητικά με το προσδόκιμο ζωής.

Τέλος, όπως και σε άλλους οργανισμούς, με την ηλικία αρχίζει και φθίνει η ακεραιότητα της ομοιόστασης και στα ηλικιωμένα σκουλήκια παρατηρείται η συσσωμάτωση αρκετών εγγενών πρωτεϊνών (Walther *et al*, 2015). Η γενετική αναστολή γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες επιρρεπείς στη συσσωμάτωση, αλλά και η ενίσχυση γονιδίων που συμβάλλουν στην απομάκρυνση τέτοιων πρωτεϊνών, οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Reis-Rodrigues *et al*, 2012; Taylor & Dillin, 2013; Chondrogianni *et al*, 2015a).

A.3.4. Ο *C. elegans* ως μοντέλο για την AD

Το νευρικό σύστημα των θηλαστικών, όπως περιεγράφηκε στην ενότητα A.3.1, αποτελείται από εκατομμύρια έως δισεκατομμύρια νευρώνες ενώ το ενήλικο ερμαφρόδιτο ζώο διαθέτει περίπου 300 νευρώνες, ένα δηλαδή λιγότερο πολύπλοκο σύστημα του οποίου οι βασικές αρχές οργάνωσης, λειτουργίας και διαφοροποίησης είναι σε μεγάλο βαθμό όμοιες με των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Το νευρικό δίκτυο του ζώου έχει χαρτογραφηθεί πλήρως και τα κύρια λειτουργικά στοιχεία της συναπτικής δραστηριότητας, όπως είναι οι νευροδιαβιβαστές, οι υποδοχείς, οι μεταφορείς και οι διάλυτοι ιόντων είναι συντηρημένα (White *et al*, 1986; Cook *et al*, 2019). Επιπλέον, το διαφανές σώμα του ζώου, δίνει τη δυνατότητα

οπτικοποίησης των νευρώνων με τη βοήθεια φθορίζουσών πρωτεϊνών, καθιστώντας δυνατή τη μελέτη των νευρωνικών ιδιοτήτων σε ζωντανό οργανισμό καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ζωής του. Τέλος, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα για πολλές κοινές νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η AD, η χρήση των οποίων μπορεί να συμβάλλει στη μεταφραστική έρευνα.

Όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα A.1.3.1., η παρουσία των αδιάλυτων πλακών του Αβ πεπτιδίου και των νευροϊνδιακών συμπλεγμάτων που σχετίζονται με την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau στον εγκέφαλο, αποτελούν δύο καθοριστικά χαρακτηριστικά της νόσου. Στα θηλαστικά, το Αβ πεπτίδιο συσσωρεύεται σε εξωκυτταρικές πλάκες, ακολουθούμενο από ενδοκυτταρική πρόσληψη των νευροτοξικών ολιγομερών. Η συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου είναι αποτέλεσμα διαδοχικής ενζυμικής επεξεργασίας της ανθρώπινης πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) από την σεκρετάση που βρίσκεται δεσμευμένη στη μεμβράνη με τη διαμεσολάβηση των πρωτεϊνών πρεσενιλίνη PS1 και PS2.

Στον *C. elegans*, το προϊόν του γονιδίου *sel-12* παρείχε μερικές από τις πρώτες ενδείξεις για τις πρεσενιλίνες ως λειτουργικές υπομονάδες της ανθρώπινης γ-σεκρετάσης (Levitan & Greenwald, 1995). Ωστόσο, το γονιδίωμα του σκώληκα δεν διαθέτει σαφές ορθόλογο ούτε της β-σεκρετάσης ούτε του APP. Η πρωτεΐνη APL-1 του σκουληκιού είναι ορθόλογη των ανθρώπινων APLP1 και APLP2 και έχει 71% ομοιότητα αλληλουχίας με την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, αλλά στερείται της περιοχής Αβ. Συνεπώς, η δημιουργία μοντέλων *C. elegans* για την AD βασίζεται κυρίως στη διαγονιδιακή έκφραση του ώριμου ανθρώπινου Αβ πεπτιδίου (Griffin *et al*, 2017). Η ένθεση και η έκφραση ενός αντιγράφου ανθρώπινης APP στον *C. elegans*, οδηγεί σε νευροεκφυλισμό και δυσλειτουργία σε συμπεριφορές που συνδέονται με το νευρικό σύστημα (Yi *et al*, 2017).

Ο *C. elegans* διαθέτει επίσης ορθόλογο της πρωτεΐνης tau, την PTL-1 (Goedert *et al*, 1996). Η PTL-1 υπάρχει σε δύο ισομορφές, την PTL-1A και την PTL-1B και εκφράζεται κυρίως στους μηχανοαισθητήριους νευρώνες. Τα στελέχη μοντέλα *C. elegans* για την tau έχουν δημιουργηθεί τόσο μέσω υπερέκφρασης του ανθρώπινου μεταλλαγμένου γονιδίου της tau στους νευρώνες του σκώληκα, αλλά και μέσω μεταλλάξεων της πρωτεΐνης *ptl-1* (Pir *et al*, 2017).

Η δημιουργία μοντέλων για την AD στον *C. elegans* έχει βασιστεί κυρίως στην αμυλοειδική υπόθεση (Hardy & Selkoe, 2002). Το πεπτίδιο Αβ₁₋₄₂ θεωρείται ως το πιο τοξικό πεπτίδιο που δημιουργείται από τη διάσπαση του APP. Στο πρώτο μοντέλο *C. elegans* για την AD που δημιουργήθηκε ως αποτέλεσμα έρευνας από τον Chris Link, το ανθρώπινο πεπτίδιο Αβ₁₋₄₂ εκφράζεται ιστοειδικά στους μυς υπό την ρύθμιση του υποκινητή *unc-54*, συσσωρεύεται σταδιακά, οδηγώντας τελικά σε φαινότυπο παράλυσης του ζώου (Link, 1995). Ο νευροεκφυλισμός που προκαλείται από το Αβ₁₋₄₂ έχει μελετηθεί κυρίως σε μηχανοαισθητήριους και γλουταμινεργικούς νευρώνες, οι οποίοι είναι συνήθως ευαίσθητοι στην υπερδιέγερση και σχετίζονται κλινικά με τα πρώιμα στάδια του εκφυλισμού στην AD (Palop and Mucke, 2009, 2016). Οι αγρίου τύπου σκώληκες διαθέτουν πέντε γλουταμινεργικούς νευρώνες στην ουρά τους. Μοντέλα AD που υπερεκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ συζευγμένο με GFP ιστοειδικά στους γλουταμινεργικούς νευρώνες υπό την έκφραση του υποκινητή του μεταφορέα

του γλουταμινικού *eat-4* παρουσιάζουν προοδευτικό, εξαρτώμενο από την ηλικία νευροεκφυλισμό (Treusch *et al*, 2011).

A.3.5. Η συμβολή του πρωτεασώματος στη γήρανση του *C. elegans*

Στον *C. elegans* έχουν χαρτογραφηθεί και οι 7 υπομονάδες τύπου α (*pas-1* έως *pas-7*) καθώς επίσης και οι επτά υπομονάδες β-τύπου (*pbs-1* έως *pbs-7*) και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με αυτές που έχουν βρεθεί στον άνθρωπο και στον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* (Davy *et al*, 2001). Στον **πίνακα A2** παρουσιάζονται τα ορθόλογα γονίδια του 20S ανθρώπινου πρωτεασώματος στον *C. elegans*.

Πίνακας A2. Ορθόλογα γονίδια του 20S ανθρώπινου πρωτεασώματος στον *C. elegans*

α-τύπου υπομονάδες		β-τύπου υπομονάδες	
<i>C. elegans</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>C. elegans</i>	<i>H. sapiens</i>
Όνομα γονιδίου			
<i>pas-1</i>	<i>PSMA6</i>	<i>pbs-1</i>	<i>PSMB6</i>
<i>pas-2</i>	<i>PSMA2</i>	<i>pbs-2</i>	<i>PSMB7</i>
<i>pas-3</i>	<i>PSMA4</i>	<i>pbs-3</i>	<i>PSMB3</i>
<i>pas-4</i>	<i>PSMA7</i>	<i>pbs-4</i>	<i>PSMB2</i>
<i>pas-5</i>	<i>PSMA5</i>	<i>pbs-5</i>	<i>PSMB5</i>
<i>pas-6</i>	<i>PSMA1</i>	<i>pbs-6</i>	<i>PSMB1</i>
<i>pas-7</i>	<i>PSMA3</i>	<i>pbs-7</i>	<i>PSMB4</i>

Κατά τη γήρανση του *C. elegans* παρατηρείται μείωση της λειτουργίας του UPS. Έχει δειχθεί πως ενίσχυση της δόμησης ή της ενεργότητας του πρωτεασώματος του *C. elegans* μέσω της επαγωγής των πρωτεασωμικών υπομονάδων, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεασωμικής ενεργότητας και επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της *rpn-6* υπομονάδας του 19S συμπλόκου ή της β5 (*pbs-5*) υπομονάδας του 20S πρωτεασώματος αυξάνει το προσδόκιμο ζωής (Vilchez *et al*, 2012; Chondrogianni *et al*, 2015a). Επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής παρατηρείται και σε στελέχη *C. elegans* με μεταλλάξεις που οδηγούν σε διαμόρφωση ανοιχτής πύλης (α3ΔN) (Anderson *et al*, 2022). Η συμβολή της ρύθμισης του UPS και της ενεργότητας του πρωτεασώματος στη μακροβιότητα του σκώληκα είναι επίσης διακριτή σε στελέχη *C. elegans* που φέρουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής. Παράδειγμα αποτελούν στελέχη με μεταλλάξεις για το γονίδιο *dnh-1* οι οποίες οδηγούν σε ήπιο μιτοχονδριακό στρες ή για το γονίδιο *glp-1* (glucagon-like peptide-1) που οδηγούν σε έλλειψη της βλαστικής σειράς. Οι μεταλλάξεις αυτές προάγουν τη μακροζωία του ζώου και την ενίσχυση της πρωτεόστασης, η οποία στα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα στελέχη έχει συνδεθεί με την ενίσχυση της ενεργότητας του UPS (Sladowska *et al*, 2021; Vilchez *et al*, 2012). Θετική ρύθμιση του πρωτεασώματος έχει παρατηρηθεί μέσω της σηματοδότησης του παράγοντα EGF (epidermal growth factor). Συγκεκριμένα, παρατηρείται ενίσχυση της έκφρασης

γονιδίων του UPS και αύξηση της ενεργότητάς του με επακόλουθη επέκταση του προσδόκιμου ζωής (Liu *et al*, 2011).

Από τα παραπάνω γίνεται ξεκάθαρος ο ρόλος και η σημασία του πρωτεασώματος στη ρύθμιση της πρωτεόστασης και κατ' επέκταση στην εξέλιξη της γήρανσης. Η ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος μπορεί να προσφέρει πολλά οφέλη κατά την εξέλιξη της γήρανσης, συμβάλλοντας στη βελτίωση της κυτταρικής υγείας και της συνολικής λειτουργίας του οργανισμού, καθιστώντας το έναν σημαντικό στόχο για έρευνες που αποσκοπούν στη βελτίωση της μακροχρόνιας υγείας και της ποιότητας ζωής.

A.4. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η γήρανση είναι ένα φαινόμενο που επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ανάμεσα στους μηχανισμούς που επηρεάζουν την εξέλιξη της γήρανσης αλλά παράλληλα επηρεάζονται από αυτή, ανήκουν οι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, καθώς είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση φυσιολογικών και μη πρωτεϊνών που συσσωρεύονται στη διάρκεια του χρόνου. Το πρωτεάσωμα αποτελεί έναν από τους βασικούς πρωτεολυτικούς μηχανισμούς των κυττάρων και σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας, η υπερέκφραση της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος σε όλους του ιστούς του *C. elegans* έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής του. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι διάφοροι πρωτεοστατικοί μηχανισμοί υπόκεινται σε ρύθμιση τόσο σε αυτόνομο (cell-autonomous) όσο και σε μη αυτόνομο κυτταρικό επίπεδο (cell non-autonomous). Ωστόσο τίποτα δεν είναι γνωστό για μια τέτοια ενδεχόμενη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος και της λειτουργίας του. Ακριβώς αυτό το κενό έχει σκοπό να καλύψει η παρούσα διδακτορική διατριβή: να διερευνήσει την ενδεχόμενη ρύθμιση του πρωτεασώματος μέσω της επικοινωνίας απομακρυσμένων μεταξύ τους ιστών (μη αυτόνομο κυτταρικό επίπεδο).

Πιο συγκεκριμένα, τα ερευνητικά ερωτήματα που καλείται να απαντήσει η διατριβή είναι:

- 1) Υπόκειται το πρωτεάσωμα σε αυτόνομη ή/και μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση;
- 2) Ποιες είναι οι επιπτώσεις της ιστοειδικής πρωτεασωμικής ενεργοποίησης (**α**) στο οργανισμικό προσδόκιμο ζωής, (**β**) στην ανθεκτικότητα σε οξειδωτικό στρες, και, (**γ**) στην ανθεκτικότητα σε πρωτεοτοξικό στρες και στην εξέλιξη ηλικιοεξαρτώμενων πρωτεϊνοπαθειών όπως η AD;
- 3) Ποιοι είναι οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που διέπουν την ενδεχόμενη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση;

Β. Υλικά και Μέθοδοι

B.1 Συντήρηση και χειρισμοί του νηματώδους *C. elegans*

B.1.1 Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους OP50

Το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* OP50 χρησιμοποιείται ως τροφή του *C. elegans* στο εργαστήριο. Πρόκειται για ένα αυξότροφο ως προς την ουρακίλη στέλεχος του οποίου η ανάπτυξη είναι περιορισμένη στο θρεπτικό υπόστρωμα NGM (Nematode Growth Medium), το οποίο χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του *C. elegans* (ενότητα B.1.2) (Brenner, 1974). Η περιορισμένη ανάπτυξη αυτού του αυξοτροφικού στελέχους οδηγεί στον σχηματισμό λεπτού βακτηριακού ταπητίου (lawns) ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση των νηματωδών όσο βρίσκονται πάνω στα βακτήρια. Το στέλεχος OP50 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα της παρούσας διατριβής.

Το βακτηριακό στέλεχος OP50 αρχικά καλλιεργείται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB (Luria Broth) άγαρ. Για την παρασκευή των τρυβλίων LB-άγαρ, το θρεπτικό αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά και διαμοιράζεται πριν στερεοποιηθεί σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm (25 ml/τρυβλίο). Τα τρυβλία παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στη συνέχεια μπορούν να αποθηκευτούν στο 4°C για 3-4 εβδομάδες. Ακολουθεί επιφανειακή επίστρωση των βακτηρίων (streaking) υπό στείρες συνθήκες και τα βακτήρια καλλιεργούνται στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (LB-άγαρ) για 16 ώρες στους 37°C. Ακολουθεί απομόνωση μίας αποικίας κάτω από στείρες συνθήκες και εμβολιασμός της σε 50 ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού LB. Ακολουθεί επώαση της υγρής καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) έως ότου φτάσει στην εκθετική φάση. Όταν φτάσει σε αυτή τη φάση χρησιμοποιείται για επίστρωση των τρυβλίων NGM (ενότητα B.1.2).

Διαλύματα

Σύσταση του υποστρώματος του βακτηριακού στελέχους OP50 (LB)

- 5 g/L NaCl
- 5 g/L εκχύλισμα ζύμης
- 10 g/L τρυπτόνη
- 15 g/L άγαρ (προστίθεται μόνο για την παραγωγή στερεού θρεπτικού LB-άγαρ)

B.1.2 Καλλιέργεια στελεχών *C. elegans*

Τα στελέχη *C. elegans* καλλιεργούνται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NGM άγαρ. Για την παρασκευή του θρεπτικού αναμινγούνται 3 g/L NaCl, 17 g/L άγαρ και 2.5 g/L πεπτόνης και το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και εφόσον η θερμοκρασία δεν ξεπερνά τους 55°C, στο διάλυμα προστίθενται κάτω από στείρες συνθήκες και υπό διαρκή ανάδευση 25 ml/L 1M KPO₄, 1 ml/L 1M MgSO₄, 1 ml/L 1M CaCl₂, 1 ml/L χοληστερόλη (5 mg/ml) και 1 ml/L νυστατίνη (100 mg/mL). Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό πριν στερεοποιηθεί διαμοιράζεται σε τρυβλία διαμέτρου 6 cm (10 ml/τρυβλίο), τα οποία χρησιμοποιούνται

για την καθημερινή συντήρηση και ανάπτυξη των σκουληκιών, ή σε τρυβλία διαμέτρου 3.5 cm (3 ml/τρυβλίο) τα οποία χρησιμοποιούνται για τις γενετικές διασταυρώσεις. Τα τρυβλία αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ημέρες προκειμένου να εξατμιστεί η περίσσεια υγρασίας αλλά και να ανιχνευθεί τυχόν επιμόλυνση, και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C. Ακολούθως, γίνεται επίστρωση των τρυβλίων με το βακτηριακό στέλεχος OP50 το οποίο αποτελεί την τροφή του σκώληκα και φέρει ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη. Υπό στείρες συνθήκες τοποθετούνται 100 μl καλλιέργειας OP50 στην επιφάνεια του υποστρώματος NGM, στο κέντρο του τρυβλίου και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στη συνέχεια τα τρυβλία μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C για 1-2 εβδομάδες.

Για τον χειρισμό των στελεχών *C. elegans* είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός εργαλείου (wormpick) με τη βοήθεια του οποίου είναι εφικτή η μεταφορά των νηματωδών. Το εργαλείο αυτό αποτελείται από μία γυάλινη πιπέτα Pasteur στην άκρη της οποίας έχει τοποθετηθεί ένα σύρμα πλατίνας του οποίου η άκρη έχει πλατυνθεί και λιμαριστεί. Πριν από κάθε επαφή με το ζώο, το wormpick αποστειρώνεται με τη βοήθεια φλόγας και στη συνέχεια αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την καθημερινή συντήρηση των στελεχών, από ένα τρυβλίο με μικτό πληθυσμό (ως προς τα αναπτυξιακά στάδια) επιλέγεται ένας αριθμός ζώων σταδίου L4 (περίπου 20) και μεταφέρεται σε ένα νέο τρυβλίο με φρέσκια καλλιέργεια OP50. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, κατά τη συντήρησή τους και κατά τους πειραματικούς χειρισμούς διατηρήθηκαν σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο σε σταθερή θερμοκρασία στους 20°C. Εξάιρεση αποτελεί το στέλεχος CL4176 καθώς και τα διαγονιδιακά ζώα που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις με το στέλεχος αυτό (ενότητα B.2), τα οποία διατηρούνται στους 16°C.

Διαλύματα

Αρχικά διαλύματα (στοκ) για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος NGM

- 1 M KPO₄ pH 6.0: Αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- 1 M MgSO₄: Αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- 1 M CaCl₂: Αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5 mg/ml χοληστερόλη: Διαλύεται σε 100% αιθανόλη και διατηρείται στους 4°C.
- 100 mg/ml νυστατίνη: Διαλύεται σε 70% αιθανόλη και διατηρείται στους 4°C.

Σύσταση υποστρώματος NGM

- 17 g/L άγαρ
- 3 g/L NaCl
- 2.5 g/L πεπτόνη
- 0.2 g/L στρεπτομυκίνη
- 1 ml/L 1M MgSO₄
- 1 ml/L 1M CaCl₂
- 1ml/L 5 mg/ml χοληστερόλη
- 1 ml/L 100 mg/ml νυστατίνη

B.1.3 Αποθήκευση στελεχών *C. elegans*

Τα στελέχη *C. elegans* μπορούν να καταψυχθούν σε κατάλληλο μέσο (διάλυμα ψήξης) και να διατηρηθούν επ' αόριστον στο υγρό άζωτο (-196°C). Σε αυτές τις συνθήκες αποθήκευσης ο σκώληκας επιβιώνει στα αναπτυξιακά στάδια L1-L2.

Για τη διαδικασία της κατάψυξης των στελεχών *C. elegans*, επιλέγονται τρυβλία (6 cm) από τα οποία έχει εξαντληθεί η τροφή και περιέχουν μεγάλο αριθμό σκουληκιών αναπτυξιακού σταδίου L1 και L2. Σε κάθε πιάτο προστίθενται 0.6 ml ισότονου διαλύματος M9 και συλλέγεται το εναιώρημα στο οποίο προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος ψύξης. Το εναιώρημα που προκύπτει αναδεύεται ήπια, διαμοιράζεται σε σωλήνες ειδικούς για αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες (cryovials) και τοποθετείται για 24 ώρες στους -80°C σε ειδικό δοχείο που επιτρέπει τη σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια τα παγωμένα στελέχη μεταφέρονται και φυλάσσονται στο υγρό άζωτο.

Διαλύματα

Σύσταση διαλύματος ψύξης

- 5,85 g NaCl
- 50 ml KPO_4 (pH 6) (προστίθεται μετά την αποστείρωση)
- 300 ml γλυκερόλη
- 300 μl 1M MgSO_4 (προστίθεται μετά την αποστείρωση)

Σύσταση ισότονου διαλύματος M9

- 5 g/L NaCl
- 6 g/L Na_2HPO_4
- 3 g/L KH_2PO_4
- 1 ml/L 1M MgSO_4 (προστίθεται μετά την αποστείρωση)

B.2 Στελέχη *C. elegans*

Τα στελέχη αγρίου τύπου N2 όπως και τα στελέχη CL4176, GMC101, CB246 *unc-64(e246)*, CB928 *unc-31(e928)*, KR1787 *unc-13(e51)* αγοράστηκαν από το Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Τα στελέχη YD114 και YD70 (στελέχη αναφοράς πρωτεασωμικής ενεργότητας) είναι δωρεά του εργαστηρίου της Δρ. Carina I. Holmberg (University of Helsinki). Τέλος, το στέλεχος UA198 παραχωρήθηκε από τον καθηγητή Guy A. Caldwell (University of Alabama) (**Πίνακας B1**).

Πίνακας B1. Αρχικά στελέχη *C. elegans*

	Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
1	N2		Στέλεχος αγρίου τύπου
2	CL4176	<i>smg-1(cc546)I; dvIs27[myo-3p::Aβ1-42::let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]X</i>	Έκφραση του ανθρώπινου Αβ ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς
3	GMC101	<i>dvIs100[unc-54p::Aβ1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]</i>	Έκφραση του ανθρώπινου Αβ ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς
4	CB246	<i>unc-64(e246)II</i>	Ελλιπής παραγωγή κυστιδίων SCVs και DCVs
5	CB928	<i>unc-31(e928)IV</i>	Ελλιπής παραγωγή κυστιδίων DCVs
6	KR1787	<i>unc-13(e51)</i>	Ελλιπής παραγωγή κυστιδίων SCVs
7	YD114	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]</i>	Έκφραση συστήματος ανίχνευσης πρωτεασωμικής ενεργότητας ZsProSensor-1 στους μυς (ZsProSensor-1-μυς)
8	YD70	<i>xzIs1[vha-6p::UIM2::ZsProSensor-1]</i>	Έκφραση συστήματος ανίχνευσης πρωτεασωμικής ενεργότητας ZsProSensor-1 στο έντερο (ZsProSensor-1-έντερο)
9	UA198	<i>baIn34[eat-4p::Aβ1-42 + myo-2p::mCherry]; adIs1240[eat-4p::GFP]</i>	Έκφραση ανθρώπινου Αβ ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους γλουταμινεργικούς νευρώνες

Διαγονιδιακά στελέχη

Τα στελέχη τα οποία φέρουν εξωχρωμοσωμικές συστοιχίες (extrachromosomal arrays) και υπερεκφράζουν ιστοειδικά και καθολικά (σε όλους τους ιστούς) το γονίδιο *pbs-5*, BAN301, BAN313, BAN297, BAN298, BAN296, BAN309, BAN330, BAN312, BAN325 και BAN311 παράχθηκαν μέσω μικροενέσεων του εκάστοτε διαγονιδίου στο στέλεχος αγρίου τύπου N2 από την Δρ. Άννα Γιοράν (**Πίνακας B3**). Για τη στοχευμένη έκφραση στον εκάστοτε ιστό, χρησιμοποιήθηκαν ιστοειδικοί υποκινητές: *rgef-1* για τους νευρώνες (*rgef-1p::pbs-5*), *vha-6* για το έντερο (*vha-6p::pbs-5*), *myo-3* για τους μυς (*myo-3p::pbs-5*) και *let-858* (*let-858p::pbs-5*) για την

έκφραση σε όλους τους ιστούς. Επιπλέον, τα στελέχη ενέθηκαν και με έναν συμπληρωματικό φορέα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μετασχηματισμού (γονίδιο επιλογής). Στη συγκεκριμένη μελέτη, βάσει του γονιδίου αναφοράς δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικές ομάδες στελεχών που υπερεκφράζουν ιστοειδικά και καθολικά το γονίδιο *pbs-5*. Η μία ομάδα (BAN301, BAN313, BAN297, BAN298, BAN296) φέρει τον πλασμιδιακό φορέα pPD122.11 που εκφράζει την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP(S65C) υπό τη ρύθμιση του ιστοειδικού για τον φάρυγγα υποκινητή *myo-2* (φαινότυπος επιλογής: φθορισμός στον φάρυγγα). Η άλλη ομάδα (BAN309, BAN330, BAN312, BAN325 και BAN311) φέρει τον πλασμιδιακό φορέα pRF4 που εκφράζει ως γονίδιο επιλογής το *rol-6(su1006)*, με αποτέλεσμα τα μετασχηματισμένα στελέχη να εμφανίζουν τον φαινότυπο roller (φαινότυπος επιλογής τύπου roller: περιστροφική αντί για ημιτονοειδής κίνηση).

Εν συντομία, τα στελέχη δημιουργήθηκαν ως εξής: για την ιστοειδική έκφραση του γονιδίου *pbs-5*, μία περιοχή του γενωμικού DNA του αγρίου τύπου *C. elegans*, η οποία περιέχει την κωδική περιοχή του γονιδίου, ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pDONR™ 221 P1-P5r. Αντίστοιχα οι ιστοειδικοί υποκινητές (*rgef-1p*, *vha-6p* και *myo-3p*) αποκτήθηκαν μέσω ενίσχυσης της κατάλληλης αλληλουχίας με PCR και κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pDONR221™ P5-P2. Προκειμένου να παραχθεί ένας κλώνος έκφρασης, οι δύο κλώνοι που φέρουν το γονίδιο *pbs-5* και τον επιθυμητό υποκινητή ανασυνδυάστηκαν με τον φορέα pGC93. Για την καθολική έκφραση, το γονίδιο *pbs-5* κλωνοποιήθηκε στον φορέα L2865. Στη συνέχεια, ακολούθησε έγχυση 50 ng/μl του επιθυμητού φορέα μαζί με 5 ng/μl του συμπληρωματικού φορέα *myo-2p::GFP* ή με 50 ng/μl του pRF4 *rol-6(su1006)*. Η έγχυση έγινε μέσω μικροενέσεων στη γονάδα των σκουληκιών αγρίου τύπου. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ενέθηκαν μόνο με τον συμπληρωματικό φορέα (φορέας μετασχηματισμού). Στον **πίνακα B2** παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας B2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία στελεχών με ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5*

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')
<i>pbs-5</i> FRW	GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTAATGTGGGGCGAGACAT TCG
<i>pbs-5</i> REV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGTCATCAACACC CAGCC
<i>rgef-1p</i> FRW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTActttactgetcatcgctcgctgt
<i>rgef-1p</i> REV	GGGGACAACCTTTTGTATACAAAGTTGTcggttccgatcccccttatatcagc
<i>vha-6p</i> FRW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGGTAGGTTTTAGT CGCCCTGAAATTAAAC
<i>vha-6p</i> REV	GGGGACAACCTTTTGTATACAAAGTTGTAGAGCATGTACCTTTATA GGTGCGC
<i>myo-3p</i> FRW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAtgtgtgtgattgcttttcacaat cagt
<i>myo-3p</i> REV	GGGGACAACCTTTTGTATACAAAGTTGTcatttctagatggatctagtggtcggtg

FRW: forward (εμπρόσθιος εκκινητής), REV: reverse (ανάστροφος εκκινητής)

Πίνακας B3. Διαγονιδιακά στελέχη με ιστοειδική και καθολική υπερέφραση του γονιδίου *pbs-5*

	Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
1	BAN301	<i>Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Φθορισμός στον φάρυγγα (στέλεχος μάρτυρας)
2	BAN313	<i>Ex[let-858p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -καθολικά
3	BAN297	<i>Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
4	BAN298	<i>Ex[vha-6p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -έντερο
5	BAN296	<i>Ex[myo-3p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -μυς
6	BAN301	<i>Ex[rol-6 (su1006) + unc-119(+)]</i>	Roller (στέλεχος μάρτυρας)
7	BAN330	<i>Ex[let858p::pbs-5 + rol-6 (su1006) + unc-119(+)]</i>	Roller/ <i>pbs-5</i> -καθολικά
8	BAN325	<i>Ex[rgef-1p::pbs-5 + rol-6 (su1006) + unc-119(+)]</i>	Roller/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
9	BAN312	<i>Ex[vha-6p::pbs-5 + rol-6 (su1006) + unc-119(+)]</i>	Roller/ <i>pbs-5</i> -έντερο

Όλα τα υπόλοιπα στελέχη παράχθηκαν μέσω γενετικών διασταυρώσεων όπως περιγράφεται στην ενότητα B.2.2.

B.2.1 Παραγωγή αρσενικών σκουληκιών *C. elegans*

Για τις διασταυρώσεις απαιτείται η παρουσία αρσενικών ατόμων τα οποία προκύπτουν από τον μη διαχωρισμό των φυλετικών αδελφών χρωματίδων κατά τη μείωση (γονότυπος X0). Στους πληθυσμούς αγρίου τύπου, τα αρσενικά άτομα συναντώνται σε ένα πολύ χαμηλό ποσοστό (περίπου 0.2%). Η συχνότητα δημιουργίας αρσενικών ατόμων μπορεί να αυξηθεί σε συνθήκες στρες. Για την παραγωγή αρσενικών στελεχών, ερμαφρόδιτα στελέχη στο αναπτυξιακό στάδιο L4 εκτίθενται στους 34°C για 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα στελέχη μεταφέρονται στους 20°C και οι απόγονοι που προκύπτουν στη γενιά F1 τοποθετούνται σε νέο τρυβλίο μαζί με ερμαφρόδιτα σταδίου L4 (αναλογία 5:1) για την παραγωγή περισσότερων αρσενικών ατόμων.

B.2.2 Διασταύρωση στελεχών

Η δημιουργία διπλά ή πολλαπλά μεταλλαγμένων στελεχών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω γενετικών διασταυρώσεων των στελεχών που φέρουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις. Για τις γενετικές διασταυρώσεις τοποθετούνται αρσενικά στελέχη που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη A με ερμαφρόδιτα στελέχη (σταδίου L4) που φέρουν τη μετάλλαξη B σε τρυβλία διαμέτρου 3.5 cm σε αναλογία 5:1. Από την γενιά F1, απομονώνονται ερμαφρόδιτα σε στάδιο L4 προκειμένου να αποφευχθεί η σύζευξη με τα υπάρχοντα αρσενικά. Ακολουθώντας από τη γενιά F2 απομονώνονται τουλάχιστον δέκα ερμαφρόδιτα στελέχη σε στάδιο L4, το κάθε ένα σε ξεχωριστό τρυβλίο (1 ζώο/τρυβλίο). Αφού γεννήσει έναν επαρκή αριθμό απογόνων, το κάθε ερμαφρόδιτο της F2 που απομονώθηκε ελέγχεται για την ύπαρξη του επιθυμητού γονότυπου. Ο τρόπος ελέγχου, αναλόγως με τη μετάλλαξη ή το διαγονίδιο, γίνεται είτε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης είτε μέσω PCR (ενότητα B.3). Η ίδια διαδικασία ακολουθείται στη συνέχεια για τα άτομα της γενιάς F3 προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ομοζυγωτία για τις επιθυμητές μεταλλάξεις (γονότυπος A;B). Στην περίπτωση των εξωχρωμοσωμικών συστοιχιών DNA η επιλογή γίνεται μέσω της παρατήρησης του φαινότυπου (φθορισμός στον φάρυγγα ή φαινότυπος roller) κατά τον χειρισμό των στελεχών.

Στελέχη που δημιουργήθηκαν μέσω διασταυρώσεων

Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν η ιστοειδική έκφραση του πρωτεασώματος μπορεί να επηρεάσει την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε άλλους ιστούς, τα στελέχη που εκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *rbs-5* διασταυρώθηκαν με στελέχη που φέρουν ιστοειδικά ένα σύστημα αναφοράς της πρωτεασωματικής ενεργότητας το οποίο βασίζεται στον φθορισμό της πρωτεΐνης ZsProSensor-1 (ενότητα Γ.1.1).

Τα στελέχη που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις των στελεχών που φέρουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωματικής ενεργότητας ZsProSensor-1 στους μυς (ZsProSensor-1-μυς) με τα στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *rbs-5* ιστοειδικά ή καθολικά και έχουν ως φαινότυπο επιλογής φθορισμό στον φάρυγγα ή περιστροφική κίνηση, παρουσιάζονται στον **πίνακα B4**. Η επιλογή των απογόνων έγινε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης καθώς τα στελέχη ZsProSensor-1-μυς και ZsProSensor-1-έντερο φθορίζουν στους μυς και στο έντερο αντίστοιχα ενώ τα στελέχη που φέρουν το γονίδιο *rbs-5* φθορίζουν στον φάρυγγα ή παρουσιάζουν περιστροφική κίνηση – ανάλογα με το γονίδιο επιλογής.

Πίνακας B4. Διαγονιδιακά στελέχη με ιστοειδική και καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *rbs-5* έπειτα από διασταύρωση με τα στελέχη που φέρουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωματικής ενεργότητας ZsProSensor-1

	Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
1	NCA46	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1];Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/ μάρτυρας (GFP)

2	NCA52	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[let858p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -καθολικά (GFP)
3	NCA50	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[vha-6p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -έντερο (GFP)
4	NCA51	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc119(+)]^{ex}</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες (GFP)
5	NCA47	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo-3p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -μυς (GFP)
6	NCA30	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rol-6(su1006) +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/ μάρτυρας (roller)
7	NCA32	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[let-858p::pbs-5 + rol-6(su1006) +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -καθολικά (roller)
8	NCA30	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[vha-6p::pbs-5 + rol-6(su1006) +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -έντερο (roller)
9	NCA31	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + rol-6(su1006) +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες (roller)
10	NCA33	<i>xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo-3p::pbs-5 + rol-6(su1006) +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- μυς/ <i>pbs-5</i> -μυς (roller)
11	NCA89	<i>xzIs1[vha-6p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- έντερο/μάρτυρας
12	NCA85	<i>xzIs1[vha-6p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[let858p::pbs-5 + myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- έντερο/ <i>pbs-5</i> - καθολικά
13	NCA84	<i>xzIs1[vha-6p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- έντερο/ <i>pbs-5</i> - νευρώνες
14	NCA	<i>xzIs1[vha-6p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo3p::pbs-5 + myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1- έντερο/ <i>pbs-5</i> -μυς

Για τη διερεύνηση της επίδραση της ιστοειδικής πρωτεασωματικής υπερέκφρασης στην εξέλιξη της AD, τα στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* ιστοειδικά και καθολικά και έχουν ως φαινότυπο επιλογής φθορισμό στον φάρυγγα διασταυρώθηκαν με τα στελέχη μοντέλα για την AD, CL4176 και GMC101. Τα συγκεκριμένα στελέχη εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίο στους μυς του *C. elegans* και παραλύουν όταν εκτίθενται στους 25°C (ενότητα Γ.1.4). Η ταυτοποίηση των απογόνων έγινε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης καθώς τα στελέχη που εκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* φθορίζουν στον φάρυγγα, ενώ τα στελέχη CL4176 έχουν φαινότυπο roller και παραλύουν όταν μεταφέρονται στους 25°C, και τα στελέχη GMC101 παρουσιάζουν φθορισμό στο έντερο (λόγω του γονιδίου επιλογής που φέρουν) και επίσης παραλύουν με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 25°C. Τα στελέχη που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις παρουσιάζονται στον **πίνακα B5**.

Πίνακας B5. Διαγονιδιακά στελέχη με ιστοειδική και καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* έπειτα από διασταύρωση με τα στελέχη μοντέλα για την AD, CL4176 και GMC101

	Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
1	NCA12	<i>smg-1(cc546)I; dvIs27[myo-3p:Aβ1-42:let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]X; Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/Μάρτυρας
2	NCA9	<i>smg-1(cc546)I; dvIs27[myo-3p:Aβ1-42:let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]X; Ex[let-858p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -καθολικά
3	NCA11	<i>smg-1(cc546)I; dvIs27[myo-3p:Aβ1-42:let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]X; Ex[vha-6p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -έντερο
4	NCA10	<i>smg-1(cc546)I; dvIs27[myo-3p:Aβ1-42:let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]X; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
5	NCA15	<i>smg-1(cc546)I; dvIs27[myo-3p:Aβ1-42:let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]X; Ex[myo-3p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -μυς
6	NCA 54	<i>dvIs100[unc-54p::Aβ1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]; Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/Μάρτυρας
7	NCA 53	<i>dvIs100 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]; Ex[let-858p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -καθολικά
8	NCA 55	<i>dvIs100 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]; Ex[vha-6p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -έντερο
9	NCA 51	<i>dvIs100 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
10	NCA 49	<i>dvIs100 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP]; Ex[myo-3p::pbs-5 + myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/ <i>pbs-5</i> -μυς

Για τη διερεύνηση του μηχανισμού της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης του πρωτεασώματος μεταξύ του νευρικού και του μυϊκού ιστού πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις των στελεχών με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* τα οποία φθορίζουν στον φάρυγγα και φέρουν το σύστημα ZsProSensor-1 στους μυς με

στελέχη με α) ελαττωματικά SCVs και DCVs *unc-64(e246)*, β) ελαττωματικά SCVs *unc-31(e928)* και γ) ελαττωματικά DCVs *unc-13(e51)*. Τα SCVs και DCVs είναι οι δύο τύποι συναπτικών κυστιδίων που βρίσκονται στον προσυναπτικό νευρώνα του *C. elegans* και στα οποία εσωκλείονται νευροδιαβιβαστές (DCVs και DCVs) και νευροπεπτίδια (DCVs) (ενότητα Γ.2.1). Τα στελέχη που προέκυψαν παρουσιάζονται στον **πίνακα Β6**. Επιπλέον, τα στελέχη *unc-64* διασταυρώθηκαν με τα στελέχη με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* τα οποία φέρουν το σύστημα ZsProSensor-1 στους μυς με τα στελέχη CL4176 ή GMC101. Η ταυτοποίηση του γονοτύπου των απογόνων έγινε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης για την έκφραση του διαγονιδίου *pbs-5*, το σύστημα ZsProSensor-1, και για τον φαινότυπο των στελεχών CL4176 και GMC101 ενώ η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων *unc-64 (e246)*, *unc-31(e928)* και *unc-13(e51)* έγινε με PCR. Τα στελέχη που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις παρουσιάζονται στον **πίνακα Β6**.

Πίνακας Β6. Διαγονιδιακά στελέχη με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* έπειτα από διασταύρωση με τα στελέχη *unc-64(e246)*, *unc-31(e928)* και *unc-13(e51)*

	Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
1	NCA78	<i>unc-64(e246); xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/έλλειψη DCVs και SCVs/μάρτυρας
2	NCA77	<i>unc-64(e246); xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP+unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/έλλειψη κυστιδίων DCV και SCV/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
3	NCA72	<i>unc-31(e928); xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/έλλειψη κυστιδίων DCV/μάρτυρας
4	NCA76	<i>unc-31(e928); xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP+unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/έλλειψη κυστιδίων DCV/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
5	NCA71	<i>unc-13(e51); xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/έλλειψη κυστιδίων SCV/μάρτυρας
6	NCA73	<i>unc-13(e51); xzIs2[unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	ZsProSensor-1-μυς/έλλειψη κυστιδίων SCV/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
7	NCA100	<i>smg-1(cc546);unc-64(e246);dvIs27[myo-3p::Aβ1-42::let-851 3'UTR +rol-6(su1006)]; Ex[myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/έλλειψη DCVs και SCVs/μάρτυρας
8	NCA99	<i>smg-1(cc546);unc-64(e246);dvIs27[myo-3p::Aβ1-42::let-851 3'UTR +rol-6(su1006)]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP+ unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/έλλειψη DCVs και SCVs/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες

9	NCA96	<i>unc-64(e246); dvls100[unc-54p::Aβ1-42::unc-54 3'-UTR +mtl-2p::GFP]; Ex[myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/έλλειψη DCVs και SCVs/μάρτυρας
10	NCA88	<i>unc-64(e246); dvls100[unc-54p::Aβ1-42::unc-54 3'-UTR +mtl-2p::GFP]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP +unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -μυς/έλλειψη DCVs και SCVs/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες

Τέλος, στον **πίνακα B7** παρουσιάζονται τα στελέχη που δημιουργήθηκαν έπειτα από διασταύρωση των στελεχών με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* με το στέλεχος UA198 στο οποίο το ανθρώπινο Aβ₁₋₄₂ πεπτιδίο εκφράζεται στους γλουταμινεργικούς νευρώνες. Στο στέλεχος UA198, οι γλουταμινεργικοί νευρώνες είναι ορατοί λόγω της πρωτεΐνης GFP που φέρουν. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα στελέχη φθορίζουν στον φάρυγγα λόγω της πρωτεΐνης mCherry που έχει χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας μετασχηματισμού για το Aβ₁₋₄₂ πεπτιδίο. Η ταυτοποίηση του γονοτύπου των απογόνων έγινε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης καθώς τα στελέχη που φέρουν το γονίδιο *pbs-5* φθορίζουν στον φάρυγγα ενώ τα στελέχη UA198 φθορίζουν στους γλουταμινεργικούς νευρώνες και στον φάρυγγα.

Πίνακας B7. Διαγονιδιακά στελέχη με νευροειδική έκφραση του γονιδίου *pbs-5* και έκφραση του ανθρώπινου Aβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους γλουταμινεργικούς νευρώνες

	Στέλεχος	Γονότυπος	Περιγραφή
1	NCA79	<i>baIn34[eat-4p::Aβ1-42+myo-2p::mCherry]; adIs1240[eat-4p::GFP]; Ex[myo-2p::GFP + unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -γλουταμινεργικοί νευρώνες/μάρτυρας
2	NCA93	<i>baIn34[eat-4p::Aβ1-42 +myo-2p::mCherry]; adIs1240[eat-4p::GFP]; Ex[rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP+unc-119(+)]</i>	Aβ ₁₋₄₂ -γλουταμινεργικοί νευρώνες/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες

B.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στις περιπτώσεις που η ταυτοποίηση του γονοτύπου των στελεχών που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις δεν ήταν εφικτή μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης, ο έλεγχος έγινε μέσω PCR. Ο συγκεκριμένος τρόπος ελέγχου έγινε για τους νηματώδεις που διασταυρώθηκαν με τα στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις για τα γονίδια *unc-13*, *unc-31* και *unc-64*.

Το DNA ενός ενήλικου *C. elegans* αποτελεί επαρκές υλικό για να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα σε μία αντίδραση PCR. Για κάθε σκώληκα αναμιγνύεται ίσος όγκος διαλύματος λύσης 2X και dH₂O και προστίθεται πρωτεΐνωση K σε τελική συγκέντρωση 200 μg/ml. Στη συνέχεια, ένας όγκος 10 μl προστίθεται σε έναν σωλήνα 0.5 ml και τοποθετείται μέσα ένα ζώο από το προς μελέτη στέλεχος το οποίο υπόκειται στην εκάστοτε διασταύρωση (ένα ερμαφρόδιτο της γενιάς F2 ή F3 όπως περιγράφεται στο B.2.2). Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης στους 65°C για 90 λεπτά και στους 98°C για 30 λεπτά (απενεργοποίηση πρωτεΐνωσης K). 5 μl του δείγματος χρησιμοποιούνται ως μήτρα σε αντίδραση PCR με σύσταση 7.5 μl διαλύματος αντίδρασης (OneTaq® 2X

Master Mix), 0.3 µl από τον κάθε εκκινητή που βρίσκεται σε διάλυμα 10uM και 1.9 µl dH₂O. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε 120V για 40 λεπτά σε 1.5% πήκτωμα αгарόζης σε διάλυμα 1x TAE (40mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) με 0.2 µg/ml EtBr. Η οπτικοποίηση έγινε με το σύστημα ChemiDoc MP (Bio-Rad). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα B8**.

Πίνακας B8 Εκκινητές PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')
unc-64 wt FRW	CGAAAGAATTTGTTGATCGAAC
unc-64 e246 FRW	CGAAAGAATTTGTTGATCGAAT
unc-64 REV	CAAATTATCAGTAGAGCGCAT
unc-13 wt FRW	TGAAGTTGATCGTGGATCAC
unc-13 e51 FRW	TGAAGTTGATCGTGGATCAT
unc-13 REV	ATGTTGTTTCCAGTTGTCTT
unc-31 FRW	AGATTGAGGTCGTGAGAGAA
unc-31 REV	ATGGCGGCTGTAAGATAGAT

FRW: forward (εμπρόσθιος εκκινητής), REV: reverse (ανάστροφος εκκινητής)

Διαλύματα

Διάλυμα λύσης 2X

- 50 mM KCl
- 10 mM Tris-HCl pH 8.3
- 2.5 mM MgCl₂
- 0.45% Triton X-100
- 0.45% Tween 20

Διάλυμα TAE 50x (pH 8)

- 2 M Tris
- 0.05 M EDTA

Πρωτεΐνάση K (προστίθεται πριν τη χρήση σε τελική συγκέντρωση 200 µg/ml)

B.4 Συγχρονισμός πληθυσμών

Αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη

- 10% NaOH 5 N
- 20% Χλωρίνη (5% NaClO)

Ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι συγχρονισμού των πληθυσμών. Στη μία περίπτωση ένας αριθμός ενήλικων ατόμων (περίπου 20) τοποθετείται σε ένα τρυβλίο NGM για

συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (1-2 ώρες) προκειμένου να γεννήσουν έναν αριθμό αυγών και στη συνέχεια τα ενήλικα άτομα απομακρύνονται από το τρυβλίο. Τα τρυβλία με τα αυγά τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο μέχρι να φτάσουν στο κατάλληλο στάδιο που απαιτείται για την εκάστοτε πειραματική διαδικασία. Κατά τη δεύτερη μέθοδο γίνεται επεξεργασία των στελεχών με αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη το οποίο αποσυνθέτει τα ζώα αφήνοντας άθικτα τα αυγά. Πιο αναλυτικά, σε σωλήνες των 1.5 ml συλλέγονται σε 0.5 ml διαλύματος αλκαλικού υποχλωρίτη τα ζώα ενός πιάτου με μικτό πληθυσμό, ο οποίος περιέχει αρκετά ενήλικα αναπαραγωγικώς ενεργά άτομα. Ακολουθεί επώαση των νηματωδών στο διάλυμα για 10 λεπτά με έντονη ανάδευση (vortex), μέχρι να αποσυντεθούν πλήρως. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 10000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθούν πλύσεις του ιζήματος (αυγών) με 5 ml διαλύματος M9. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και στο τέλος, τα αυγά διαμοιράζονται σε τρυβλία NGM επιστρωμένα με καλλιέργεια OP50. Τα τρυβλία με τα αυγά τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο μέχρι να φτάσουν στο κατάλληλο στάδιο που απαιτείται για την εκάστοτε πειραματική διαδικασία.

B.5 Προσδιορισμός του προσδόκιμου ζωής

Τα πειράματα προσδιορισμού του προσδόκιμου ζωής έγιναν παρουσία της ουσίας FUdR (5'-fluorodeoxyuridine) η οποία παρεμποδίζει την εκκόλαψη των αυγών. Κατά αυτόν τον τρόπο, αποφεύγεται η πιθανότητα ανάμιξης του αρχικού πληθυσμού της μελέτης με τους νέους απογόνους. Για τις δοκιμές προσδιορισμού του προσδόκιμου ζωής προετοιμάζονται τρυβλία NGM διαμέτρου 6 cm στα οποία προστίθεται φρέσκια καλλιέργεια βακτηρίων και αφήνεται να αναπτυχθεί στα τρυβλία για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί έκθεση των τρυβλίων σε UV ακτινοβολία, προκειμένου να αδρανοποιηθεί η βακτηριακή καλλιέργεια ώστε να μην είναι ικανή να μεταβολίσει την ουσία FUdR, η οποία προστίθεται στο στάδιο αυτό σε τελική συγκέντρωση 20 μ M. Για κάθε συνθήκη δοκιμής, επιλέγονται 100-120 άτομα προνυμφικού σταδίου L4 τα οποία μοιράζονται στα τρυβλία (30 ζώα/τρυβλίο) (ημέρα 0 της έναρξης του πειράματος). Κάθε δύο ημέρες τα σκουλήκια μεταφέρονται σε νέα τρυβλία NGM με φρέσκια καλλιέργεια βακτηρίων προκειμένου να αποφευχθεί ο υποσιτισμός των ζώων ή ενδεχόμενη μόλυνση από άλλα βακτήρια ή μύκητες, συνθήκες που μπορεί να επηρεάσουν το προσδόκιμο ζωής. Στη συνέχεια ακολουθεί καθημερινή καταγραφή του πληθυσμού όπου μετρούνται ως νεκρά τα άτομα που δεν ανταποκρίνονται στο άγγιγμα. Επιπλέον, σημειώνονται και τα άτομα τα οποία απομακρύνονται από τη μελέτη (censored) (αυτά τα άτομα συμπεριλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα χαμένα άτομα, αφυδατωμένα στα τοιχώματα, άτομα στα οποία παρατηρείται εσωτερική εκκόλαψη των αυγών τους, ενώ τα άτομα που έχουν εκτεθεί σε μόλυνση απομακρύνονται από τη μελέτη. Η μέση διάρκεια ζωής καθορίζεται από την ημέρα όπου το 50% του πληθυσμού έχει πεθάνει.

B.6 Δοκιμές παράλυσης

Οι δοκιμές παράλυσης πραγματοποιήθηκαν στους νηματώδεις που διασταυρώθηκαν με τα στελέχη CL4176 και GMC101. Για τις παραλύσεις

χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία NGM με φρέσκια καλλιέργεια OP50. Για τις παραλύσεις των διαγονιδιακών στελεχών που διασταυρώθηκαν με το στέλεχος CL4176, 150-300 ζώα προνυμφικού σταδίου L3 μεταφέρονται από τους 16°C στους 25°C και 16 ώρες μετά (στάδιο L4), ξεκινάει η καταμέτρηση παράλυσης των ζώων ανά μία ώρα μέχρι να παραλύσει ολόκληρος ο πληθυσμός (περίπου 10-14 ώρες). Για τα διαγονιδιακά ζώα που διασταυρώθηκαν με το στέλεχος GMC101, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με 40 μM FUdR. 80-120 ζώα σταδίου L4 τοποθετήθηκαν στα τρυβλία και μόλις έφτασαν στο στάδιο του νεαρού ενήλικου μεταφέρθηκαν από τους 20°C στους 25°C και 12 ώρες αργότερα ξεκίνησε η καταμέτρηση των παράλυτων ζώων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ανά 12 ώρες μέχρι να παραλύσει ολόκληρος ο πληθυσμός. Και για τα δύο μοντέλα, τα ζώα θεωρήθηκαν ως παράλυτα εάν δεν μπορούσαν να μεταδώσουν το κύμα της κίνησης σε ολόκληρο σώμα τους από τη μέση μέχρι την ουρά.

B.7 Φαινοτυπική ανάλυση

B.7.1 Χρόνος ανάπτυξης

Για την εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης, ένας αριθμός ενήλικων ατόμων (περίπου 30) αφέθηκε σε τρυβλίο NGM προκειμένου να εναποθέσει αυγά για περίπου 15 λεπτά. Τα ενήλικα ζώα αφαιρέθηκαν από το πιάτο, ακολούθησε συχνή παρακολούθηση του πληθυσμού και καταγράφηκε ο χρόνος που χρειάστηκε για να φτάσει το 50% των ζώων από αυγό στο στάδιο L4.

B.7.2 Καταμέτρηση γονιμότητας/ωοτοκίας

Για την καταμέτρηση της γονιμότητας/ωοτοκίας τοποθετήθηκαν τουλάχιστον 10 άτομα ανά συνθήκη σε διαφορετικά τρυβλία (1 ζώο/τρυβλίο). Τα ζώα ανά δύο μέρες μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο NGM και καταμετράται ο συνολικός αριθμός των αυγών που εναποθέτουν μέχρι και την εναπόθεση του τελευταίου αυγού. Παράλληλα καταμετράται και ο αριθμός των ζώων που εκκολάφθηκε.

B.7.3 Φαρυγγικός παλμός

Η καταμέτρηση του φαρυγγικού παλμού εκτιμήθηκε στην πρώτη και στη δέκατη ημέρα της ενήλικης ζωής. Η μέτρηση έγινε σε 20 ζώα ανά συνθήκη και συγκεκριμένα μετρήθηκαν οι παλμοί που πραγματοποιεί ο φάρυγγας ανά λεπτό.

B.7.4 Ρυθμός κένωσης

Η εκτίμηση του ρυθμού κένωσης, δηλαδή του χρονικού διαστήματος μεταξύ δύο κενώσεων, πραγματοποιήθηκε σε 20 ζώα ανά συνθήκη στην πρώτη και στην δέκατη ημέρα της ενήλικης ζωής.

B.8 Έκθεση σε παράγοντες οξειδωτικού στρες

Για την έκθεση των στελεχών σε παράγοντες οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία NGM με φρέσκια καλλιέργεια OP50 η οποία αφήνεται να αναπτυχθεί επάνω στο άγαρ για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί έκθεση των τρυβλίων σε UV ακτινοβολία προκειμένου να αδρανοποιηθεί η βακτηριακή καλλιέργεια ώστε να μην είναι ικανή να μεταβολίσει τις υπό μελέτη ουσίες. Οι παράγοντες οξειδωτικού στρες paraquat και NaN₃ διαλύθηκαν σε ddH₂O και διάλυμα M9, αντίστοιχα, και ένας

όγκος 200 μl τοποθετήθηκε στα τρυβλία. Το paraquat δρα ως παράγοντας παραγωγής σουπεροξειδίου από τα μιτοχόνδρια η οποία προκαλεί οξειδωτική βλάβη στα συγκεκριμένα κυτταρικά οργανίδια (Cochémé & Murphy, 2008). Η κύρια τοξική δράση του NaN_3 είναι η αναστολή του ενζύμου COX (Cytochrome c Oxidase, ένα ένζυμο των μιτοχονδρίων με σημαντικό ρόλο στον αερόβιο μεταβολισμό και στη μιτοχονδριακή λειτουργία) της ETC (Bennett *et al*, 1996). Νηματώδεις σκώληκες στο προνυμφικό στάδιο L4 τοποθετούνται σε πιάτα με paraquat σε συγκέντρωση 2 mM και κάθε μέρα μεταφέρονται σε φρέσκα πιάτα και καταμετράται η επιβίωσή τους (με παρόμοιο τρόπο όπως περιγράφεται στο B.5). Για την έκθεση σε NaN_3 σε τελική συγκέντρωση 180 μM, νεαρά ενήλικα άτομα τοποθετούνται στα τρυβλία για 24 ώρες και στη συνέχεια τα στελέχη μεταφέρονται σε τρυβλία χωρίς NaN_3 για 24 ώρες και καταμετράται το ποσοστό επιβίωσής τους.

B.9 Έκθεση σε νευροδιαβιβαστές

Για την έκθεση των στελεχών σε νευροδιαβιβαστές χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία NGM με φρέσκια καλλιέργεια OP50 η οποία αφήνεται να αναπτυχθεί επάνω στο άγαρ για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί έκθεση των τρυβλίων σε UV ακτινοβολία προκειμένου να αδρανοποιηθεί η βακτηριακή καλλιέργεια ώστε να μην είναι ικανή να μεταβολίσει τις υπό μελέτη ουσίες. Κατάλληλες συγκεντρώσεις ακετυλοχολίνης (τελικές συγκεντρώσεις 50 μM - 100 mM), γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (τελικές συγκεντρώσεις 150 μM - 30 mM), γλουταμινικού οξέος (τελικές συγκεντρώσεις 15 μM - 15 mM), οκτοπαμίνης (τελικές συγκεντρώσεις 40 μM - 20 mM), σεροτονίνης (τελικές συγκεντρώσεις 1.5 μM - 73 μM), ντοπαμίνης (τελικές συγκεντρώσεις 5.2 μM - 158 μM) και τυραμίνης (τελικές συγκεντρώσεις 14 μM - 143 μM) διαλύονται σε M9 και ένας όγκος 200 μl απλώνεται στα τρυβλία. Στελέχη προνυμφικού σταδίου L3 τοποθετούνται στη συνέχεια στα τρυβλία και εκτίθενται στην κάθε συνθήκη για 20 ώρες. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών *unc-13* και *unc-31* στο στάδιο του νεαρού ενήλικου ζώου και των στελεχών *unc-64* στο στάδιο L4.

B.10 Εκτίμηση πρωτεασωματικής ενεργότητας σε καθαρό πρωτεάσωμα

Για την εκτίμηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L), 0.5 μg καθαρού, απομονωμένου ανθρώπινου 20S πρωτεασώματος αναμίχθηκαν με γλουταμινικό οξύ σε συγκεντρώσεις από 15 μM έως 15 mM και με το υπόστρωμα Suc-LLVY-AMC (Succinyl-Leucine-Leucine-Valine-Tyrosine-7-amino-4-methylcoumarin) σε τελική συγκέντρωση 100 μM σε τελικό όγκο 100 μL/φρεάτιο σε μαύρη πλάκα 96 φρεατίων (5 τεχνικές επαναλήψεις ανά δείγμα). Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση φθορισμού της φθορίζουσας ένωσης AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) έπειτα από τη διάσπαση και απομάκρυνσή της από το υπόστρωμα LLVY. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως ενεργοποιητής του 20S πρωτεασώματος, σε τελική συγκέντρωση 0.01% και ως αρνητικός μάρτυρας, ο πρωτεασωμικός αναστολέας MG132 σε τελική συγκέντρωση 20 μM. Η ανίχνευση του φθορισμού έγινε σε 380/460 nm διέγερση/εκπομπή, κάθε 5 λεπτά για 1 ώρα σε συσκευή σάρωσης πλακών TECAN (Tecan Ltd., Switzerland).

B.10 Μικροσκοπία

Για τις μεθόδους που απαιτούν μικροσκοπική παρατήρηση και ανάλυση φθορισμού (ενότητες B.10.1-B.10.3), οι νηματώδεις αναισθητοποιήθηκαν με λεβαμιζόλη (50 mM) και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε μία επίστρωση πηκτώματος αгарόζης 2%. Η μικροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με το σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας λέιζερ Leica TCS SPE.

B.10.1 Εκτίμηση πρωτεασωμικής ενεργότητας σε στελέχη που φέρουν σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς ή στο έντερο

Για τα ζώα που εκφράζουν το σύστημα ZsProSensor-1 στους μυς (ενότητα Γ1.1), λήφθηκαν εικόνες από το πρόσθιο τμήμα του ζώου σταδίου L4 με τη χρήση αντικειμενικού φακού 20x, ενώ για τα ζώα που εκφράζουν το σύστημα στο έντερο, οι εικόνες λήφθηκαν με αντικειμενικό φακό 10x. Η ανίχνευση του φθορισμού έγινε σε 470/525 nm διέγερση/εκπομπή και οι παράμετροι (π.χ. πολλαπλές οπτικές τομές κατά άξονα Z, τάση φωτοπολλαπλασιαστή) ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το στέλεχος μάρτυρα και παρέμειναν σταθερές κατά την παρατήρηση των υπόλοιπων διαγονιδιακών ατόμων. Ο υπολογισμός της έντασης φθορισμού έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ σε εικόνες που προκύπτουν από υπέρθεση των πολλαπλών οπτικών τομών (maximum projection).

B.10.2 Εκτίμηση της συσσώρευσης φθοριζουσών ουσιών

Η εκτίμηση της συσσώρευσης φθοριζουσών ουσιών έγινε τη 10^η ημέρα της ενήλικης ζωής των στελεχών και η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε με φακό 10x. Για την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν 3 σετ φίλτρων α) DAPI 405/460 nm διέγερση/εκπομπή, β) GFP 488/525 διέγερση/εκπομπή και, γ) TRITC 532/610 nm διέγερση/εκπομπή. Οι παράμετροι (π.χ. πολλαπλές οπτικές τομές κατά άξονα Z, τάση φωτοπολλαπλασιαστή) ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το στέλεχος μάρτυρα και παρέμειναν σταθερές κατά την παρατήρηση των υπόλοιπων διαγονιδιακών ατόμων. Ο υπολογισμός της έντασης φθορισμού έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ σε εικόνες που προκύπτουν από υπέρθεση των πολλαπλών οπτικών τομών (maximum projection).

B.10.3 Καταμέτρηση γλουταμινεργικών νευρώνων στο στέλεχος UA198

Η οπτική καταμέτρηση των γλουταμινεργικών νευρώνων σε διάφορα διαγονιδιακά ζώα έγινε σε στελέχη που διασταυρώθηκαν με το στέλεχος UA198, την 1^η και την 6^η ημέρα της ενήλικης ζωής των ζώων. Οι εικόνες λήφθηκαν από το οπίσθιο τμήμα του ζώου με τη χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού 40x. Η ανίχνευση του φθορισμού έγινε σε 488/525 nm διέγερση/εκπομπή και οι παράμετροι (π.χ. πολλαπλές οπτικές τομές κατά άξονα Z, τάση φωτοπολλαπλασιαστή) ρυθμίστηκαν σύμφωνα με το στέλεχος μάρτυρα και παρέμειναν σταθερές κατά την παρατήρηση των υπόλοιπων διαγονιδιακών ατόμων.

B.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism (Prism Windows 5.04, San Diego, USA). Οι αναλύσεις σύγκρισης του μέσου όρου μεταξύ δύο ομάδων έγιναν με παραμετρικό t-test. Η σύγκριση περισσότερων από δύο ομάδων έγινε με μη παραμετρικό τεστ ανάλυσης διακύμανσης (one way ANOVA) με διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις (Kruskal-Wallis test with Dunn's correction). Για τις καμπύλες επιβίωσης και παράλυσης χρησιμοποιήθηκε ανάλυση Mantel-Cox log-rank. Η στατιστική σημαντικότητα απεικονίζεται ως εξής: ****υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τιμή $p < 0.0001$, ***υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τιμή $p < 0.001$, **υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τιμή $p < 0.01$, *υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τιμή $p < 0.05$, ns υποδηλώνει στατιστικά μη σημαντικές διαφορές με τιμή $p > 0.05$.

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Ιστοειδική ρύθμιση του πρωτεασώματος στον *C. elegans* και η επίδρασή της στη γήρανση και την AD

Γ.1.1 Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες, στο έντερο ή στους μυς ενισχύει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στους μυς – αυτόνομη/μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση

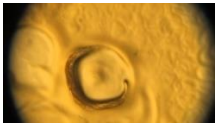
Αρχικός στόχος της συγκεκριμένης διατριβής ήταν η μελέτη της ενδεχόμενης μη αυτόνομης ρύθμισης του πρωτεασώματος, δηλαδή το κατά πόσο η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε έναν ιστό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε κάποιον απομακρυσμένο ιστό. Ένας αριθμός μελετών υποδεικνύει πως στη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση των πρωτεοστατικών μηχανισμών έχουν σημαντικό ρόλο αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νευρώνων, του εντέρου και των μυών (Taylor *et al*, 2014; Morimoto, 2020; Hodges *et al*, 2022). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών αυτών ιστών, ως προς τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση της πρωτεόστασης, έχει περιγραφεί ως απόκριση σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα, αλλά και ως απόκριση στη ρύθμιση μηχανισμών του ΔΠ, και στη ρύθμιση μονοπατιών και χειρισμών που επηρεάζουν το προσδόκιμο ζωής και την εξέλιξη της γήρανσης (π.χ. μονοπάτι σηματοδότησης ινσουλίνης, αφαίρεση γονάδας).

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν το πρωτεάσωμα υπόκειται σε μη αυτόνομη ρύθμιση, δημιουργήθηκαν αρχικά, τρία διαγονιδιακά στελέχη στα οποία έχει ενισχυθεί η έκφραση του πρωτεασώματος στους νευρώνες, στο έντερο και στους μυς. Για τη δημιουργία των στελεχών, στηριχθήκαμε στα αποτελέσματα προγενέστερης έρευνας του εργαστηρίου μας, σύμφωνα με την οποία η υπερέκφραση του γονιδίου της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας (*pbs-5* στον σκώληκα) σε όλους τους ιστούς του *C. elegans* (καθολικά), οδηγεί σε ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και ανθεκτικότητα έναντι του οξειδωτικού και του πρωτεοτοξικού στρες (Chondrogianni *et al*, 2015a). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και μέσω της υπερέκφρασης ορθολόγων/ομολόγων της β5 υπομονάδας στη δροσόφιλα (*Prosβ5*) και σε ποντίκι (PSMB5) (Nguyen *et al*, 2019; Chocron *et al*, 2022).

Μέσω μικροενέσεων δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* υπό τη ρύθμιση ιστοειδικών υποκινητών για τον νευρικό ιστό, το έντερο και τους μυς. Συγκεκριμένα, για τη νευροειδική υπερέκφραση χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής *rgef-1* συζευγμένος με το γονίδιο *pbs-5* (*rgef-1p::pbs-5*, για λόγους απλούστευσης το στέλεχος θα αναφέρεται εφεξής ως *pbs-5*-νευρώνες), για την ιστοειδική υπερέκφραση στο έντερο χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής *vha-6* (*vha-6p::pbs-5*, εφεξής *pbs-5*-έντερο) και για την ιστοειδική υπερέκφραση στους μυς χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής *myo-3* (*myo-3p::pbs-5*, εφεξής *pbs-5*-μυς). Επιπλέον, δημιουργήθηκε και ένα στέλεχος το οποίο υπερεκφράζει το γονίδιο *pbs-5* σε όλους τους ιστούς υπό την έκφραση του υποκινητή *let-858* (*let-858p::pbs-5*, *pbs-5*-καθολικά). Όλα τα στελέχη ενέθηκαν ταυτόχρονα και με έναν συμπληρωματικό φορέα ως μάρτυρα μετασχηματισμού, που εκφράζει έναν δείκτη με βάση τον οποίο μπορούν να αναγνωριστούν και να επιλεγθούν τα διαγονιδιακά ζώα. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί συμπληρωματικοί φορείς, ο πλασμιδιακός φορέας pPD122.11 που εκφράζει την φθορίζουσα πρωτεΐνη

GFP(S65C) υπό τη ρύθμιση του ιστοειδικού για τον φάρυγγα υποκινητή *myo-2* (*myo-2p::GFP*), με αποτέλεσμα τα μετασχηματισμένα στελέχη να φθορίζουν στον φάρυγγα, και ο πλασμιδιακός φορέας pRF4 που φέρει ως γονίδιο επιλογής το *rol-6(su1006)*, με αποτέλεσμα τα μετασχηματισμένα στελέχη να εμφανίζουν τον φαινότυπο roller (περιστροφική αντί για ημιτονοειδή κίνηση). Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκαν φαινοτυπικά δύο διαφορετικές ομάδες διαγονιδιακών στελεχών *C. elegans* σύμφωνα με τον μάρτυρα μετασχηματισμού που φέρουν, και τα οποία υπερέκφραζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5* (πίνακας Γ1). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες φέρουν μόνο τον αντίστοιχο μάρτυρα μετασχηματισμού. Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β3** στην ενότητα Β. Υλικά και Μέθοδοι.

Πίνακας Γ1. Διαγονιδιακά ζώα με ιστοειδική και καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5*.

Εικόνα φαινοτύπου	Φαινότυπος/υπερέκφραση <i>pbs-5</i>
 Φθορισμός στον φάρυγγα	Φθορισμός στον φάρυγγα (στέλεχος μάρτυρας)
	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -καθολικά
	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -έντερο
	Φθορισμός στον φάρυγγα/ <i>pbs-5</i> -μυς
 Roller (περιστροφική κίνηση)	Roller (στέλεχος μάρτυρας)
	Roller/ <i>pbs-5</i> -καθολικά
	Roller/ <i>pbs-5</i> -νευρώνες
	Roller/ <i>pbs-5</i> -έντερο
	Roller/ <i>pbs-5</i> -μυς

Στη συνέχεια, τα στελέχη που δημιουργήθηκαν διασταυρώθηκαν με στελέχη που φέρουν ένα φθορίζον σύστημα αναφοράς της πρωτεασωματικής ενεργότητας ιστοειδικά στους μυς. Το συγκεκριμένο σύστημα βρίσκεται υπό την έκφραση του ιστοειδικού για τους μυς υποκινητή *unc-54* και επιτρέπει την *in vivo* παρατήρηση της λειτουργίας του πρωτεασώματος καθώς βασίζεται στον φθορισμό της πρωτεΐνης ZsProSensor-1 και στη μείωση αυτού κατά την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη ZsProSensor-1 αποτελείται από την φθορίζουσα πρωτεΐνη ZsGreen (Ex/Em 496/506 nm) συζευγμένη με το καρβοξυτελικό κομμάτι της mODC (mouse Ornithine Decarboxylase) το οποίο αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα χωρίς να χρειάζεται σήμανση με ουμπικιτίνη (Murakami *et al*, 1992). Το σύστημα που χρησιμοποιήσαμε αποτελείται από δύο μοτίβα αλληλεπίδρασης με την ουμπικιτίνη (Ubiquitin-Interactive Motifs - UIM) της 19S RPN-10 πρωτεασωματικής υπομονάδας του *C. elegans*, συζευγμένα με το N-τελικό άκρο της φθορίζουσας πρωτεΐνης ZsProSensor-1 (*unc-54p::UIM2::ZsProSensor-1*) (εφεξής ZsProSensor-1-μυς). Η σύζευξη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα το σύστημα αναφοράς να προσδένεται σε πολυ-ουμπικιτυλιωμένες πρωτεΐνες. Το σύστημα αναφοράς όταν διεγερθεί στα 496 nm παράγει φθορισμό πράσινου χρώματος ο οποίος μεταβάλλεται ανάλογα με τη λειτουργία του πρωτεασώματος. Παρουσία ενεργού πρωτεασώματος ο φθορισμός μειώνεται λόγω

αποικοδόμησης των πολυ-ουμπικιτυλιωμένων πρωτεϊνών και συνεπώς και της φθορίζουσας πρωτεΐνης ZsProSensor-1 ενώ αντίστροφα αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων φθορισμού (Matilainen *et al*, 2016) (**εικόνα Γ1α**).

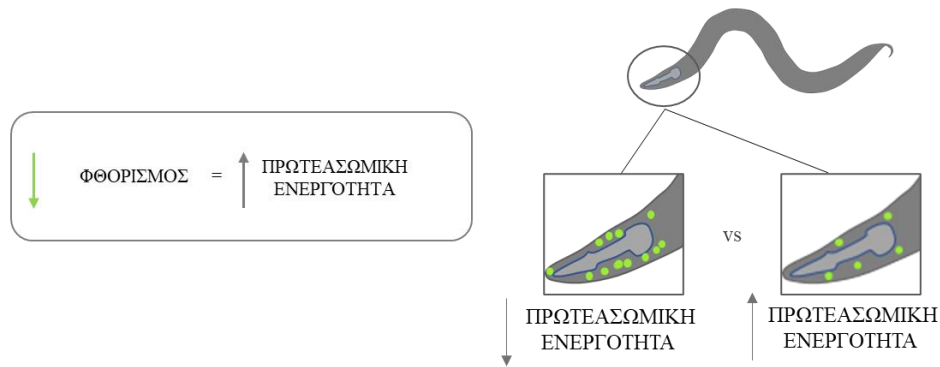
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις με τα στελέχη που φθορίζουν στον φάρυγγα -λόγω του μάρτυρα μετασχηματισμού- και προέκυψαν τέσσερα διαγονιδιακά στελέχη με ιστοειδική ή καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5*, τα οποία εκτός από την περιοχή του φάρυγγα φθορίζουν και στους μυς λόγω του συστήματος αναφοράς της πρωτεασωμικής λειτουργίας:

- i) ZsProSensor-1-μυς; *pbs-5*-καθολικά (φθορισμός στον φάρυγγα)
- ii) ZsProSensor-1-μυς; *pbs-5*-νευρώνες (φθορισμός στον φάρυγγα)
- iii) ZsProSensor-1-μυς; *pbs5*-έντερο (φθορισμός στον φάρυγγα)
- iv) ZsProSensor-1-μυς; *pbs-5*-μυς (φθορισμός στον φάρυγγα)

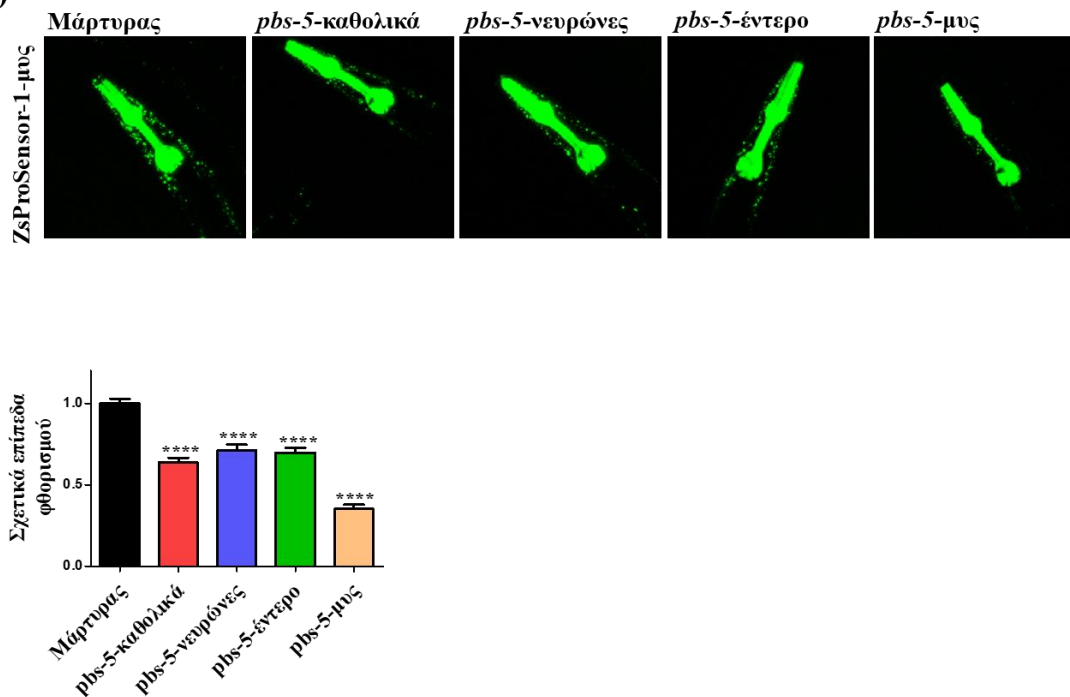
Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα B4** στην ενότητα B. Υλικά και Μέθοδοι.

Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η πρωτεασωμική λειτουργία στους μυς των παραπάνω στελεχών. Για την ποσοτικοποίηση του σήματος που προκύπτει από την πρωτεασωμική ενεργότητα, επιλέχθηκε η περιοχή γύρω από τον φάρυγγα στο εμπρόσθιο τμήμα του σκώληκα και αποκλείστηκε το σήμα που προέρχεται από τον φάρυγγα (το οποίο οφείλεται στον μάρτυρα μετασχηματισμού) (**εικόνα Γ1α**). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ1β**.

α)



β)



Εικόνα Γ1. Ανίχνευση μη αυτόνομης κυτταρικής ενεργοποίησης του πρωτεασώματος. α) Σχηματική περιγραφή των μεταβολών του σήματος φθορισμού στους μυς του *C. elegans* όπου εκφράζεται το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας. Αύξηση των επιπέδων φθορισμού μεταφράζεται σε μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και αντίστροφα. β) Ενδεικτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών *pbs-5-καθολικά*, *pbs-5-νευρώνες*, *pbs-5-έντερο* και *pbs-5-μυς* τα οποία φέρουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς (ZsProSensor-1-μυς) και τον μάρτυρα μετασχηματισμού *myo-2p::GFP* (πάνω). Ποσοτικοποιήσεις των σημάτων (κάτω). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, ****p τιμή < 0.0001. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της έντασης του φθορισμού παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα.

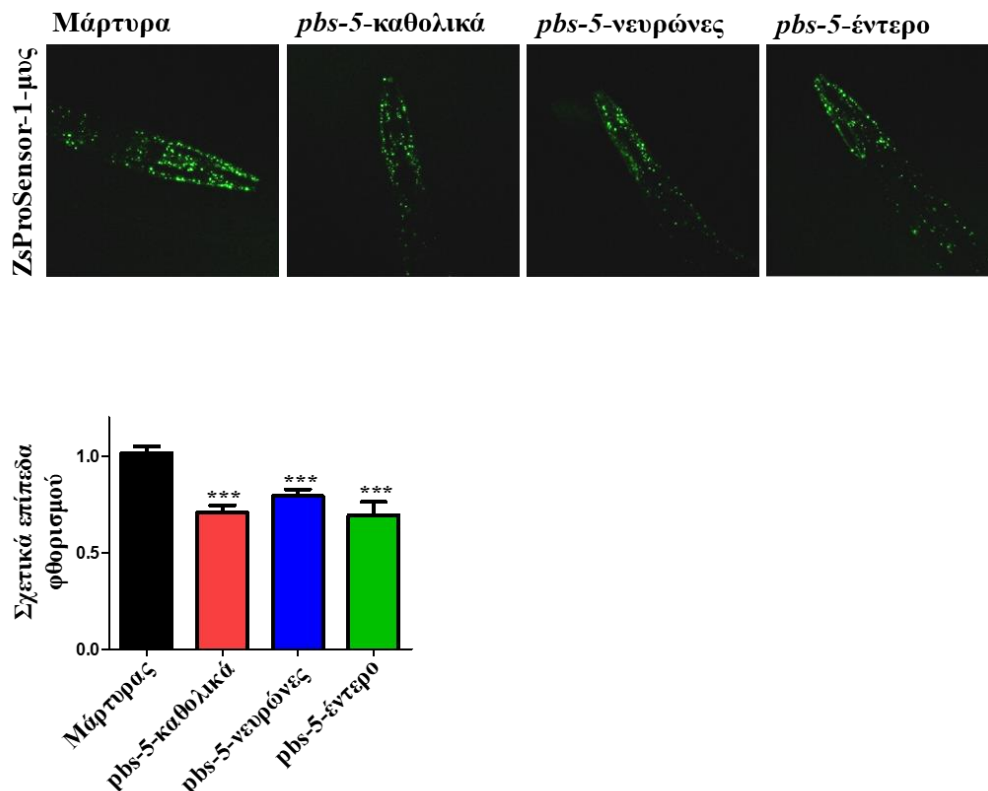
Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα στελέχη που υπερεκφράζουν καθολικά το γονίδιο *pbs-5* παρουσιάζουν αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στους μυς (μειωμένα επίπεδα φθορισμού). Τα στελέχη *pbs-5*-μυς παρουσιάζουν αυξημένη δράση του πρωτεασώματος στον ίδιο ιστό, αποτέλεσμα που συνάδει με αυτόνομη ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας (υπερέκφραση στους μυς, αυξημένη ενεργότητα στους μυς). Είναι όμως αξιοσημείωτο πως παρόμοια αποτελέσματα (μειωμένος φθορισμός στους μυς που υποδηλώνει αυξημένη πρωτεασωμική ενεργότητα) παρατηρήσαμε και στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες και *pbs-5*-έντερο. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* ιστοειδικά στον νευρικό ιστό ή στο έντερο είναι αρκετή για να οδηγήσει σε αυξημένη πρωτεασωμική ενεργότητα στους μυς του ζώου. **Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει την μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση της πρωτεασωμικής λειτουργίας.**

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα και να αποκλειστούν τυχόν επιδράσεις του μάρτυρα μετασχηματισμού, τα στελέχη ZsProSensor-1-μυς διασταυρώθηκαν με τα στελέχη τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* ιστοειδικά ή καθολικά και φέρουν τον μάρτυρα μετασχηματισμού *rol-6(su1006)* (**πίνακας Γ1**). Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν τέσσερα διαγονιδιακά στελέχη:

- i. ZsProSensor-1-μυϊκός ιστός/*pbs-5*-καθολικά (roller)
- ii. ZsProSensor-1-μυϊκός ιστός/*pbs-5*-νευρώνες (roller)
- iii. ZsProSensor-1-μυϊκός ιστός/*pbs-5*-έντερο (roller)
- iv. ZsProSensor-1-μυϊκός ιστός/*pbs-5*-μυς (roller)

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β4** στην ενότητα Β. Υλικά και Μέθοδοι.

Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η πρωτεασωμική λειτουργία στους μυς των παραπάνω στελεχών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ2** στην οποία όμως απουσιάζουν τα αποτελέσματα των στελεχών *pbs-5*-μυς. Παρόλο ότι η δημιουργία των στελεχών *pbs-5*-μυς (φαινότυπος roller) ήταν επιτυχής, δεν ήταν δυνατή η διατήρηση του πληθυσμού και άρα η αξιοποίησή του, καθώς μετά από λίγες γενιές παρατηρήθηκε απώλεια της εξωχρωμοσωμικής συστοιχίας.



Εικόνα Γ2. Ανίχνευση μη αυτόνομης κυτταρικής ενεργοποίησης του πρωτεασώματος. Ενδεικτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών *pbs-5*-καθολικά, *pbs-5*-νευρώνες, *pbs-5*-έντερο, τα οποία φέρουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς (ZsProSensor-1-μυς) και τον μάρτυρα μετασχηματισμού *rol-6(su1006)* (πάνω). Ποσοτικοποιήσεις των σημάτων (κάτω). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, *** p τιμή < 0.001. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της έντασης του φθορισμού παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα.

Τα αποτελέσματά μας ως προς τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος παρουσιάζουν επαναληψιμότητα ανεξάρτητη από τον μάρτυρα μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* είτε καθολικά είτε ιστοειδικά στον νευρικό ιστό ή στο έντερο, παρουσιάζουν αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στους μυς. Μάλιστα, αυτή η ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος είναι στα ίδια επίπεδα συγκριτικά με τα στελέχη που φέρουν ως μάρτυρα μετασχηματισμού το *myo-2p::GFP* (εικόνα Γ1). **Επιβεβαιώνεται δηλαδή η ανίχνευση της μη αυτόνομης κυτταρικής πρωτεασωμικής ρύθμισης, ενώ αποκλείεται το ενδεχόμενο η παρατήρησή μας να επηρεάζεται από τον μάρτυρα μετασχηματισμού.**

Γ.1.2 Η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου *pbs-5* καθολικά ή στους μυς μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στο έντερο

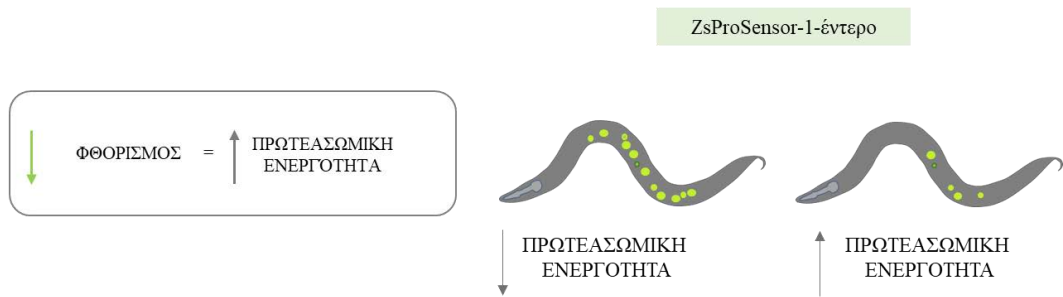
Στη συνέχεια, ελέγξαμε εάν υπάρχει αντίστοιχη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος σε κάποιον άλλο ιστό εκτός του μυ και πιο συγκεκριμένα στο έντερο του ζώου. Για τον σκοπό αυτό, τα στελέχη που εκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5* και φέρουν τον μάρτυρα μετασχηματισμού *myo-2p::GFP* διασταυρώθηκαν με ένα στέλεχος το οποίο εκφράζει το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας ZsProSensor-1 υπό την ρύθμιση του ιστοειδικού για το έντερο υποκινητή *vha-6* (*vha-6p::UIM2::ZsProSensor*) (εφεξής ZsProSensor-1-έντερο) (σχηματική απεικόνιση **εικόνα Γ3α**). Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν τρία διαγονιδιακά στελέχη:

- i. ZsProSensor-1-έντερο/*pbs-5*-καθολικά (φθορισμός φάρυγγα)
- ii. ZsProSensor-1-έντερο/*pbs-5*-νευρώνες (φθορισμός φάρυγγα)
- iii. ZsProSensor-1-έντερο/*pbs-5*-μυς (φθορισμός φάρυγγα)

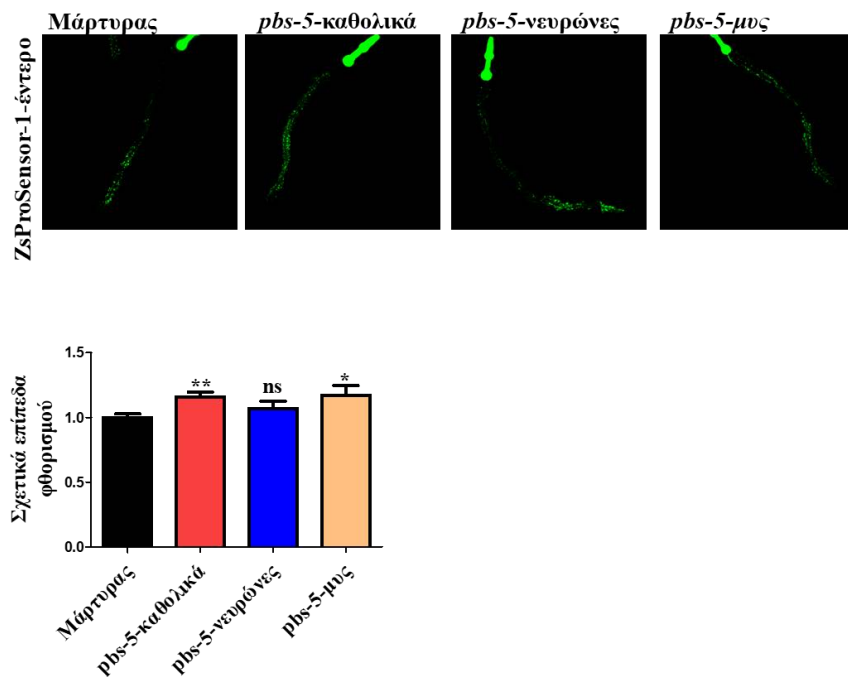
Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα B4** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Το σήμα που προέρχεται από την περιοχή του εντέρου του ζώου ανιχνεύθηκε με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, ποσοτικοποιήθηκε και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ3β**.

α)



β)



Εικόνα Γ3. Παρατήρηση πρωτεασωμικής ενεργότητας στο έντερο. α) Σχηματική περιγραφή των μεταβολών του σήματος φθορισμού στο έντερο του *C. elegans* όπου εκφράζεται το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας. Αύξηση των επιπέδων φθορισμού μεταφράζεται σε μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και αντίστροφα. β) Ενδεικτικές εικόνες φθορισμού από τα στελέχη *pbs-5-καθολικά*, *pbs-5-νευρώνες* και *pbs-5-μυς* τα οποία φέρουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας στο έντερο (ZsProSensor-1-έντερο) και τον μάρτυρα μετασχηματισμού *myo-2p::GFP* (πάνω). Ποσοτικοποιήσεις των σημάτων (κάτω). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, **p τιμή < 0.01, *p τιμή < 0.05, ns, μη σημαντικό. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της έντασης του φθορισμού παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας Γ3 τα στελέχη *pbs-5-καθολικά* και *pbs-5-μυς* παρουσιάζουν ελαφρώς μειωμένα επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας στο έντερο ενώ δεν παρατηρείται καμία μεταβολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας στο έντερο στα στελέχη *pbs-5-νευρώνες*.

Γ.1.3 Επίδραση της ιστοειδικής υπερέκφρασης του πρωτεασώματος στη γήρανση

Σύμφωνα με προγενέστερα αποτελέσματά μας, η καθολική έκφραση του γονιδίου *pbs-5* στον *C. elegans* ενισχύει τη μακροβιότητα του ζώου και διατηρεί σε καλύτερα επίπεδα διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη γήρανση. Συνεπώς, επόμενος στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της ιστοειδικής υπερέκφρασης του γονιδίου *pbs-5* στη γήρανση του ζώου, τόσο σε επίπεδο μακροβιότητας (προσδόκιμο ζωής - lifespan) όσο και σε επίπεδο ευζωίας (υγής γήρανση - healthspan).

Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* επηρεάζει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του οργανισμού, η διατήρηση των οποίων έχει συσχετιστεί με αυξημένη ευζωία

Αρχικά, έγινε εκτίμηση της ευζωίας των στελεχών που υπερεκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5*. Η εκτίμηση της ευζωίας προσδιορίστηκε βάσει συγκεκριμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του ζώου τα οποία μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου (φαινότυπος γήρανσης). Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκαν ο ρυθμός ανάπτυξης, η γονιμότητα των ζώων (ο αριθμός των αυγών που παρήχθησαν από κάθε ζώο), ο φαρυγγικός παλμός (καταμέτρηση των παλμών ανά λεπτό) και ο ρυθμός κένωσης (χρονική διάρκεια μεταξύ δύο κενώσεων) στην πρώτη και στη δέκατη ημέρα της ενήλικης ζωής του ζώου (**πίνακας Γ2**) καθώς επίσης και η συσσώρευση φθοριζουσών ουσιών. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τα στελέχη που φέρουν τον μάρτυρα μετασχηματισμού *myo-2::GFP*.

Πίνακας Γ2. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Στέλεχος	Ρυθμός ανάπτυξης ^α	Γονιμότητα ^β	Φαρυγγικός παλμός ^γ		Ρυθμός κενώσεων ^δ	
			1 ^η ημέρα	10 ^η ημέρα	1 ^η ημέρα	10 ^η ημέρα
Μάρτυρας	52.33 ± 0.33	305.4 ± 6.13	288.1 ± 1.89	160.2 ± 11.33	47.88 ± 0.93	107.2 ± 4.15
<i>pbs-5</i> -καθολικά	52.00 ± 0.57	306.8 ± 13.29	284.9 ± 3.12	198.0 ± 11.94*	50.00 ± 1.52	102.3 ± 3.56
<i>pbs-5</i> -νευρώνες	53.33 ± 0.33	295.7 ± 9.35	276.8 ± 5.77	200.3 ± 7.13**	46.82 ± 2.10	70.89 ± 3.95***
<i>pbs-5</i> -έντερο	56.67 ± 0.33***	276.0 ± 10.18*	210.3 ± 20.77**	192.4 ± 7.36*	50.07 ± 1.80	#
<i>pbs-5</i> -μυς	52.33 ± 0.66	281.0 ± 9.29*	271.2 ± 6.27*	195.7 ± 9.70*	51.13 ± 2.36	#

α) Χρονική διάρκεια μετεμβρυϊκής ανάπτυξης (ώρες από την εναπόθεση του αυγού έως το στάδιο L4)

β) Αριθμός παραγόμενων αυγών ανά ζώο

γ) Αριθμός παλμών ανά λεπτό

δ) Χρονική διάρκεια μεταξύ δύο κενώσεων σε δευτερόλεπτα

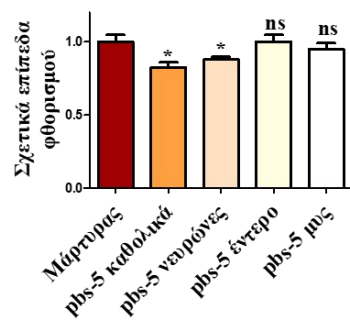
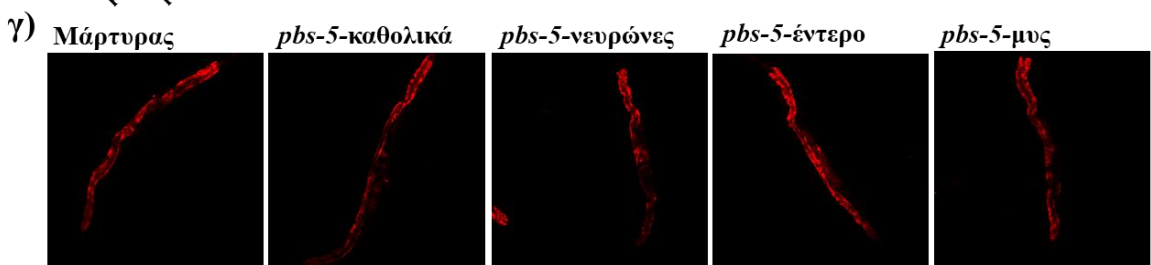
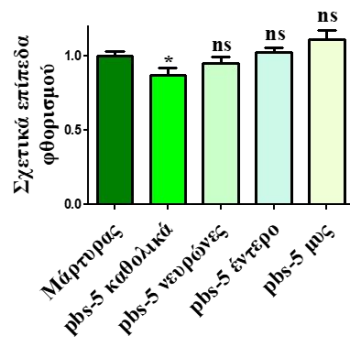
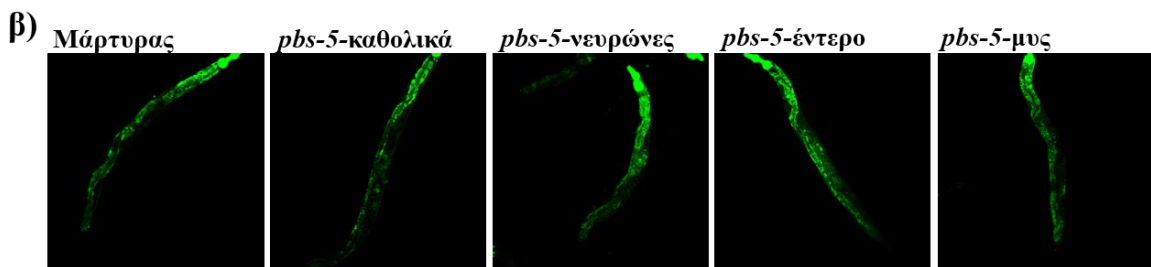
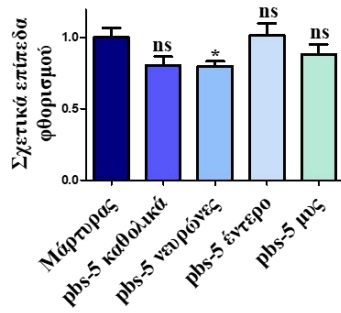
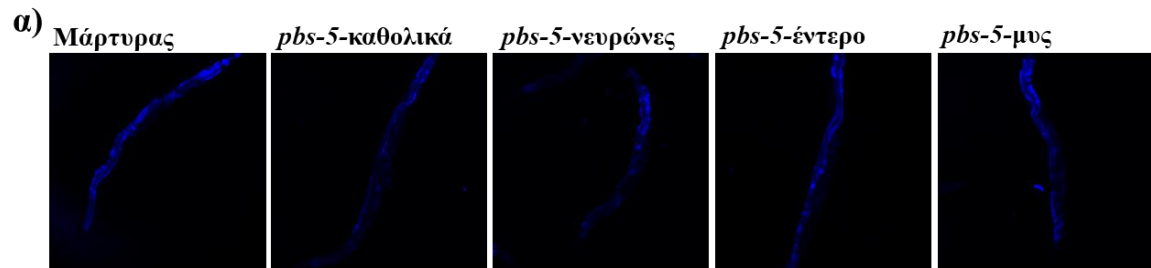
Χρονική διάρκεια μεταξύ δύο κενώσεων > 180 δευτερόλεπτα

Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων $\pm$ τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη ***p τιμή <0.001 , **p τιμή <0.01 , *p τιμή <0.05

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των στελεχών, τα στελέχη με ιστοειδική υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου στο έντερο του ζώου παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους, είναι λιγότερο γόνιμα και εμφανίζουν μειωμένο ρυθμό κενώσεων αλλά διατηρούν σε καλύτερα επίπεδα τον φαρυγγικό παλμό στη 10^η ημέρα ζωής. Παρομοίως, τα στελέχη *pbs-5*-μυς, αν και ακολουθούν τον ρυθμό ανάπτυξης των ζώων ελέγχου (μάρτυρας), είναι λιγότερο γόνιμα και έχουν μειωμένο ρυθμό κενώσεων αλλά διατηρούν σε καλύτερα επίπεδα τον φαρυγγικό παλμό. Τα στελέχη που υπερεκφράζουν το *pbs-5* γονίδιο στους νευρώνες δεν παρουσιάζουν μεταβολές στον ρυθμό ανάπτυξης και στη γονιμότητά τους ενώ διατηρούν σε καλύτερα επίπεδα τον φαρυγγικό παλμό και τον ρυθμό κενώσεων στην 10^η ημέρα ζωής τους. **Συμπερασματικά, φαίνεται πως το στέλεχος *pbs-5*-νευρώνες διατηρεί σε καλύτερα επίπεδα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της γήρανσης που θεωρούνται δείκτες τόσο της ευζωίας του ζώου αλλά και προβλεπτικοί δείκτες ενδεχόμενης μακροζωίας.**

Ένας ακόμη δείκτης που έχει συνδεθεί με τη γήρανση πολλών οργανισμών και χαρακτηρίζεται ως δείκτης γήρανσης του *C. elegans* είναι η αύξηση των επιπέδων αυτοφθορισμού που παράγεται από τη συσσώρευση ενός μείγματος υλικών συμπεριλαμβανομένων της λιποφουσκίνης και των AGEs (Gerstbrein *et al*, 2005; Pincus *et al*, 2016). Τα αυτοφθορίζοντα υλικά που συσσωρεύονται όταν διεγείρονται σε συγκεκριμένα μήκη κύματος παράγουν φθορισμό χρώματος κόκκινου, μπλε και πράσινου. Έρευνες υποστηρίζουν πως ο «μπλε» αυτοφθορισμός είναι αυξημένος σε ζώα που βρίσκονται προς το τέλος της ζωής τους, ενώ ο «κόκκινος» αυξάνεται γραμμικά με τον χρόνο και έχει προταθεί ως βέλτιστος δείκτης πρόβλεψης του προσδόκιμου ζωής σε ό,τι αφορά το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό της γήρανσης. Τέλος, ο «πράσινος» αυτοφθορισμός συνδυάζει τα χαρακτηριστικά των δύο προαναφερθέντων σημάτων (Coburn *et al*, 2013; Pincus *et al*, 2016).

Στην **εικόνα Γ4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης του αυτοφθορισμού στο έντερο των ζώων στην 10^η ημέρα της ενήλικης ζωής τους.

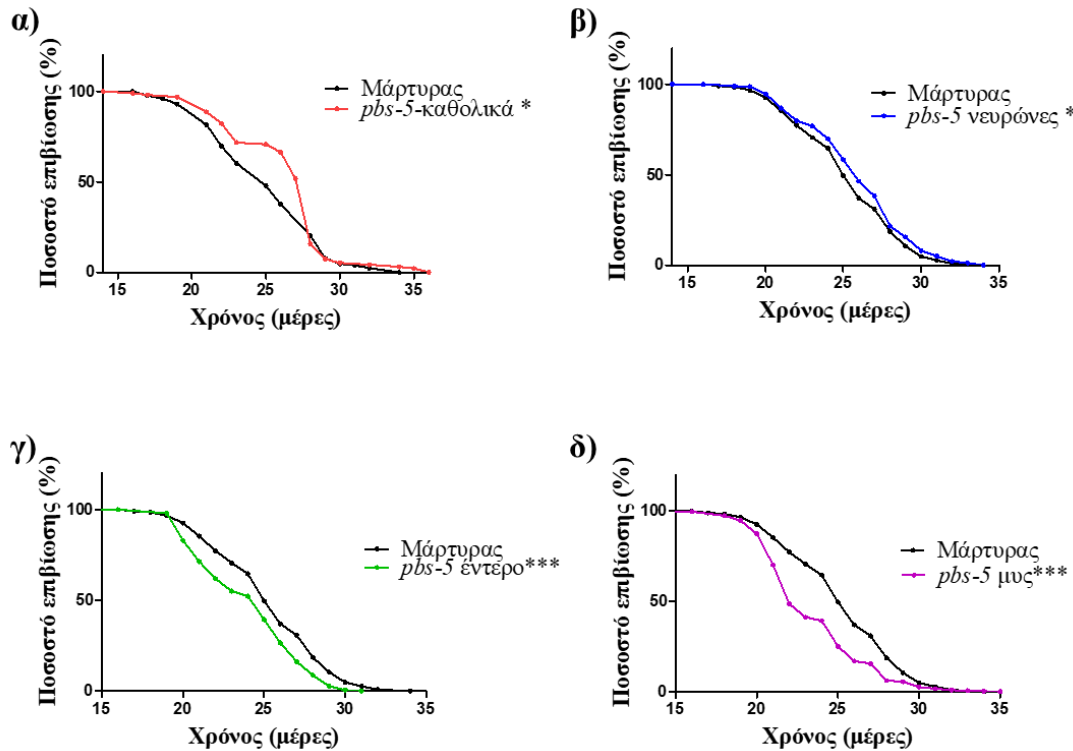


Εικόνα Γ4. Εκτίμηση της συσσώρευσης φθοριζουσών ουσιών στη 10^η ημέρα της ενήλικης ζωής των ζώων. Παρουσιάζονται τα δεδομένα που παράχθηκαν από τα στελέχη μάρτυρας, *pbs-5*-καθολικά, *pbs-5*-νευρώνες, *pbs-5*-έντερο και *pbs-5*-μυς με τη χρήση τριών σετ φίλτρων φθορισμού α) DAPI (μπλε) (ex/em 405/460 nm), ενδεικτικές εικόνες φθορισμού (πάνω) και ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω), β) GFP (πράσινο) (ex/em 488/525 nm), ενδεικτικές εικόνες φθορισμού (πάνω) και ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω) και γ) TRITC (κόκκινο) (ex/em 532/610 nm) ενδεικτικές εικόνες φθορισμού (πάνω) και ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, **p* τιμή<0.05, ns, μη σημαντικό. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς της έντασης του φθορισμού παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα στελέχη *pbs-5*-καθολικά έχουν μειωμένα επίπεδα φθορισμού χρώματος κόκκινου και πράσινου, επιβεβαιώνοντας τα υπάρχοντα δεδομένα. Σε ό,τι αφορά τα στελέχη με ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή των επιπέδων αυτοφθορισμού όταν το γονίδιο υπερεκφράζεται στους μυς ή στο έντερο. Αντιθέτως, τα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες έχουν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα του «μπλε» και του «κόκκινου» φθορισμού σε σύγκριση με το στέλεχος μάρτυρα. **Φαίνεται δηλαδή πως η έκφραση του *pbs-5* γονιδίου στους νευρώνες, εκτός από την διατήρηση των επιπέδων των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που περιεγράφηκαν νωρίτερα (πίνακας Γ2), συμβάλλει στη διατήρηση ενός ακόμα δείκτη τόσο της υγιούς γήρανσης αλλά και της βιωσιμότητας.**

Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* επηρεάζει το προσδόκιμο ζωής του οργανισμού

Συνολικά, τα αποτελέσματα της εκτίμησης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κατά τη γήρανση δείχνουν πως τα στελέχη που υπερεκφράζουν ιστοειδικά στους νευρώνες το γονίδιο *pbs-5* παρουσιάζουν καθυστέρηση της εμφάνισης γηρασμένου φαινοτύπου. Σε συνέχεια των αποτελεσμάτων αυτών, προχωρήσαμε στην εκτίμηση του προσδόκιμου ζωής των στελεχών που υπερεκφράζουν καθολικά και ιστοειδικά το *pbs-5* γονίδιο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ5**.



Εικόνα Γ5. Αύξηση του προσδόκιμου ζωής στα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες. Καμπύλες επιβίωσης των διαγονιδιακών στελεχών α) *pbs-5*-καθολικά, β) *pbs-5*-νευρώνες, γ) *pbs-5*-έντερο και δ) *pbs-5*-μυς σε συνάρτηση με τον χρόνο. Οι καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στην επιβίωση παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα. >200 ζώα/συνθήκη, * p τιμή<0.05, *** p τιμή<0.001.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού του προσδόκιμου ζωής φαίνεται να βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εκτίμησης της ευζωίας των ζώων. **Πιο συγκεκριμένα, το προσδόκιμο ζωής επεκτείνεται στα στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* καθολικά** (όπως αναμέναμε σύμφωνα με προγενέστερη μελέτη), καθώς επίσης και στα στελέχη με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στα οποία έχει παρατηρηθεί διατήρηση καλύτερων επιπέδων δεικτών που σχετίζονται με τη γήρανση. Αντίθετα, στα στελέχη *pbs-5*-έντερο και *pbs-5*-μυς παρατηρήθηκε μείωση του προσδόκιμου ζωής κατά την ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5*.

Γ.1.4 Μη αυτόνομη και αυτόνομη κυτταρική προστασία έναντι του πρωτεοτοξικού στρες στα στελέχη με ιστοειδική υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου

Οι ηλικιοεξαρτώμενες νευροεκφυλιστικές πρωτεϊνοπάθειες όπως η AD έχουν συνδεθεί άμεσα με τη δυσλειτουργία του πρωτεασώματος ενώ η ενεργοποίησή του έχει προταθεί ως εν δυνάμει θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση τέτοιων νοσημάτων (Gadhav *et al*, 2016; Njomen & Tepe, 2019). Όπως έχει αναφερθεί, η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* καθολικά σε όλους τους ιστούς του *C. elegans* έχει δειχθεί ότι

παρέχει προστασία έναντι της πρωτεοτοξικότητας του Αβ πεπτιδίου σε στελέχη μοντέλα για την AD (Chondrogianni *et al*, 2015a).

Συνεπώς, επόμενος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της ιστοειδικής υπερέκφρασης του πρωτεασώματος στην εξέλιξη της AD. Για τον σκοπό αυτό αξιοποιήσαμε στελέχη μοντέλα για τη συγκεκριμένη νόσο και συγκεκριμένα τα στελέχη CL4176, GMC101 και UA198. Το στέλεχος CL4176 είναι ένα θερμοευαίσθητο στέλεχος το οποίο εκφράζει το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο υπό τη ρύθμιση του ιστοειδικού για τους μυς υποκινητή *myo-3*. Η έκφραση του πεπτιδίου επάγεται μόνο όταν το ζώο εκτεθεί από τους 16°C στους 25°C. Με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 25°C στο προνυμφικό στάδιο L4, το ζώο παραλύει μέσα σε λίγες ώρες (Link *et al*, 2003). Το στέλεχος GMC101 εκφράζει συνεχώς το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο υπό τη ρύθμιση του ιστοειδικού για τους μυς υποκινητή *unc-54* και με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20°C στους 25°C, το ζώο παρουσιάζει φαινότυπο παράλυσης μέσα σε λίγες μέρες (Mccoll *et al*, 2012). Τέλος, το στέλεχος UA198 εκφράζει το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο στους γλουταμινεργικούς νευρώνες του *C. elegans* οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί έτσι ώστε να είναι ορατοί λόγω φθορισμού της πρωτεΐνης GFP που εκφράζουν. Η έκφραση του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου οδηγεί σε προοδευτικό νευροεκφυλισμό των γλουταμινεργικών νευρώνων, ο οποίος εξαρτάται από την ηλικία του ζώου. Αποτέλεσμα του νευροεκφυλισμού είναι η απώλεια του φθορισμού (Griffin *et al*, 2017).

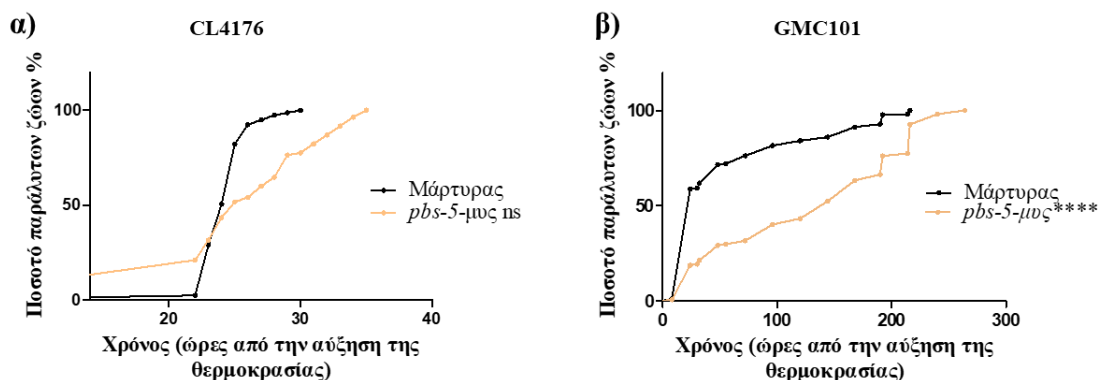
Η ιστοειδική υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου στους μυς καθυστερεί την εμφάνιση φαινοτύπου παράλυσης που σχετίζεται με τη συσσώρευση του ανθρώπινου Αβ πεπτιδίου στους μυς – αυτόνομη κυτταρική δράση

Αρχικός στόχος μας ήταν η διερεύνηση των αποτελεσμάτων της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης στην πρωτεοτοξικότητα του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου σε αυτόνομο κυτταρικό επίπεδο. Για τον σκοπό αυτό τα στελέχη *pbs-5*-μυς διασταυρώθηκαν με τα στελέχη CL4176 και GMC101 (τα οποία εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο στους μυς) (**εικόνα Γ6**). Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν τέσσερα διαγονιδιακά στελέχη:

- i. CL4176; μάρτυρας
- ii. CL4176; *pbs-5*-μυς
- iii. GMC101; μάρτυρας
- iv. GMC101; *pbs-5*-μυς

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β5** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Ακολούθησαν δοκιμές παράλυσης των παραπάνω στελεχών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ6**.



Εικόνα Γ6. Προστασία έναντι της πρωτεοτοξικότητας του Αβ πεπτιδίου στους μυς των στελεχών που υπερεκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5* στους μυς. Καμπύλες παράλυσης των στελεχών μοντέλων για την AD, α) CL4176 (θερμοεξαρθρώμενη έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς με προοδευτική παράλυση εντός ωρών). Οι καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 4 ανεξάρτητων πειραμάτων με >400 ζώα, ns, μη σημαντικό και β) GMC101 (συνεχής έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς με προοδευτική παράλυση με την ηλικία. Οι καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με >140 ζώα, τιμή *****p* < 0.0001.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ6α** παρόλο που δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του μέσου όρου του χρόνου παράλυσης μεταξύ των στελεχών CL4176;*pbs-5*-μυς και του μάρτυρα, περίπου το 45% των CL4176; *pbs-5*-μυς ζώων καθυστερεί να παραλύσει. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει τη δυναμική προστατευτική δράση της υπερέκφρασης του γονιδίου *pbs-5* στους μυς έναντι της πρωτεοτοξικότητας του Αβ₁₋₄₂ το οποίο εκφράζεται επίσης στους μυς. Η προστατευτική αυτή δράση επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα του ρυθμού παράλυσης των στελεχών GMC101; *pbs-5*-μυς (**εικόνα Γ6β**). Παρατηρήθηκε δηλαδή πως η ιστοειδική ρύθμιση της έκφρασης του πρωτεασώματος στους μυς, μπορεί να προστατέψει κυτταρικά αυτόνομα τον ιστό από την πρωτεοτοξικότητα του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου που εκφράζεται επίσης στους μυς (αυτόνομο επίπεδο).

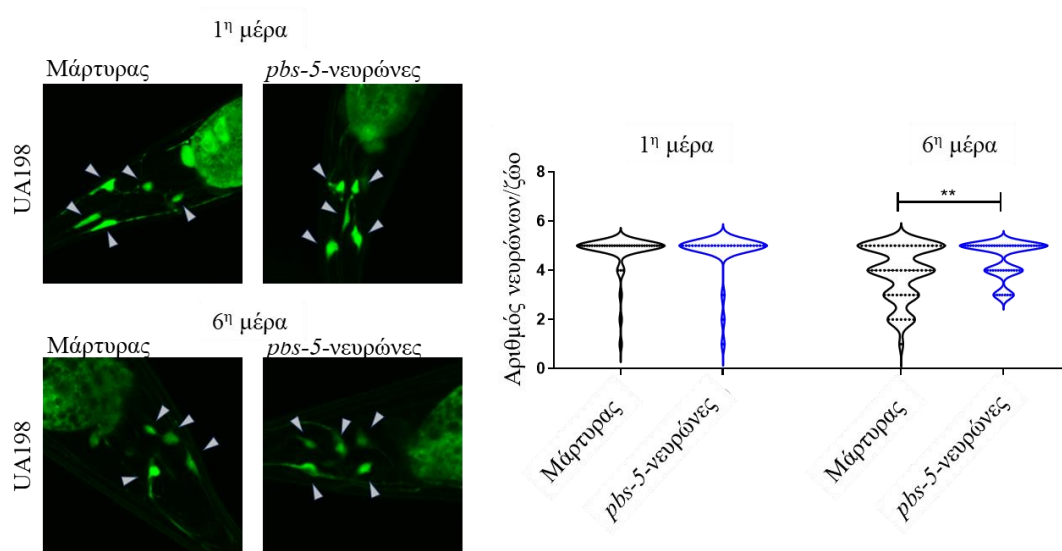
Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες καθυστερεί τον επαγόμενο από το ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο εκφυλισμό των γλουταμινεργικών νευρώνων – αυτόνομη κυτταρική δράση

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της αυτόνομης κυτταρικής δράσης της πρωτεασωμικής έκφρασης στην ανισορροπία της πρωτεόστασης λόγω του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου (**εικόνα Γ6**), αναρωτηθήκαμε αν αυτή η δράση έχει ισχύ και σε άλλον ιστό. Για τον σκοπό αυτό αξιοποιήσαμε το στέλεχος UA198, το οποίο εκφράζει το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο στους γλουταμινεργικούς νευρώνες. Για τον σκοπό αυτό τα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες διασταυρώθηκαν με το στέλεχος UA198. Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν 2 νέα στελέχη:

- i) UA198; μάρτυρας
- ii) UA198; *pbs-5*-νευρώνες

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β7** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Στα στελέχη που προέκυψαν πραγματοποιήθηκαν πειράματα καταμέτρησης των γλουταμινεργικών νευρώνων της ουράς -συνολικός αριθμός 5- στην 1^η και στην 6^η ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ7**.



Εικόνα Γ7. Καθυστέρηση του Αβ₁₋₄₂ επαγόμενου εκφυλισμού των γλουταμινεργικών νευρώνων στα *pbs-5*-νευρώνες ζώα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών UA198;μάρτυρας και UA198;*pbs-5*-νευρώνες, τα οποία εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίο στους σημασμένους με GFP γλουταμινεργικούς νευρώνες στην ουρά του ζώου, στην 1^η και 6^η ημέρα της ενήλικης ζωής (αριστερό πλαίσιο). Τα βέλη στις εικόνες δείχνουν τους ενεργούς νευρώνες. Το διάγραμμα νιολίν δείχνει τον αριθμό των γλουταμινεργικών νευρώνων της ουράς του ζώου στην 1^η και 6^η ημέρα της ενήλικης ζωής. Κάθε κουκκίδα αντιπροσωπεύει ένα ζώο (δεξί πλαίσιο). Το γράφημα δείχνει την κατανομή των συγκεντρωτικών τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα, >30 ζώα/συνθήκη, **p τιμή < 0.01.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο αριθμός των γλουταμινεργικών νευρώνων διατηρείται σε καλύτερα επίπεδα την 6^η ημέρα στα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες σε σύγκριση με το στέλεχος μάρτυρα. Συγκεκριμένα, στην 6^η ημέρα ένα μεγάλο ποσοστό των στελεχών UA198;*pbs-5*-νευρώνες (58%) διατηρεί την ακεραιότητα και των 5 γλουταμινεργικών νευρώνων, ενώ πολύ λίγα ζώα έχουν χάσει λόγω εκφυλισμού τους 2 από τους 5 γλουταμινεργικούς νευρώνες. Αντίθετα στα στελέχη UA198;μάρτυρες το ποσοστό των ζώων που διατηρεί την ακεραιότητα των γλουταμινεργικών νευρώνων είναι αρκετά μικρότερο (35%) ενώ παρατηρείται και ένας αριθμός ζώων που έχει χάσει λόγω εκφυλισμού ακόμα και 3 ή και 4 από τους 5 γλουταμινεργικούς νευρώνες. **Συμπεραίνεται πως η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στον νευρικό ιστό παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στον ίδιο ιστό (αυτόνομο επίπεδο) (εικόνα Γ7).**

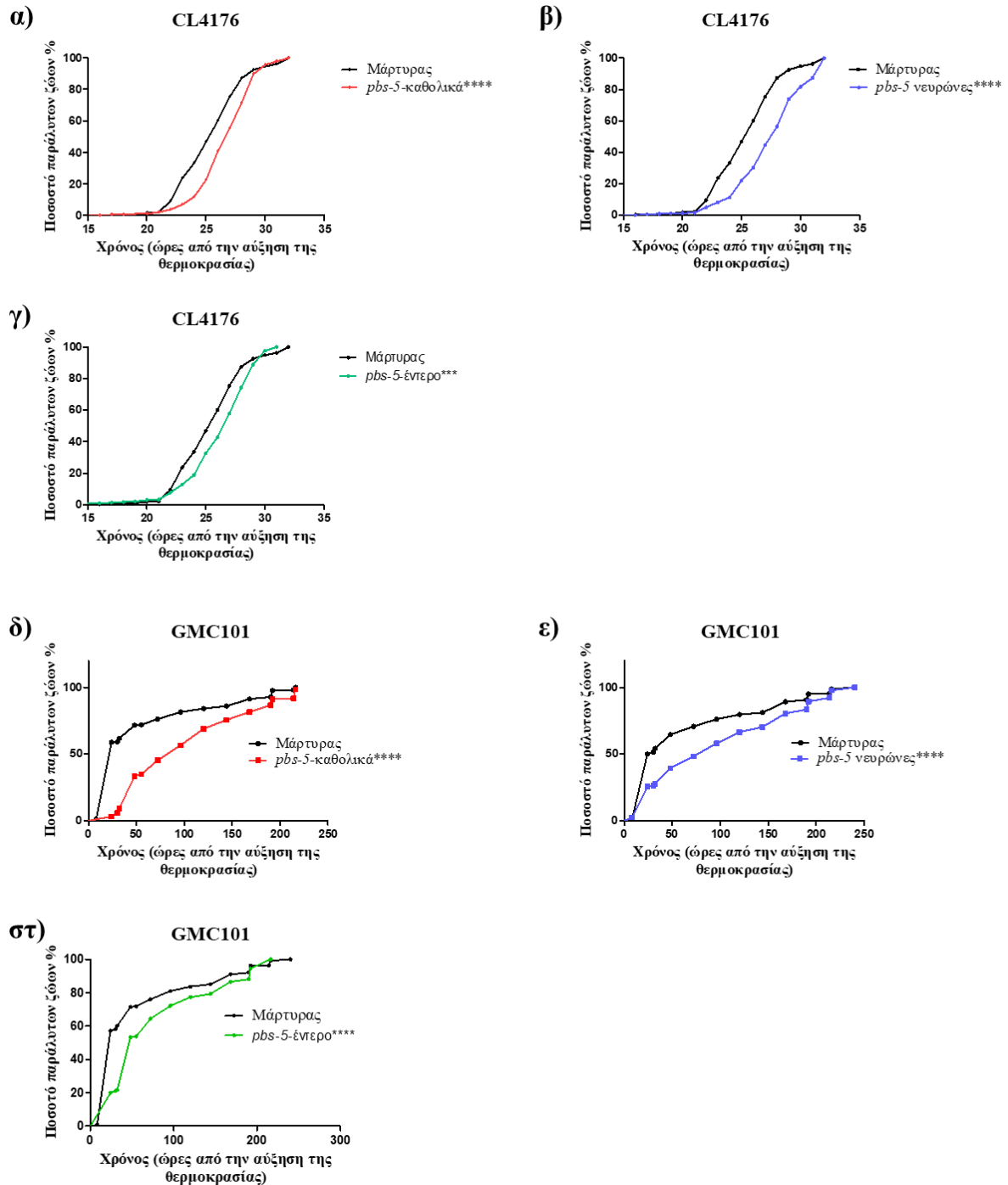
Η ιστοειδική υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου στους νευρώνες ή στο έντερο καθυστερεί την εμφάνιση φαινοτύπου που σχετίζεται με τη συσσώρευση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς -μη αυτόνομη κυτταρική δράση

Τα δεδομένα μας μέχρι αυτό το σημείο δείχνουν πως η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* μπορεί να επηρεάσει με μη αυτόνομο κυτταρικό τρόπο την πρωτεασωμική ενεργότητα σε άλλον ιστό και παράλληλα μέσω αυτόνομης κυτταρικής δράσης παρέχει προστασία σε συνθήκες πρωτεοτοξικότητας του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου. Συνεπώς, το επόμενο ερώτημα που εξετάσαμε είναι εάν η ενίσχυση της πρωτεασωμικής έκφρασης σε έναν ιστό και συγκεκριμένα στους νευρώνες ή στο έντερο μπορεί να παρέχει προστασία έναντι της τοξικότητας του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου σε ένα απομακρυσμένο ιστό, και πιο συγκεκριμένα στους μυς. Τα στελέχη με ιστοειδική και καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* διασταυρώθηκαν με τα στελέχη CL4176 και GMC101. Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν 6 νέα διαγονιδιακά στελέχη τα οποία εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο στους μυς και το γονίδιο *pbs-5* καθολικά ή ιστοειδικά:

- i. CL4176; *pbs-5*-καθολικά
- ii. CL4176; *pbs-5*-νευρώνες
- iii. CL4176; *pbs-5*-έντερο
- iv. GMC101; *pbs-5*-καθολικά
- v. GMC101; *pbs-5*-νευρώνες
- vi. GMC101; *pbs-5*-έντερο

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα B5** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Με την ολοκλήρωση των διασταυρώσεων εκτιμήθηκε ο ρυθμός παράλυσης των ζώων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ8**.



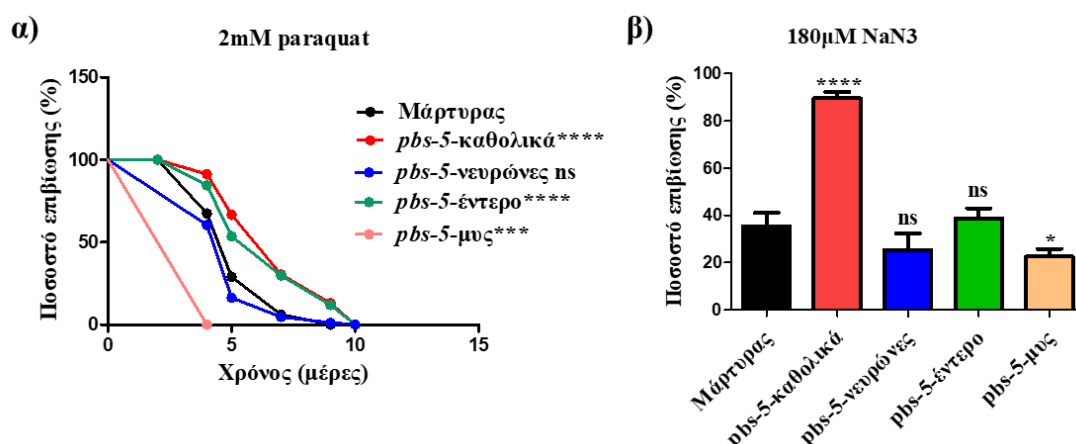
Εικόνα Γ8. Προστασία έναντι της πρωτεοτοξικότητας του Αβ πεπτιδίου στους μυς των στελεχών που υπερεκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες ή στο έντερο. Καμπύλες παράλυσης των στελεχών μοντέλων για την AD, α-γ) CL4176 (θερμοεξαρτώμενη έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς με προοδευτική παράλυση εντός ωρών) και δ-στ) GMC101 (συνεχής έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς με προοδευτική παράλυση με την ηλικία). Στελέχη α) CL4176; *pbs-5*-καθολικά, β) CL4176; *pbs-5*-νευρώνες και, γ) CL4176; *pbs-5*-έντερο. Οι καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 8 ανεξάρτητων πειραμάτων με >800 ζώα, τιμή *****p* < 0.0001, ****p* < 0.001. Στελέχη δ) GMC101; *pbs-5*-καθολικά, ε) GMC101; *pbs-5*-νευρώνες και, στ) GMC101; *pbs-5*-έντερο. Οι

καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με >140 ζώα, τιμή **** $p < 0.0001$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα Γ8, η καθολική και η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες ή στο έντερο στα στελέχη CL4176 και GMC101, οδηγεί σε καθυστέρηση του φαινοτύπου παράλυσης η οποία προκαλείται από την έκφραση του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς. Αποκαλύπτεται δηλαδή, πως η μη αυτόνομη κυτταρική δράση της ιστοειδικής έκφρασης του γονιδίου *pbs-5* (στους νευρώνες ή στο έντερο) εκτός από την ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε έναν απομακρυσμένο ιστό (μυς) (εικόνα Γ1 και Γ2), έχει και λειτουργικό αντίκτυπο καθώς μπορεί και να δράσει έναντι της πρωτεοτοξικότητας σε αυτόν τον ιστό.

Γ1.5 Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* δεν ενισχύει την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες

Καθώς το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί τόσο με τη γήρανση όσο και με την AD, ενώ το ίδιο το πρωτεάσωμα ενεργοποιείται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, εξετάσαμε εάν η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* μπορεί να ενισχύσει την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες (Bonet-Costa *et al*, 2016). Για τον σκοπό αυτό, τα στελέχη που υπερεκφράζουν ιστοειδικά και καθολικά το γονίδιο *pbs-5* εκτέθηκαν στον οξειδωτικό παράγοντα paraquat, και εκτιμήθηκε ο χρόνος μέχρι τον θάνατό τους (μέρες), καθώς επίσης και στον παράγοντα NaN₃ όπου εκτιμήθηκε το ποσοστό επιβίωσης των στελεχών έπειτα από την έκθεση στον παράγοντα.



Εικόνα Γ9. Η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου *pbs-5* δεν αρκεί για να ενισχύσει την προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες σε αντίθεση με την καθολική του έκφραση. α) Καμπύλες επιβίωσης των στελεχών *pbs-5*-καθολικά, *pbs-5*-νευρώνες, *pbs-5*-έντερο και *pbs-5*-μυς τα οποία έχουν εκτεθεί σε 2mM paraquat. 3 ανεξάρτητα πειράματα με >190 ζώα ανά συνθήκη, τιμή **** $p < 0.0001$, ns, μη σημαντικό. Οι καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στην επιβίωση παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα. β) Ποσοστό επιβίωσης των στελεχών *pbs-5*-καθολικά, *pbs-5*-

νευρώνες, *pbs-5*-έντερο και *pbs-5*-μυς 24 ώρες μετά την έκθεση σε 180μM NaN₃, 3 ανεξάρτητα πειράματα με >350 ζώα ανά συνθήκη, τιμή **** $p < 0.0001$, * p value < 0.05, ns, μη σημαντικό. Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στην επιβίωση παρουσιάζεται σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ9**, όπως αναμέναμε σύμφωνα και με προγενέστερη μελέτη, η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* παρείχε προστατευτική δράση έναντι και των δύο οξειδωτικών παραγόντων στους οποίους εκτέθηκαν (paraquat και NaN₃) (Chondrogianni *et al*, 2015a). Επίσης ανθεκτικά είναι τα στελέχη *pbs-5*-έντερο έναντι του οξειδωτικού παράγοντα paraquat όχι όμως και έναντι του παράγοντα NaN₃. Τα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες επηρεάζονται εξίσου με τα στελέχη μάρτυρες από τους στρεσογόνους παράγοντες. Ενώ στην αντίθετη πλευρά τα στελέχη *pbs-5*-μυς είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση και των δύο στρεσογόνων παραγόντων που μελετήθηκαν. **Κατά συνέπεια, η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* δεν ενισχύει την ανθεκτικότητα των ζώων στο οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* δεν είναι πανάκεια για οποιοδήποτε είδος στρες αλλά εξαρτάται από τον ιστό και από το αντίστοιχο στρες.**

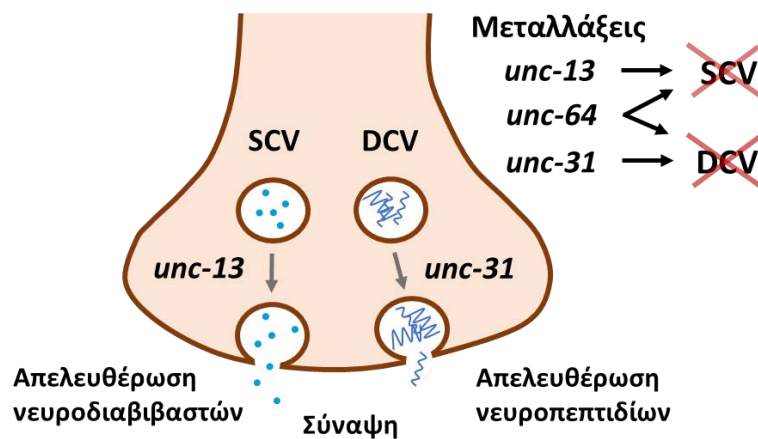
Γ.2 Διαλεύκανση του μηχανισμού της μη αυτόνομης πρωτεασωματικής ρύθμισης που παρατηρείται μεταξύ νευρικού-μυϊκού ιστού

Το νευρικό σύστημα αποτελεί τον πιο σημαντικό μεσολαβητή επικοινωνίας τόσο μεταξύ των νευρώνων όσο και με άλλους ιστούς, είτε μέσω του σχηματισμού συνάψεων είτε μέσω της νευροενδοκρινικής σηματοδότησης. Η σηματοδότηση που προέρχεται από το νευρικό σύστημα μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό γήρανσης ολόκληρου του οργανισμού σε ασπόνδυλα και θηλαστικά (Zullo *et al*, 2019; Tavernarakis, 2019). Στοχεύσαμε λοιπόν στη διαλεύκανση του τρόπου επικοινωνίας μεταξύ του νευρικού και του μυϊκού ιστού όσον αφορά στη ρύθμιση του πρωτεασώματος. Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που αφορούν στη διαλεύκανση αυτού του μηχανισμού χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη που φέρουν ως μάρτυρα μετασχηματισμού το *myo-2p::GFP* με αποτέλεσμα τον φθορισμό στον φάρυγγα. Συνεπώς, σε όλες τις αναλύσεις που απαιτούν την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού στους μυς του σκόληκα -λόγω του συστήματος ZsProSensor-1- δεν λήφθηκε υπόψη το σήμα που προέρχεται από τον φάρυγγα (εικόνα Γ1α).

Γ.2.1 Η μη αυτόνομη κυτταρική δράση στους μυς των στελεχών με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* διαμεσολαβείται από τα SCVs

Η μη αυτόνομη κυτταρική πρωτεασωματική ρύθμιση μεταξύ των νευρώνων και των μυών υποδηλώνει πως η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες ενδεχομένως να προωθεί τη μεταβίβαση κάποιας πληροφορίας, το αποτέλεσμα της οποίας είναι η ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στους μυς του *C. elegans* (εικόνες Γ1β-Γ2β). Οι νευροδιαβιβαστές αποτελούν τον βασικό τρόπο μεταβίβασης πληροφοριών μεταξύ των νευρώνων αλλά και από τους νευρώνες προς τους μυς (νευρομυϊκές συνάψεις). Οι νευροδιαβιβαστές συγκεντρώνονται σε συναπτικά κυστίδια του προσυναπτικού κυττάρου, τα οποία στη συνέχεια απελευθερώνονται μέσω εξωκυττάρωσης και προσλαμβάνονται από το μετασυναπτικό κύτταρο. Στον προσυναπτικό νευρώνα του *C. elegans* διακρίνονται δύο τύποι συναπτικών κυστιδίων, τα μικρά διαυγή κυστίδια (SCVs) και τα ηλεκτρονιόπυκνα κυστίδια (DCVs). Στα SCVs συγκεντρώνονται χαμηλού μοριακού βάρους νευροδιαβιβαστές (αμινοξέα και βιογενείς αμίνες) όπως ακετυλοχολίνη, γλουταμινικό οξύ, GABA, ντοπαμίνη και σεροτονίνη. Τα DCVs περιέχουν κυρίως τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους νευροπεπτίδια τα οποία διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα πεπτίδια που προσομοιάζουν την ινσουλίνη (insulin-like peptides) και τα FMRF αμιδο-σχετιζόμενα πεπτίδια (FMRFamide-related peptides), καθώς επίσης εσωκλείονται και βιογενείς αμίνες όπως η σεροτονίνη και η ντοπαμίνη (Calahorra & Izquierdo, 2018).

Προκειμένου να εξετάσουμε αν η επικοινωνία του νευρικού ιστού με τους μυς, σε πρωτεασωματικό επίπεδο, επηρεάζεται από την έκκριση νευροδιαβιβαστών ή/και νευροπεπτιδίων αξιοποιήσαμε τρία στελέχη τα οποία ανάλογα με τη μετάλλαξη που φέρουν αδυνατούν να σχηματίσουν και/ή να απελευθερώσουν SCVs ή/και DCVs. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη για τη μετάλλαξη: α) *unc-64(e246)*, ανεπάρκεια σχηματισμού ή εξωκυττάρωσης τόσο των SCVs όσο και των DCVs, β) *unc-13(e51)*, παρεμπόδιση του σχηματισμού των SCVs, και γ) *unc-31(e298)*, παρεμπόδιση της εξωκυττάρωσης των DCVs (Madison *et al*, 2005; Speese *et al*, 2007) (σχηματική απεικόνιση **εικόνα Γ10**).



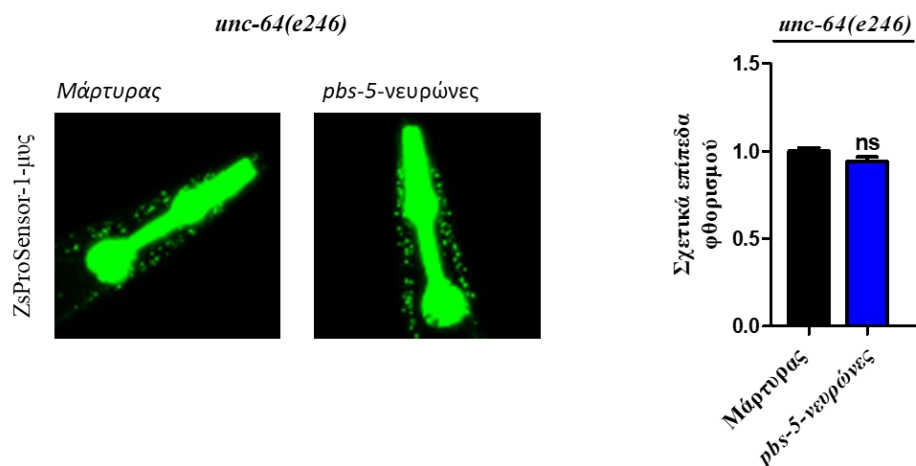
Εικόνα Γ10. Σχηματική περιγραφή του ρόλου των UNC-13 και UNC-31 στην απελευθέρωση εκκριτικών κυστιδίων από τους νευρώνες. Η πρωτεΐνη UNC-13 απαιτείται για τη σύντηξη των SCVs κυστιδίων που εσωκλείουν μικρομοριακούς νευροδιαβιβαστές και η UNC-31 συμμετέχει στην εξωκυττάρωση των DCVs που περιέχουν κυρίως νευροπεπτίδια.

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν τα DCVs και/ή τα SCVs συμμετέχουν στη νευρομυϊκή επικοινωνία της πρωτεασωμικής ρύθμισης, αρχικά διασταυρώσαμε τα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες, τα οποία φέρουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς (Zs-ProSensor-1-μυς), με τα μεταλλαγμένα για το *unc-64*(*e246*) στελέχη. Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν 2 νέα διαγονιδιακά στελέχη τα οποία στερούνται λειτουργικών SCVs και DCVs:

- i. Zs-ProSensor-1-μυς; μάρτυρας; *unc-64*
- ii. Zs-ProSensor-1-μυς; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-64*

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β6** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η πρωτεασωμική λειτουργία στους μυς των νέων στελεχών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ11**.



Εικόνα Γ11. Η ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς των στελεχών με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* αναστέλλεται απουσία των SCVs και DCVs. Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού από στελέχη με τη μετάλλαξη *unc-64(e246)* τα οποία εκφράζουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας ZsProSensor-1 στους μυς, διασταυρωμένα είτε με το στέλεχος μάρτυρα είτε με το στέλεχος *pbs-5*-νευρώνες (αριστερά). Ποσοτικοποίηση του φθορισμού (δεξιά). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, ns - μη σημαντικό αποτέλεσμα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ11**, ο φθορισμός των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες δεν μεταβάλλεται σε σχέση με τον φθορισμό των στελεχών μάρτυρα όταν τα στελέχη φέρουν τη μετάλλαξη *unc-64(e246)* (μη λειτουργικά SCVs και DCVs). Απουσία και των δύο τύπων κυστιδίων, η μείωση του φθορισμού που παρατηρείται μεταξύ των αγρίου τύπου στελεχών *pbs-5*-νευρώνες και μάρτυρες που δεν φέρουν τη μετάλλαξη *unc-64(e246)* (**εικόνα Γ1β-Γ2β**) χάνεται. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως η μετάλλαξη *unc-64(e246)* αναστέλλει την μη αυτόνομη κυτταρική πρωτεασωμική ρύθμιση μεταξύ των νευρώνων και των μυών. Συμπεραίνουμε, πως και τα δύο ή κάποιο από αυτά τα δύο είδη κυστιδίων και αντίστοιχα τα περιεχόμενά τους είναι απαραίτητα για τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος.

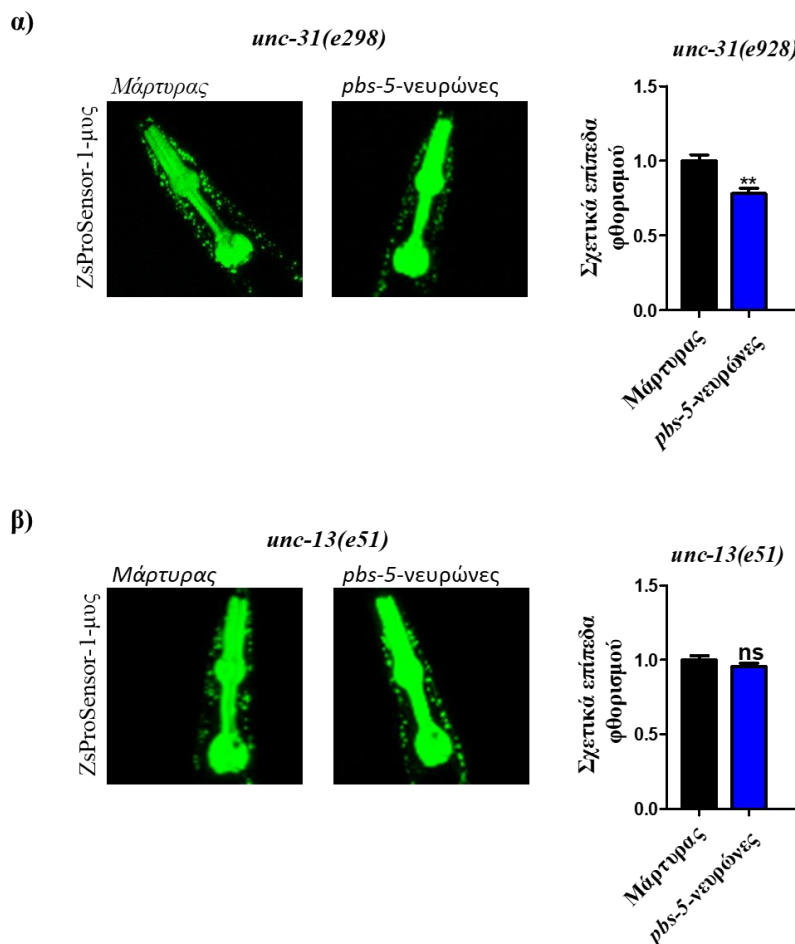
Στη συνέχεια επιδιώξαμε να διευκρινίσουμε εάν αυτή η αναστολή οφείλεται σε έναν ή και στους δύο τύπους κυστιδίων. Για τον σκοπό αυτό ακολούθησε διασταύρωση των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στον νευρικό ιστό και φέρουν το σύστημα Zs-ProSensor-1 στους μυς με τα μεταλλαγμένα για το *unc-31(e298)* (απουσία λειτουργικών DCVs) και το *unc-13(e51)* (απουσία λειτουργικών SCVs) στελέχη. Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν 4 νέα διαγονιδιακά στελέχη:

- i. Zs-ProSensor-1-μυς; μάρτυρας; *unc-31(e298)*
- ii. Zs-ProSensor-1-μυς; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-31(e298)*
- iii. Zs-ProSensor-1-μυς; μάρτυρας; *unc-13*

iv. Zs-ProSensor-1-μυς; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-13*

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β6** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η πρωτεασωμική λειτουργία στους μυς των νέων στελεχών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ12**.



Εικόνα Γ12. Η ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς των στελεχών με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* αναστέλλεται απουσία των SCVs. Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού από στελέχη με μετάλλαξη για το α) *unc-31(e298)* (αριστερά) και β) *unc-13(e51)* (αριστερά) τα οποία εκφράζουν το σύστημα αναφοράς της πρωτεασωμικής ενεργότητας ZsProSensor-1 στους μυς, έπειτα από διασταύρωση είτε με το στέλεχος μάρτυρα είτε με το στέλεχος *pbs-5*-νευρώνες. Ποσοτικοποίηση του φθορισμού α) *unc-31(e298)* (δεξιά) και β) *unc-13(e51)* (δεξιά). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, τιμή $p^{**}<0.01$, ns, μη σημαντικό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ12**, παρατηρείται μείωση των επιπέδων φθορισμού στους μυς των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες και δεν έχουν λειτουργικά DCVs λόγω της μετάλλαξης *unc-31(e928)* (**εικόνα Γ12α**). Η μείωση των επιπέδων φθορισμού στους μυς είναι σε παρόμοια επίπεδα με τα επίπεδα φθορισμού των αγρίου τύπου στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* και δεν φέρουν τη μετάλλαξη *unc-31(e928)* (**εικόνα Γ1β και Γ2β**). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως η μείωση των επιπέδων φθορισμού στους μυς (η οποία ερμηνεύεται ως αύξηση των επιπέδων της ενεργότητας του πρωτεασώματος στους μυς) των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες παραμένει ανεπηρέαστη από τη μετάλλαξη *unc-31(e928)*. Αντίθετα, τα επίπεδα του φθορισμού δεν μεταβάλλονται στα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες που φέρουν τη μετάλλαξη *unc-31(e928)* (**εικόνα Γ12β**). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως απουσία λειτουργικών SCVs αναστέλλεται η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στους μυς των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες. Υποδεικνύεται πως τα SCVs είναι απαραίτητα για αυτή τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος.

Εκτός από την ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς, δείξαμε πως η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες του *C. elegans* παρέχει προστασία έναντι της τοξικότητας του Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου που εκφράζεται στους μυς του ζώου (**εικόνα Γ8β & ε**). Συνεπώς, το επόμενο ερώτημα που προέκυψε είναι εάν η διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ των νευρώνων και των μυών σε πρωτεασωμικό επίπεδο, λόγω της απώλειας των SCVs, επηρεάζει την προστασία έναντι της τοξικότητας του Αβ πεπτιδίου.

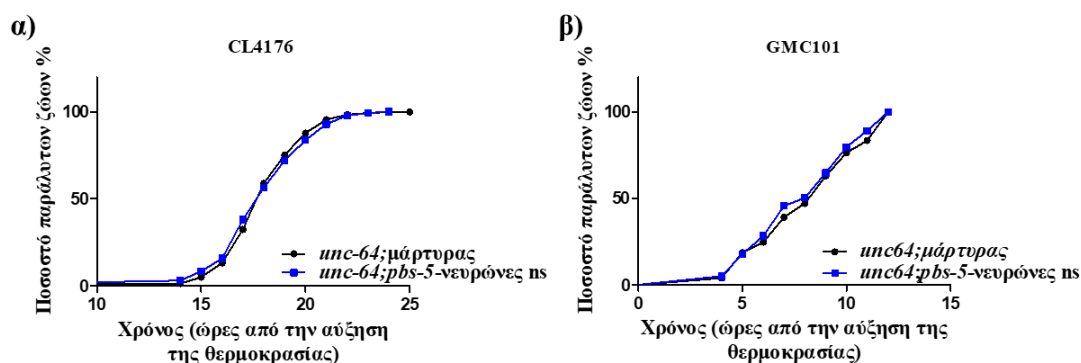
Για να δώσουμε απάντηση σε αυτό το ερώτημα θα έπρεπε να προχωρήσουμε σε δοκιμές παράλυσης με τα στελέχη που εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτίδιο στους μυς του ζώου και φέρουν μετάλλαξη για το *unc-13*. Ωστόσο, φαινοτυπικά τα μεταλλαγμένα στελέχη *unc-13(e51)* είναι σχεδόν ακίνητα καθιστώντας αδύνατη τη διεξαγωγή πειραμάτων παράλυσης. Συνεπώς, προχωρήσαμε σε δοκιμές παράλυσης χρησιμοποιώντας τα στελέχη *unc-64(e246)*. Παρόλο που τα *unc-64(e246)* στελέχη στερούνται και των SCVs και των DCVs, τα αποτελέσματα σύμφωνα με την **εικόνα Γ12** έχουν ήδη αποκλείσει τη συμμετοχή των DCVs στην κυτταρική μη αυτόνομη πρωτεασωμική ρύθμιση μεταξύ των νευρώνων και των μυών.

Τα στελέχη για τη μετάλλαξη *unc-64(e246)* διασταυρώθηκαν με τα στελέχη CL4176; *pbs-5*-νευρώνες και GMC101; *pbs-5*-νευρώνες. Από τις διασταυρώσεις προέκυψαν τα παρακάτω στελέχη:

- i. CL4176; *pbs-5*-μάρτυρας; *unc-64*
- ii. CL4176; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-64*
- iii. GMC101; μάρτυρας; *unc-64*
- iv. GMC101; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-64*

Ο γονότυπος των στελεχών αναγράφεται στον **πίνακα Β6** στην ενότητα Β Υλικά και Μέθοδοι.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε δοκιμές παράλυσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ13**.



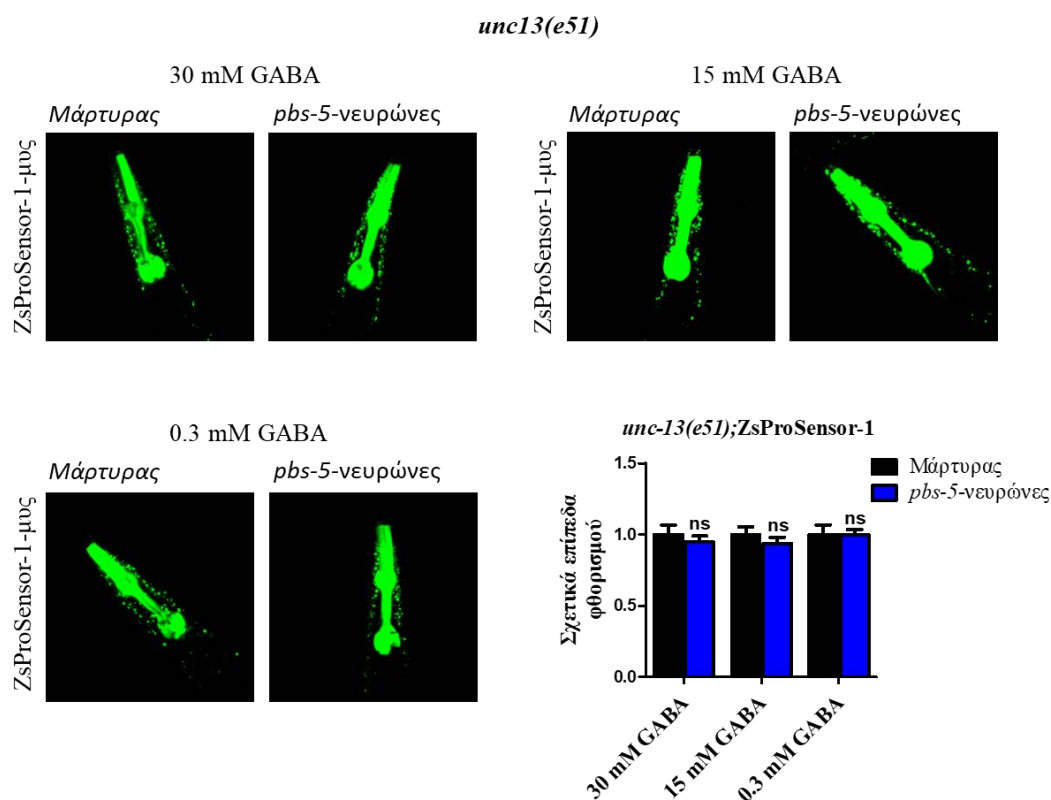
Εικόνα Γ13. Η προστασία έναντι της τοξικότητας του Αβ πεπτιδίου στα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες αναστέλλεται απουσία των SCVs. Καμπύλες παράλυσης του μάρτυρα και του στελέχους *pbs-5*-νευρώνες τα οποία εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίο στους μυς του ζώου και φέρουν τη μετάλλαξη *unc-64* α) στο στέλεχος CL4176 (θερμοεξαρτώμενη έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς των ζώων η οποία οδηγεί σε σταδιακή του παράλυση μέσα σε λίγες ώρες) και, β) στο στέλεχος GMC101 (συνεχής έκφραση του ανθρώπινου Αβ₁₋₄₂ πεπτιδίου στους μυς που οδηγεί σε προοδευτική παράλυση με την ηλικία). Οι καμπύλες είναι το ομαδοποιημένο αποτέλεσμα 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με >250 ζώα ανά συνθήκη, ns, μη σημαντικό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα στελέχη *pbs-5*-νευρώνες που φέρουν τη μετάλλαξη *unc-64(e246)* δεν παρουσίασαν καθυστέρηση του ρυθμού παράλυσης (εικόνα Γ13) σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου στελέχη που δε φέρουν τη μετάλλαξη (εικόνα Γ8β & ε). Συνεπώς, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν πως η υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου στους νευρώνες του *C. elegans* προάγει την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στους μυς του ζώου μέσω των SCVs, οδηγώντας σε προστασία έναντι της τοξικότητας του Αβ πεπτιδίου.

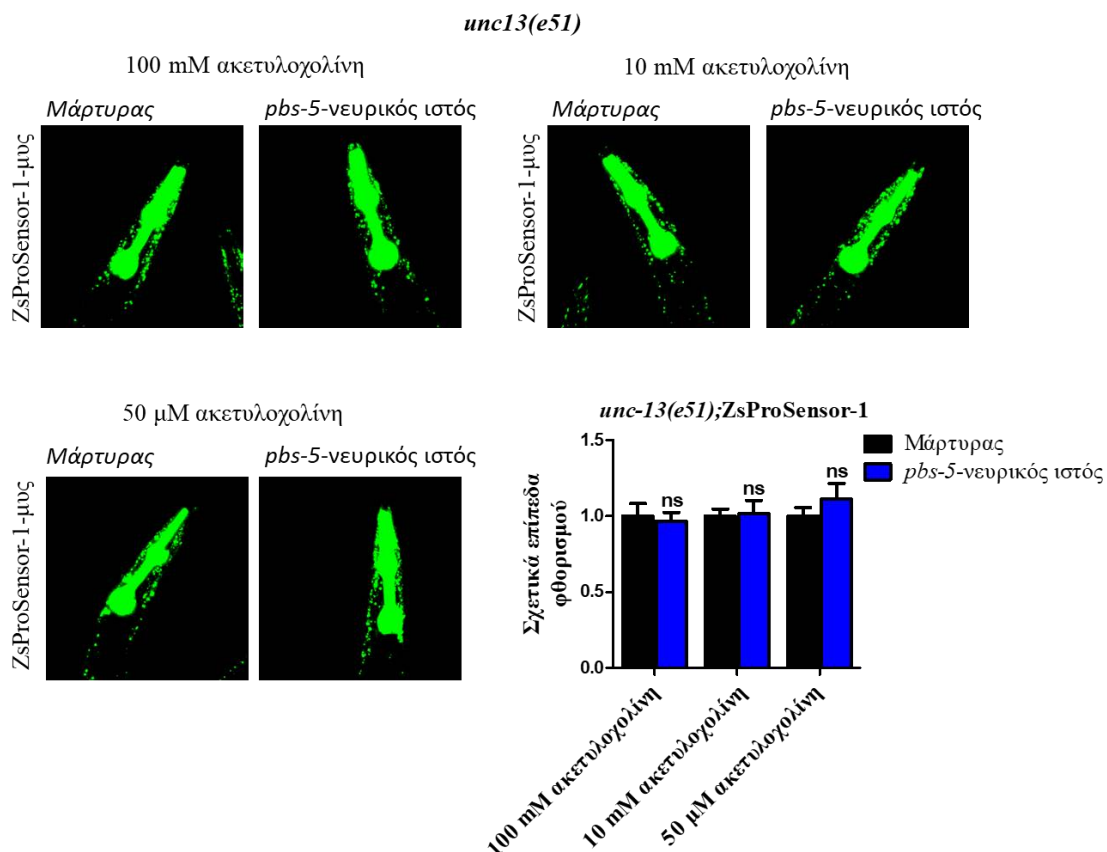
Γ.2.2 Το γλουταμινικό οξύ αποκαθιστά τη μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στους μυς των *pbs-5*-νευρώνων στελεχών που στερούνται των SCVs

Το κύριο ερώτημα που προέκυψε από την παρατήρηση του κρίσιμου ρόλου των SCVs κυστιδίων στη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος, είναι εάν η δράση αυτή αποδίδεται σε κάποιον από τους νευροδιαβιβαστές που εσωκλείονται στα συγκεκριμένα κυστίδια. Τα SCVs περιέχουν κλασσικούς νευροδιαβιβαστές όπως το γλουταμινικό οξύ, GABA και η ακετυλοχολίνη (Calahorra & Izquierdo, 2018). Καθώς τα μεταλλαγμένα στελέχη *unc-13(e51)* αδυνατούν να σχηματίσουν SCVs, υποθέσαμε πως η εξωγενής χορήγηση του ενδεχόμενου υπεύθυνου νευροδιαβιβαστή θα μπορούσε να επαναφέρει την μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες που φέρουν τη μετάλλαξη *unc-13(e51)*. Για τον σκοπό αυτό χορηγήσαμε εξωγενώς διάφορες συγκεντρώσεις των τριών κύριων νευροδιαβιβαστών και πιο συγκεκριμένα του GABA, της

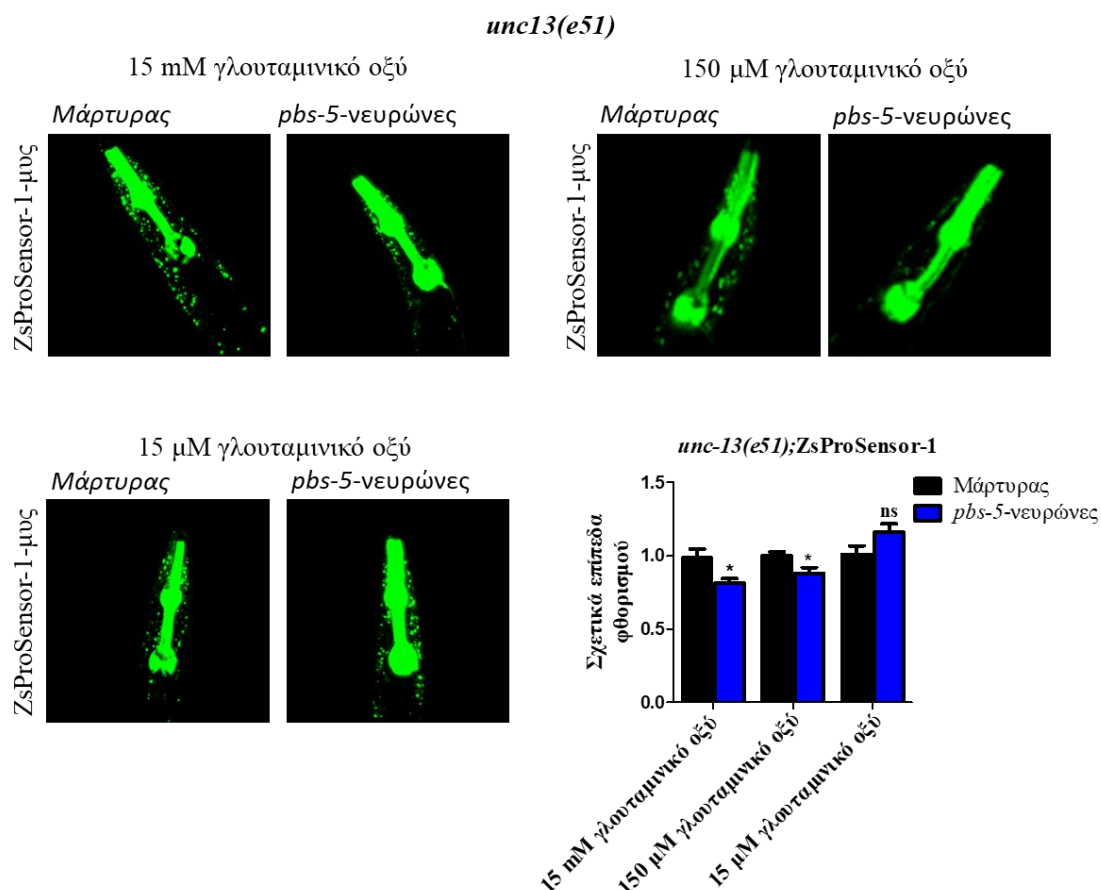
ακετυλοχολίνης και του γλουταμινικού οξέος στα στελέχη ZsProSensor-μυς; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-13(e51)* (εικόνες Γ14-Γ16).



Εικόνα Γ14. Η χορήγηση του GABA δεν αποκαθιστά την μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε μεταλλαγμένα *unc-13* στελέχη. Έκθεση σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις GABA (30 mM – πάνω αριστερά, 15 mM – πάνω δεξιά και 0.3 mM – κάτω αριστερά). Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών ZsProSensor-1-μυς τα οποία διασταυρώθηκαν με το στέλεχος μάρτυρα και το στέλεχος *pbs-5*-νευρώνες και φέρουν τη μετάλλαξη *unc-13* και ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω δεξιά). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων, >20 ζώα/συνθήκη, ns, μη σημαντικό.



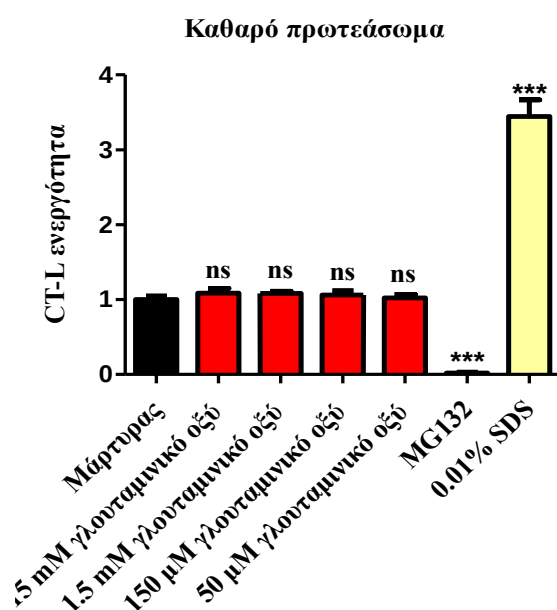
Εικόνα Γ15. Η χορήγηση ακετυλοχολίνης δεν αποκαθιστά την μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε μεταλλαγμένα *unc-13* στελέχη. Έκθεση σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ακετυλοχολίνης (100 mM – πάνω αριστερά, 10 mM – πάνω δεξιά και 50 μM – κάτω αριστερά). Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών ZsProSensor-1-μυς τα οποία διασταυρώθηκαν με το στέλεχος μάρτυρα και το στέλεχος *pbs-5-νευρώνες* και φέρουν τη μετάλλαξη *unc-13* και ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω δεξιά). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων, >20 ζώα/συνθήκη, ns, μη σημαντικό.



Εικόνα Γ16. Η εξωγενής χορήγηση του γλουταμινικού οξέος αποκαθιστά την μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε μεταλλαγμένα *unc-13* στελέχη. Έκθεση σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταμινικού οξέος (15 mM – πάνω αριστερά, 150 μM – πάνω δεξιά και 15 μM – κάτω αριστερά). Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών ZsProSensor-1-μυς τα οποία διασταυρώθηκαν με το στέλεχος μάρτυρα και το στέλεχος *pbs-5-νευρώνες* και φέρουν τη μετάλλαξη *unc-13*. Ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω δεξιά). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. >20 ζώα/συνθήκη, τιμή * $p < 0.05$, ns, μη σημαντικό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες Γ14 και Γ15, η εξωγενής χορήγηση διάφορων συγκεντρώσεων των νευροδιαβιβαστών GABA και ακετυλοχολίνης δεν επηρέασαν τα επίπεδα φθορισμού στους μυς των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες και φέρουν τη μετάλλαξη *unc-13(e51)*. Με τη χορήγηση όμως του γλουταμινικού οξέος, τα επίπεδα του φθορισμού στους μυς των στελεχών *pbs-5-νευρώνες* που φέρουν τη μετάλλαξη *unc-13(e51)* (εικόνα Γ16), παρουσίασαν την ίδια μείωση με τον φθορισμό στους μυς των στελεχών *pbs-5-νευρώνες* τα οποία δεν φέρουν τη μετάλλαξη (εικόνα Γ1β και Γ2β). Δείξαμε πως το γλουταμινικό οξύ μπορεί να αποκαταστήσει τη ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στους μυς των στελεχών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες και στερούνται λειτουργικών SCVs.

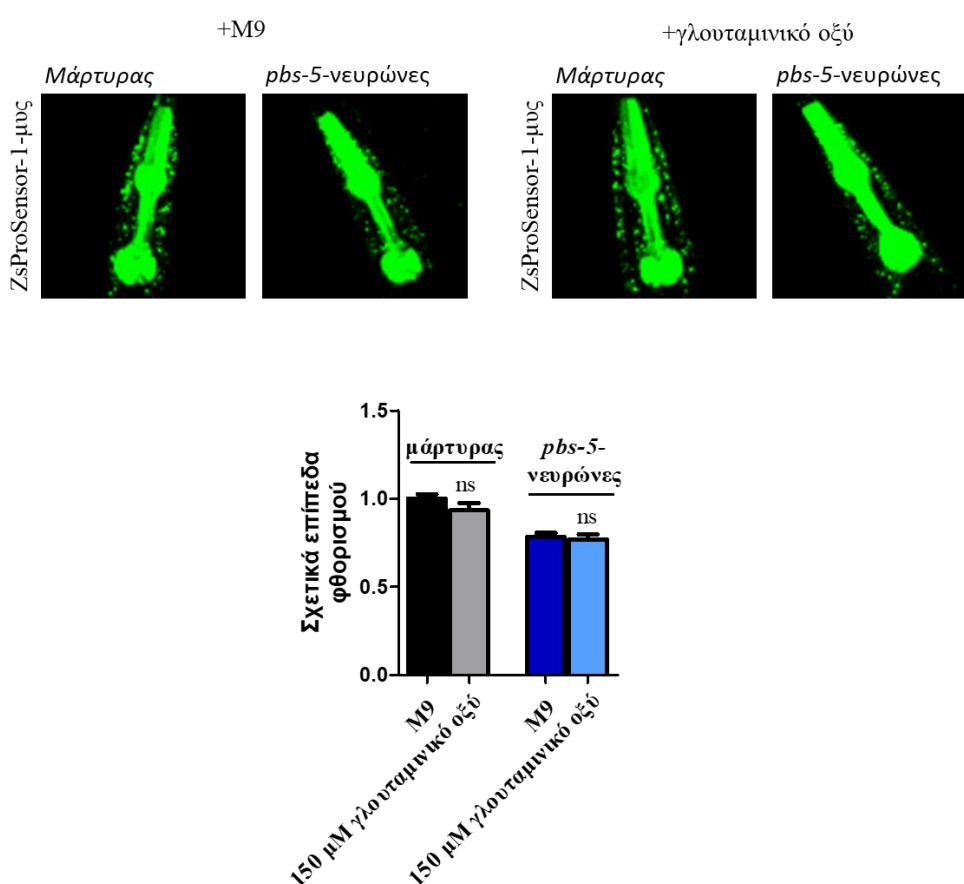
Η αποκατάσταση της μη αυτόνομης πρωτεασωμικής ρύθμισης κατά την εξωγενή προσθήκη του γλουταμινικού οξέος (**εικόνα Γ16**) οδήγησε στην ερώτηση μέσω ποιού μηχανισμού επιτυγχάνεται το αποτέλεσμα αυτό. Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε άμεση είτε σε έμμεση ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Έχει δειχθεί ότι η ενεργότητα του πρωτεασώματος μπορεί να τροποποιηθεί κατά την επίδραση ενώσεων με την επακόλουθη αλλαγή της στερεοδομής του και την μετάπτωση του πρωτεασώματος από την κλειστή πύλη (closed gate)/λανθάνουσα διαμόρφωση (latent form) στη διαμόρφωση ανοιχτή πύλη (open gate). Προκειμένου να αναλύσουμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου το γλουταμινικό οξύ διαμεσολαβεί στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος αρχικά, διερευνήσαμε το ενδεχόμενο της άμεσης στερεοχημικής επίδρασης του γλουταμινικού στο σύμπλοκο του πρωτεασώματος. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε επώαση καθαρού ανθρώπινου πρωτεασώματος με διάφορες συγκεντρώσεις γλουταμινικού οξέος και εκτιμήθηκε η ενεργότητά του. Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας κατά την απευθείας προσθήκη γλουταμινικού οξέος στο απομονωμένο σύμπλοκο, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση του γλουταμινικού στην πρωτεασωμική ενεργότητα είναι έμμεση (**εικόνα 17**).



Διάγραμμα Γ17. Ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) καθαρού 20S πρωτεασώματος παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλουταμινικού οξέος. Ο πρωτεασωμικός αναστολέας MG132 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας και το SDS ως θετικός. Η μέση τιμή της CT-L ενεργότητας στο δείγμα από το οποίο απουσιάζει το γλουταμινικό οξύ (μάρτυρας) ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως ο μέσος όρος 2 ανεξάρτητων πειραμάτων $\pm$ SEM, τιμή *** $p < 0,001$, ns, στατιστικά μη σημαντική.

Σε συνέχεια της διερεύνησης του μηχανισμού ενεργοποίησης του πρωτεασώματος μέσω του γλουταμινικού οξέος, ελέγξαμε εάν η εξωγενής προσθήκη γλουταμινικού οξέος απευθείας στα στελέχη αγρίου τύπου (στελέχη χωρίς τη

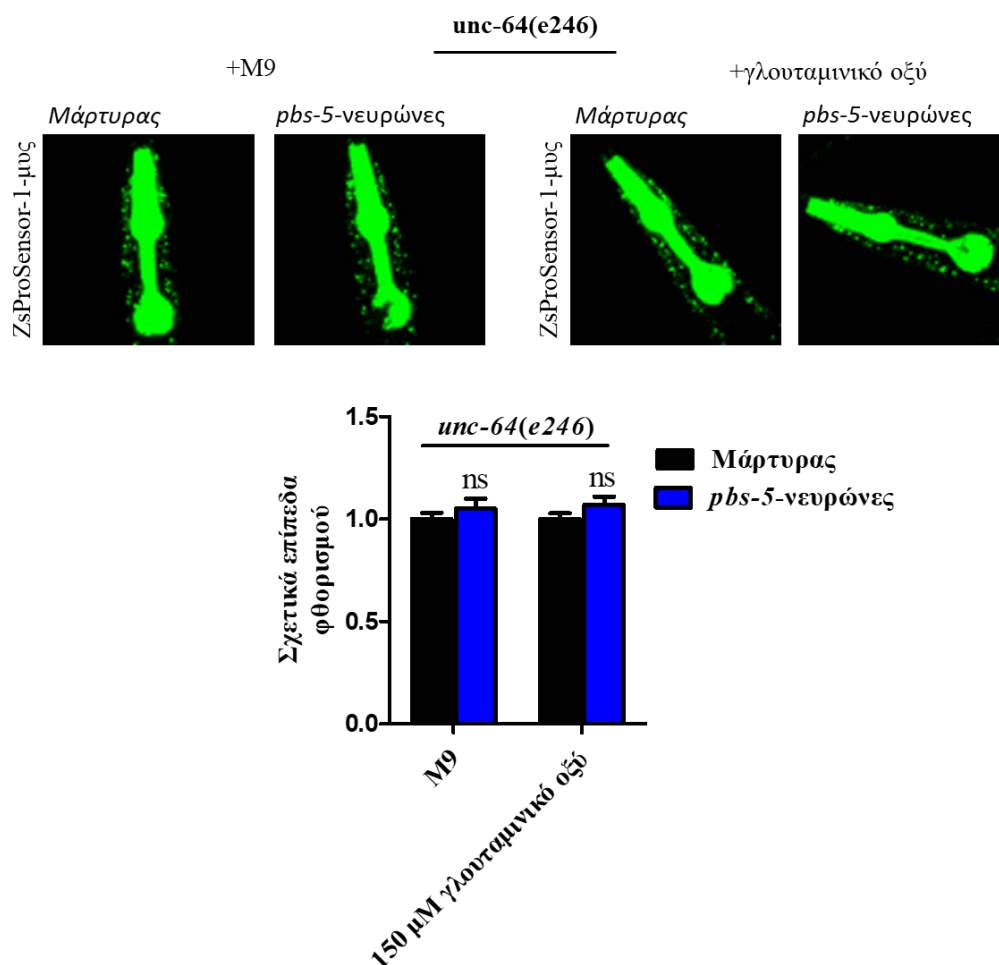
μετάλλαξη *unc-13(e51)*) μπορεί να επηρεάσει την ενεργότητα του πρωτεασώματος και κυρίως αν προσομοιάζει την πρωτεασωμική ενίσχυση που σημειώνεται στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ18**, από τη σύγκριση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες με και χωρίς την προθήκη γλουταμινικού οξέος, είδαμε πως η προσθήκη γλουταμινικού οξέος δεν επηρεάζει την πρωτεασωμική ενεργότητα στους μυς. Ομοίως, η προσθήκη γλουταμινικού οξέος δεν επηρέασε την ήδη αυξημένη πρωτεασωμική ενεργότητα στους μυς των στελεχών *ZsProSensor-1*-μυς; *pbs-5*-νευρώνες (**εικόνα Γ18**). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η πρωτεασωμική ενεργοποίηση στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες δεν οφείλεται σε μία γενική ή μη ειδική επίδραση γλουταμινικού οξέος στην πρωτεασωμική ενεργότητα αλλά πιθανότερα σε μία στοχευμένη διαδικασία, κατά την οποία είναι απαραίτητο να προηγηθεί η ιστοειδική υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου.



Εικόνα Γ18. Η εξωγενής προσθήκη γλουταμινικού οξέος δεν επηρεάζει την πρωτεασωμική ενεργότητα στα στελέχη αγρίου τύπου. Έκθεση σε M9 (ρυθμιστικό διάλυμα) ή σε 150μM γλουταμινικού οξέος. Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών *ZsProSensor-1*-μυς τα οποία διασταυρώθηκαν με το στέλεχος μάρτυρα και το στέλεχος *pbs-5*-νευρώνες (πάνω). Ποσοτικοποίηση του σήματος και σύγκριση των δεδομένων της σχετικής μεταβολής των επιπέδων φθορισμού μεταξύ του μάρτυρα ή μεταξύ των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες χωρίς την προσθήκη και με την προσθήκη 150 μM γλουταμινικού. Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και

οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων, >20 ζώα/συνθήκη, ns, μη σημαντικό.

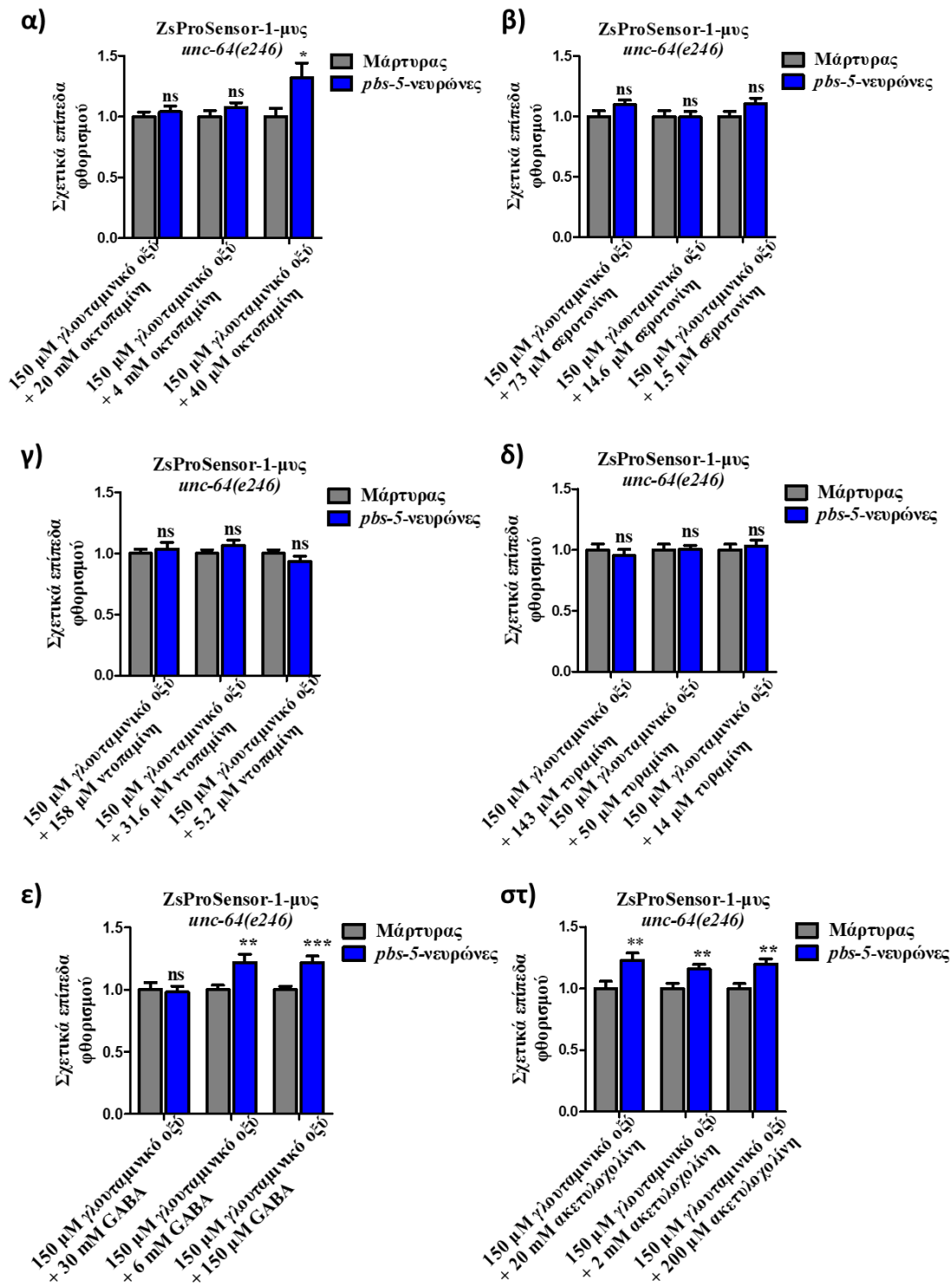
Στη συνέχεια, εξετάσαμε την υπόθεση εάν η εξωγενής προσθήκη γλουταμινικού οξέος αρκεί για να αποκαταστήσει τη μη αυτόνομη ρύθμιση του πρωτεασώματος μεταξύ του νευρομυϊκού ιστού σε στελέχη που φέρουν την μετάλλαξη *unc-64(e246)* και συνεπώς δεν διαθέτουν λειτουργικά SCVs και DCVs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **εικόνα Γ19** η προσθήκη του γλουταμινικού οξέος δεν επηρέασε την πρωτεασωματική ενεργοποίηση στους μυς των στελεχών *unc-64;pbs-5*-νευρώνες.



Εικόνα Γ19. Η χορήγηση γλουταμινικού οξέος δεν αποκαθιστά τη μη αυτόνομη κυτταρική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε μεταλλαγμένα *unc-64* στελέχη. Έκθεση σε M9 (ρυθμιστικό διάλυμα) ή σε 150 μM γλουταμινικό οξύ. Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού των στελεχών ZsProSensor-1-μυς τα οποία διασταυρώθηκαν με το στέλεχος μάρτυρα και το στέλεχος *pbs-5*-νευρώνες και φέρουν τη μετάλλαξη *unc-64*(πάνω). Ποσοτικοποίηση του σήματος (κάτω). Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων, >20 ζώα/συνθήκη, ns, στατιστικά μη σημαντική τιμή.

Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν πως το γλουταμινικό οξύ μπορεί να αποκαταστήσει την πρωτεασωμική ρύθμιση στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες με μετάλλαξη για το *unc-13* (τα οποία δεν διαθέτουν λειτουργικά SCVs αλλά έχουν DCVs) (εικόνα Γ16) αλλά δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα στα στελέχη που φέρουν τη μετάλλαξη *unc-64*. Δεδομένου ότι τα μεταλλαγμένα *unc-64* στελέχη έχουν αδυναμία σχηματισμού και απελευθέρωσης των SCVs και των DCVs, η αδυναμία του γλουταμινικού οξέος να αποκαταστήσει την ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες, υποδηλώνει ότι **το γλουταμινικό μπορεί να αντισταθμίσει την έλλειψη των SCVs μόνο παρουσία λειτουργικών DCVs**. Συνεπώς, αποδίδεται ένας ρόλος στα DCVs και στο φορτίο του σε αυτήν την επικοινωνία της πρωτεασωμικής ρύθμισης μεταξύ του νευρικού ιστού και του μυ.

Το φορτίο των DCVs αποτελείται κυρίως από νευροπεπτίδια και ενώ έχει βρεθεί πως εσωκλείουν και βιογενείς αμίνες. Προκειμένου να διερευνήσουμε τον ρόλο των DCVs σε αυτή την μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση εξετάσαμε εάν η χορήγηση γλουταμινικού οξέος (που κυρίως βρίσκεται στα SCVs) σε συνδυασμό με άλλους νευροδιαβιβαστές που ανήκουν στην κατηγορία των βιογενών αμινών και που πιθανότατα βρίσκονται στα DCVs, θα μπορούσε να αποκαταστήσει την πρωτεασωμική ενεργότητα στους μυς των στελεχών *pbs-5*-νευρώνες; *unc-64*. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκε στα ZsProSensor-1-μυς; *pbs-5*-νευρώνες; *unc-64* ζώα, γλουταμινικό οξύ (150 μ M που είχαμε δείξει να λειτουργεί σε προηγούμενα πειράματα, **εικόνα Γ16**) σε συνδυασμό με διάφορες συγκεντρώσεις οκτοπαμίνης, σεροτονίνης, ντοπαμίνης και τυραμίνης (**εικόνα Γ20**).



Εικόνα Γ20. Η χορήγηση γλουταμινικού οξέος σε συνδυασμό με άλλους νευροδιαβιβαστές δεν αποκαθιστά τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος στα στελέχη με μετάλλαξη *unc-64*. Ποσοτικοποίηση του σήματος των στελεχών ZsProsensory-1-μυς; *unc-64*; μάρτυρας και ZsProsensory-1-μυς; *unc-64*; *pbs-5*-νευρώνες έπειτα από εξωγενή προσθήκη 150 μM γλουταμινικού οξέος σε συνδυασμό με διάφορες συγκεντρώσεις (α) οκτοπαμίνης, (β) σεροτονίνης, (γ) ντοπαμίνης, (δ) τυραμίνης, (ε) GABA και, (στ) ακετυλοχολίνης. Η μέση τιμή του φθορισμού στο στέλεχος μάρτυρα ορίστηκε ως 1. Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος

όρος τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων, τουλάχιστον 10 ζώα/συνθήκη, *p τιμή <0,05 **p τιμή <0,01, ***p τιμή <0,001, ns, μη σημαντικό.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα Γ20**, δεν παρατηρήθηκε αποκατάσταση της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης του πρωτεασώματος με κανέναν από τους συνδυασμούς που εξετάστηκαν. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση γλουταμινικού οξέος σε συνδυασμό είτε με GABA είτε με ακετυλοχολίνη έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς των στελεχών ZsProSensor-1-μυς; *pbs-5*-νευρικός ιστός; *unc-64* **εικόνα Γ20ε-στ**). Αυτό υποδηλώνει ότι το GABA και η ακετυλοχολίνη (και πιθανά και άλλοι νευροδιαβιβαστές που δεν μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ή άλλοι συνδυασμοί) μπορεί να έχουν ανασταλτικούς ρόλους στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος που εξουδετερώνονται πιθανόν από σήματα που εξαρτώνται από τα DCVs. Το συμπέρασμα αυτό, υποστηρίζεται και από το γεγονός πως δεν παρατηρήθηκε αναστολή του πρωτεασώματος από το GABA ή την ακετυλοχολίνη σε ζώα που στερούνται λειτουργικά SCVs αλλά έχουν ανέπαφα τα DCVs (εικόνες Γ14 και Γ15). Προφανώς ο ρόλος των DCVs σε αυτή την επικοινωνία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης στο μέλλον.

Δ. Συζήτηση

Η διατήρηση της πρωτεόστασης είναι μια δυναμική και πολύπλοκη διαδικασία που είναι κρίσιμη για την επιβίωση και τη λειτουργία των κυττάρων. Η ακεραιότητα της πρωτεόστασης διασφαλίζεται μέσω του ΔΠ το οποίο είναι ένα πολύπλοκο σύστημα μηχανισμών υπεύθυνο για την ορθή αναδίπλωση και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών με τη βοήθεια μοριακών συνοδών (HSPs) αλλά και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών κυρίως μέσω του UPS και του ALP. Με την εξέλιξη της γήρανσης, η λειτουργία του ΔΠ φθίνει διαταράσσοντας έτσι την πρωτεόσταση, ενώ παράλληλα η παρουσία μη λειτουργικών πρωτεϊνών που συσσωρεύονται οδηγεί με τη σειρά της σε δυσλειτουργία των μηχανισμών του ΔΠ. Διαταραχές στους μηχανισμούς του ΔΠ σχετίζονται με διάφορες ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες, όπως οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις που συνδέονται με τη συσσώρευση μη φυσιολογικών και μη λειτουργικών πρωτεϊνών με χαρακτηριστικό παράδειγμα την AD. Η συμβολή των μηχανισμών του ΔΠ στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις έχει ωθήσει στη διεξαγωγή ερευνών για την ανάπτυξη θεραπειών στοχεύοντας μοριακούς παίκτες του ΔΠ. Η κατανόηση της ρύθμισης και της λειτουργίας αυτού του δικτύου, μπορεί να προσφέρει σημαντικές γνώσεις για βιολογικές διαδικασίες και μηχανισμούς ασθενειών, ενώ αποτελεί απαραίτητο εργαλείο για τον σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων που αφορούν τη γήρανση και τις παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με αυτή. Οι προσεγγίσεις στη διερεύνηση της συμβολής του ΔΠ στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες παθολογικές καταστάσεις έχουν εστιάσει ως επί το πλείστον στην αυτόνομη κυτταρική ρύθμισή του, δηλαδή στη μελέτη της απόκρισης του ίδιου του κυττάρου που δέχεται το ερέθισμα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών αποκαλύπτει πως σημαντικοί πρωτεοστατικοί μηχανισμοί υπόκεινται σε μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση, δηλαδή η ιστοειδική ρύθμισή τους επηρεάζει απομακρυσμένους ιστούς. Παρόλα αυτά, αυτή η μορφή ρύθμισης δεν έχει διερευνηθεί για έναν από τους σημαντικότερους παίκτες του ΔΠ, το πρωτεάσωμα. Η διερεύνηση της ενδεχόμενης μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης του πρωτεασώματος αποτελεί το βασικό αντικείμενο έρευνας της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής.

Στόχος της συγκεκριμένης διατριβής είναι η μελέτη της ιστοειδικής υπερέκφρασης του πρωτεασώματος και των αποτελεσμάτων αυτής **1)** τόσο σε αυτόνομο όσο και σε μη αυτόνομο κυτταρικό επίπεδο, **2)** στο προσδόκιμο ζωής του οργανισμού, **3)** στην ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες και, **4)** στην επαγωγή και εξέλιξη της AD. Επιπλέον, ένας εξίσου σημαντικός στόχος είναι **5)** η διερεύνηση των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν μία τέτοια ενδεχόμενη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση. Συνοπτικά, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αξιοποιώντας τον *C. elegans*, αποκαλύψαμε πως το πρωτεάσωμα υπόκειται τόσο σε αυτόνομη όσο και σε μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση. Συγκεκριμένα, δείξαμε πως **1)** η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας (*pbs-5*) στους μυς του *C. elegans* ενισχύει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στον ίδιο ιστό (αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση). Παράλληλα αποκαλύψαμε για πρώτη φορά πως μέσω μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης, η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες ή στο έντερο του σκώληκα ενισχύει την πρωτεασωμική ενεργότητα στους μυς του σκώληκα, ενώ η υπερέκφρασή του στους μυς μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στο έντερο του ζώου. **2)** Η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη γήρανση του *C. elegans*. Πιο συγκεκριμένα η υπερέκφρασή του στους νευρώνες επηρεάζει θετικά το προσδόκιμο ζωής του αλλά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την υγιή του γήρανση (ευζωία). Αντίθετα, η ιστοειδική υπερέκφρασή του στους μυς ή στο έντερο έχει αρνητική

επίδραση τόσο στο προσδόκιμο ζωής όσο και στην ευζωία. **3)** Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, τα στελέχη που εκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* (α) στους μυς είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, (β) στο έντερο είναι ανθεκτικά έναντι συγκεκριμένων παραγόντων οξειδωτικού στρες, και (γ) στους νευρώνες δεν εμφανίζουν ούτε ευαισθησία ούτε ανθεκτικότητα. **4)** Το αποτέλεσμα τόσο της αυτόνομης όσο και της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης του πρωτεασώματος οδηγεί σε προστασία έναντι της τοξικότητας που σχετίζεται με το ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο που εκφράζεται στους μυς του ζώου. **5)** Τέλος, δείξαμε πως η μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος μεταξύ του νευρικού και του μυϊκού ιστού εξαρτάται από την ακεραιότητα των SCVs και το γλουταμινικό οξύ.

Στην παρούσα διατριβή αποκαλύπτεται για πρώτη φορά η μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος όπως έχειδειχθεί για άλλους σημαντικούς πρωτεοστατικούς μηχανισμούς όπως το HSR, το UPR^{ER}, το UPR^{mt} και η αυτοφαγία (Taylor *et al*, 2014; Morimoto, 2020; Selarka & Shrivage, 2024). Αυτή η μορφή ρύθμισης είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους πολυκύτταρους οργανισμούς, όπου η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ανταπόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Επιπλέον, η μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση της πρωτεόστασης αποκτά μεγάλο ενδιαφέρον στην εξέλιξη της γήρανσης και στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Η γήρανση μπορεί να επηρεάσει την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων μέσω σημάτων ή παραγόντων που προέρχονται από γειτονικά ή απομακρυσμένα κύτταρα συντονίζοντας την εξέλιξή της (Medkour *et al*, 2016). Η απελευθέρωση της ινσουλίνης και του παράγοντα IGF-1 αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα ρυθμιστή της μακροζωίας που επηρεάζει τόσο γειτονικούς όσο και απομακρυσμένους ιστούς οδηγώντας σε επέκταση του οργανισμικού προσδόκιμου ζωής (Kenyon *et al*, 1993; Arfeld & Kenyon, 1998). Αντίστοιχα, στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, η βλάβη στον νευρικό ιστό επηρεάζει και άλλους ιστούς ενώ παράλληλα, σηματοδότηση που προέρχεται από γειτονικά ή απομακρυσμένα κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την υγεία των νευρικών κυττάρων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να επιταχύνουν ή να επιβραδύνουν την πρόοδο των νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως η AD (Vu *et al*, 2023).

Παρά τον εξαιρετικά σημαντικό ρόλο του πρωτεασώματος στο ΔΠ και της συμβολής του στη γήρανση και στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, ελάχιστες μελέτες μέχρι στιγμής αναφέρονται στην πιθανή μη αυτόνομη ρύθμισή του. Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν την δημιουργία στελεχών *D. melanogaster* και ποντικού τα οποία υπερεκφράζουν ιστοειδικά στους νευρώνες τη β5 πρωτεασωμική υπομονάδα (Munkácsy *et al*, 2019; Chocron *et al*, 2022). Παρόλα αυτά οι μελέτες αυτές επικεντρώθηκαν κυρίως στη συνολική φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού και στη μακροζωία, χωρίς να εστιάζουν στην επίδραση μιας ενδεχόμενης μη αυτόνομης ρύθμισης σε άλλους ιστούς. Σχετικά με τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος, οι πληροφορίες περιορίζονται στην παρατήρηση, πως απουσία της βλαστικής σειράς στον *C. elegans* αυξάνεται η ενεργότητα του πρωτεασώματος στα σωματικά κύτταρα, καθώς επίσης και στην αναφορά ότι η ιστοειδική υπερέκφραση του *Gclc* γονιδίου (glutamate–cysteine ligase catalytic subunit, γονίδιο στόχος του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2) στον νευρικό ιστό της *D. melanogaster*, μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρωτεασωμική λειτουργία στον θώρακα του ζώου, έναν ιστό που αποτελείται κυρίως από μυϊκά κύτταρα (Vilchez *et al*, 2012;

Moskalev *et al*, 2019). Καμία από τις μελέτες αυτές ωστόσο δεν αναφέρεται στη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση της ενεργότητας του πρωτεασώματος μέσω γενετικού χειρισμού της έκφρασής του.

Στην έρευνά μας δείξαμε πως η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες του *C. elegans* επάγει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στους μυς αλλά δεν επηρεάζει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στο έντερο του ζώου. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το νευρικό σύστημα αναδεινύεται ως ο κυρίαρχος ρυθμιστής της μη αυτόνομης κυτταρικής επικοινωνίας των πρωτεοστατικών μηχανισμών (Zhu & Cohen, 2023). Έρευνες έχουν δείξει πως η σηματοδότηση από τους νευρώνες που οδηγεί σε μη αυτόνομη κυτταρική απόκριση της πρωτεόστασης, μπορεί να επαχθεί ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα, όπως το θερμικό σοκ ή ως απόκριση σε λάθος αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (UPR^{ER}, UPR^{mt}) (Bishop & Guarente, 2007; Durieux *et al*, 2011; Taylor & Dillin, 2013; Shao *et al*, 2016). Η σηματοδότηση από ενεργοποίηση των μηχανισμών του ΔΠ στους νευρώνες του *C. elegans* έχειδειχθεί πως μπορεί να ενισχύσει την ενεργοποίηση των μηχανισμών του ΔΠ σε απομακρυσμένους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη σχετική αναφορά έγινε από τους Taylor και Dillin το 2013, σύμφωνα με την οποία η υπερέκφραση του γονιδίου *xbp-1s* στους νευρώνες του *C. elegans* επάγει την ενεργοποίηση του UPR^{ER} στο έντερο και επιμηκύνει το προσδόκιμο ζωής (Taylor & Dillin, 2013). Ακόμα ένα παράδειγμα αποτελεί η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *hsp90* στους νευρώνες η οποία παρέχει προστασία έναντι ασταθών πρωτεϊνών που εκφράζονται στους μυς. Η υπερέκφραση της HSP90 στους νευρώνες οδηγεί σε θετική ρύθμιση της HSP90 σε απομακρυσμένους ιστούς (Van Oosten-Hawle *et al*, 2013; O'Brien *et al*, 2018). Επιπλέον, έχειδειχθεί πως η ενεργοποίηση του UPR^{ER} στους νευρώνες του *C. elegans* επηρεάζει τη λειτουργία των λυσοσωμάτων στο έντερο του σκώληκα (Imanikia *et al*, 2019). Η μελέτη αυτή αποτελεί την μοναδική αναφορά σύμφωνα με την οποία ενίσχυση ενός πρωτεοστατικού μηχανισμού σε ένα ιστό μπορεί να επηρεάσει κυτταρικά μη αυτόνομα τη ρύθμιση ενός πρωτεολυτικού μηχανισμού σε έναν άλλο ιστό.

Αν και ο νευρικός ιστός θεωρείται κυρίαρχος ρυθμιστής της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης της πρωτεόστασης, σημαντικό ρόλο στη μετάδοση πληροφορίας μεταξύ των ιστών διαδραματίζει και το έντερο. Το έντερο μπορεί να είναι τόσο αποδέκτης μηνυμάτων όσο και ρυθμιστής της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης της πρωτεόστασης (Hodge *et al*, 2022). Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν για πρώτη φορά τη συμβολή του εντέρου ως αποδέκτη και ως ρυθμιστή της μη αυτόνομης ρύθμισης του πρωτεασώματος. Δείξαμε πως η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στο έντερο έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στους μυς (δράση ως ρυθμιστής). Στην πλειοψηφία τους, οι αναφορές ως προς τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του ΔΠ μεταξύ εντέρου και μυών, αναφέρονται στην επίδραση των ιστοειδικών μεταβολών του ΔΠ του εντέρου προς τους μυς. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της HSP-90 στο έντερο του *C. elegans* ενισχύει την έκφραση της HSP-90 στους μυς (O'Brien *et al*, 2018). Αντίθετα, η αποσιώπηση του γονιδίου *hsp-90* στο έντερο οδηγεί σε ενίσχυση της έκφρασης του *hsp-70* στους μυς η οποία με της σειρά της έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανθεκτικότητας του οργανισμού σε συνθήκες θερμικού στρες και την επέκταση του προσδόκιμου ζωής

(Miles *et al*, 2023). Από την πλευρά του αποδέκτη, στη μελέτη μας δείχνουμε πως η ενεργότητα του πρωτεασώματος στο έντερο επηρεάζεται, και πιο συγκεκριμένα φθίνει, όταν το γονίδιο *pbs-5* εκφράζεται στους μυς. Η μείωση αυτή, θα μπορούσε να οφείλεται στην παρουσία ενός μηχανισμού αναδραστικής αναστολής (feedback inhibition). Ένας από τους μηχανισμούς που θα μπορούσε να επιφέρει τέτοια αποτελέσματα στην ενεργότητα του πρωτεασώματος είναι το ALP (Raffener *et al*, 2023; Lee *et al*, 2019). Έχειδειχθεί πως υπερέκφραση του παράγοντα XBP-1s στους νευρώνες ή σε γλοιακά κύτταρα του *C. elegans* μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των λυσοσωμικών γονιδίων και την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στο έντερο του σκώληκα (Imanikia *et al*, 2019; Metcalf *et al*, 2024).

Τα πειράματά μας δείχνουν πως η νευροειδική και η καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* ενισχύουν το προσδόκιμο ζωής και διατηρούν την ευζωία. Τα αποτελέσματά μας, ως προς την καθολική υπερέκφραση του πρωτεασώματος, βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες καθώς έχειδειχθεί πως η συστηματική αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας μπορεί να επεκτείνει το προσδόκιμο ζωής πολυκύτταρων οργανισμών όπως ο *C. elegans* και η *D. melanogaster* (Vilchez *et al*, 2012; Chondrogianni *et al*, 2015a; Nguyen *et al*, 2019). Σε ό,τι αφορά την ιστοειδική ρύθμιση των πρωτεοστατικών μηχανισμών, έχειδειχθεί πως η ιστοειδική ρύθμιση της αυτοφαγίας, μέσω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Atg18 στους νευρώνες γηρασμένων μυών, αυξάνει το προσδόκιμο ζωής (Simonsen *et al*, 2008; Minnerly *et al*, 2017). Η επίδραση της ιστοειδικής ρύθμισης του πρωτεασώματος στη γήρανση έχειμελετηθεί μέχρι στιγμής μόνο σε μία πρόσφατη ερευνητική εργασία και αφορά την υπερέκφραση της β5 υπομονάδα στους νευρώνες (Munkácsy *et al*, 2019). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, η νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *Prosβ5* στη *D. melanogaster* επεκτείνει το προσδόκιμο ζωής και επιβραδύνει την εμφάνιση ηλικιοεξαρτώμενων προβλημάτων που αφορούν στη μάθηση και στη μνήμη (Munkácsy *et al*, 2019). Ωστόσο, στην ίδια έρευνα, η ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας καθολικά δεν οδηγεί σε επέκταση του προσδόκιμου ζωής στην *D. melanogaster*, ένα αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Nguyen και συνεργατών (Nguyen *et al*, 2019). Συνεπώς, παρόλο που έχειαναφερθεί η θετική επίδραση της νευροειδικής υπερέκφρασης του πρωτεασώματος στο προσδόκιμο ζωής στη *D. melanogaster*, τα δεδομένα υποδηλώνουν, ότι παρόλο που η δροσόφιλα είναι εξελικτικά ανώτερη σε σύγκριση με τον *C. elegans*, η βιολογία του πρωτεασώματος φαίνεται να διαφέρει σημαντικά με αυτή των νηματωδών και των ανθρώπινων κυττάρων. Μέχρι στιγμής, οι ομοιότητες φαίνεται να είναι περισσότερες ανάμεσα στον σκώληκα και στα ανθρώπινα κύτταρα όσον αφορά το πρωτεάσωμα.

Σε αντίθεση με την υπερέκφραση του πρωτεασώματος στους νευρώνες, είδαμε πως η ιστοειδική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στους μυς ή στο έντερο έχουν αρνητικό αντίκτυπο στο προσδόκιμο ζωής αλλά και σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη γήρανση του *C. elegans*. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η ιστοειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* επηρεάζει διαφορετικά την εξέλιξη της γήρανσης ολόκληρου του οργανισμού ανάλογα τον ιστό στον οποίο πραγματοποιείται αυτή. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως υπάρχει πολύ συγκεκριμένη ρύθμιση και δεν αρκεί απλά μια υπερέκφραση σε οποιονδήποτε ιστό. Αν και δεν υπάρχει προηγούμενη ανάλογη εργασία που να σχετίζεται με το πρωτεάσωμα, κάτι ανάλογο

έχει δειχθεί για άλλους πρωτεοστατικούς μηχανισμούς. Παράδειγμα αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας *xbp-1s* ο οποίος έχει διαφορετική επίδραση στο προσδόκιμο ζωής, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εκφράζεται. Η υπερέκφραση του γονιδίου *xbp-1s* στους νευρώνες ή στο έντερο του *C. elegans* επιμηκύνουν το προσδόκιμο ζωής ενώ η υπερέκφρασή του στους μυς επιφέρει μείωση του προσδόκιμου ζωής. Επιπλέον, η καθολική υπερέκφραση του γονιδίου *xbp-1s* δεν έχει καμία επίδραση στο προσδόκιμο ζωής του *C. elegans* (Taylor & Dillin, 2013). Ένα δεύτερο παράδειγμα αποτελεί η διατάραξη της λειτουργίας της ETC ιστοειδικά στους νευρώνες. Μεταλλάξεις της ETC σε πολλά ζωικά μοντέλα είναι γνωστό ότι ενισχύουν το προσδόκιμο ζωής. Η νευροειδική έλλειψη του γονιδίου *cco-1* (συστατικό της ETC) στον *C. elegans* οδηγεί σε απόκριση του UPR^{mt} στο έντερο του ζώου και σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Όμοια αποτελέσματα έχει και η συστημική (καθολική) έλλειψη του *cco-1*. Αντιθέτως, η έλλειψη του γονιδίου *cco-1* στους μυς του σκώληκα έχει αρνητικό αντίκτυπο στο προσδόκιμο ζωής του ζώου (μείωση) (Durieux *et al*, 2011). Η παρατήρηση αυτή, δείχνει πως παρόμοιες στρεσογόνες καταστάσεις έχουν διαφορετικές επιδράσεις σε κάθε ιστό και δεν διεργαίρουν τους ίδιους προστατευτικούς μηχανισμούς.

Οι προσεγγίσεις που οδηγούν σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής συχνά αποδεικνύεται ότι ενισχύουν και την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες (Matsumaru & Motohashi, 2021; Vatner *et al*, 2020). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν πως η ενίσχυση του πρωτεασώματος σε όλους του ιστούς του *C. elegans* προσφέρει προστασία έναντι των οξειδωτικών παραγόντων NaN_3 και paraquat, όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενη έρευνα της ομάδας μας (Chondrogianni *et al*, 2015a). Ωστόσο, δεν παρατηρείται αντίστοιχη προστατευτική δράση όταν το πρωτεάσωμα εκφράζεται ιστοειδικά στους νευρώνες του ζώου. Τα στελέχη που εκφράζουν ιστοειδικά το γονίδιο *pbs-5* στο έντερο παρουσίασαν ανθεκτικότητα στον οξειδωτικό παράγοντα paraquat αλλά όχι στον παράγοντα NaN_3 . Αντίθετα, τα στελέχη με υπερέκφραση του *pbs-5* γονιδίου στους μυς παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία και στους δύο οξειδωτικούς παράγοντες. Οι διαφορές απόκρισης απέναντι στο οξειδωτικό στρες μεταξύ των στελεχών που υπερεκφράζουν το *pbs-5* γονίδιο καθολικά και των στελεχών που το υπερεκφράζουν ιστοειδικά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Δείχνουν πως η δράση του πρωτεασώματος, τόσο στη γήρανση όσο και στην ανθεκτικότητα έναντι του οξειδωτικού στρες, έχει έναν σύνθετο χαρακτήρα όπου αναλόγως του ερεθίσματος πιθανώς να εμπλέκονται διαφορετικά μονοπάτια. Την υπόθεση αυτή στηρίζει η παρατήρηση πως η συστημική έκφραση του πρωτεασώματος, μέσω υπερέκφρασης της $\beta 5$ υπομονάδας, επιδρά στην ενίσχυση της βιωσιμότητας της *D. melanogaster* αλλά δεν προσδίδει στη μύγα ανθεκτικότητα σε συνθήκες υπεροξίας (hyperoxia) (Nguyen *et al*, 2019). Αντιθέτως, η συστημική υπερέκφραση της $\beta 5$ υπομονάδας στον *C. elegans* προσδίδει ανθεκτικότητα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Chondrogianni *et al*, 2015a).

Η μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του ΔΠ έχει σημαντικό ρόλο και στην εξέλιξη διαφόρων πρωτεϊνοπαθειών. Αποκαλύψαμε για πρώτη φορά πως η ιστοειδική ενίσχυση της πρωτεασωματικής έκφρασης παρέχει προστασία έναντι του πρωτεοτοξικού στρες που σχετίζεται με το Αβ πεπτιδίο, τόσο στον ίδιο ιστό που εκφράζεται όσο και σε απομακρυσμένους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5* στους νευρώνες ή στους μυς του *C. elegans* παρέχει αυτόνομη κυτταρική προστασία έναντι του ανθρώπινου Αβ πεπτιδίου που εκφράζεται στους ίδιους ιστούς. Ακόμα πιο

ενδιαφέρον όμως είναι το γεγονός ότι η ιστοειδική ενίσχυση της έκφρασης του πρωτεασώματος στον νευρικό ιστό ή στο έντερο του *C. elegans* παρέχει προστασία έναντι του πρωτεοτοξικού στρες στους μυς. Μέχρι σήμερα, έχειδειχθεί πως η συστημική έκφραση της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας στο σκουλήκι, στη μύγα και στο ποντίκι παρέχει προστασία έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από τη συσσώρευση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Chondrogianni *et al*, 2015a; Chocron *et al*, 2022). Δεν υπάρχουν ωστόσο δεδομένα που να αφορούν την επίδραση της ιστοειδικής υπερέκφρασης του πρωτεασώματος στην προστασία έναντι πρωτεοτοξικού στρες είτε στον ίδιο είτε σε άλλον ιστό. Μη αυτόνομη κυτταρική δράση έχει παρατηρηθεί για το UPR^{ER} μονοπάτι, όπου η υπερέκφραση του *xbp-1s* στους νευρώνες ή στο έντερο του σκώληκα, παρέχει προστασία έναντι της τοξικότητας συσσωματωμάτων στους μυς του ζώου (Imanikia *et al*, 2019; Frakes *et al*, 2020). Παρόμοια, η υπερέκφραση της HSP-90 στο έντερο του *C. elegans* οδηγεί σε ενίσχυση της έκφρασης της HSP-90 στους μυς με επακόλουθη καθυστέρηση της συσσωμάτωσης του Αβ πεπτιδίου στους μυς (O'Brien *et al*, 2018).

Ένα εύλογο ερώτημα που προκύπτει από τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν είναι το πώς επιτυγχάνεται αυτή η μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος. Ο τρόπος επικοινωνίας του νευρικού συστήματος με τους περιφερικούς ιστούς, μηχανιστικά, επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης εξωκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων (Bishop & Guarente, 2007; Wolkow *et al*, 2000). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η παρουσία των SCVs απαιτείται για τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος μεταξύ των νευρώνων που υπερεκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* και τους μυς. Επιπλέον, ανάμεσα στους νευροδιαβιβαστές που εσωκλείονται στα SCVs, τον κυριότερο ρόλο στη επικοινωνία μεταξύ νευρώνων και μυών ως προς τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος φαίνεται να έχει το γλουταμινικό οξύ, χωρίς ωστόσο να αποκλείουμε τη συμμετοχή και άλλων νευροδιαβιβαστών. Στα ζώα που στερούνται λειτουργικών SCVs και εκφράζουν το γονίδιο *pbs-5* στους νευρώνες, χάνεται η σηματοδότηση που οδηγεί σε ενίσχυση του πρωτεασώματος και η προστατευτική δράση έναντι του πρωτεοτοξικού στρες στους μυς. Η εξωγενής χορήγηση του γλουταμινικού οξέος μπορεί να επαναφέρει πλήρως αυτή την επικοινωνία. Η παρουσία ακέραιων SCVs έχειδειχθεί πως απαιτείται και για τη μη αυτόνομη κυτταρική ενίσχυση του UPR^{ER} μονοπατιού σε στελέχη *C. elegans* που υπερεκφράζουν το γονίδιο *xbp-1s* στους νευρώνες (Taylor & Dillin, 2013). Έχειδειχθεί πως σημαντικό ρόλο σε αυτή τη ρύθμιση έχει η σεροτονίνη (Higuchi-Sanabria *et al*, 2020). Σε άλλη εργασία έχειδειχθεί πως η υπερέκφραση της HSP90 στους νευρώνες οδηγεί σε θετική ρύθμιση της HSP90 σε απομακρυσμένους ιστούς μέσω γλουταμινεργικής σηματοδότησης (Van Oosten-Hawle *et al*, 2013; O'Brien *et al*, 2018).

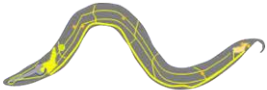
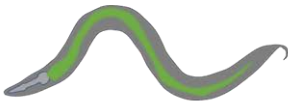
Η επίδραση του γλουταμινικού οξέος στο πρωτεάσωμα θα μπορούσε να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Η άμεση επίδραση στο σύμπλοκο του πρωτεασώματος αποκλείστηκε μέσω των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε καθαρό πρωτεάσωμα, όπου η χορήγηση του γλουταμινικού οξέος απευθείας σε απομονωμένο 20S πρωτεάσωμα δεν ήταν ικανή να ενισχύσει την ενεργότητα του πρωτεασώματος. Επιπλέον, η χορήγηση γλουταμινικού οξέος τόσο σε στελέχη αγρίου τύπου όσο και σε στελέχη με νευροειδική υπερέκφραση του γονιδίου *pbs-5*, δεν ενισχύει επιπλέον τη

διαφορά στα επίπεδα της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση πρωτεασώματος στον μυς των ζώων με νευροειδική έκφραση του γονιδίου *rbs-5* δεν οφείλεται σε μια γενική ή μη ειδική δράση ενεργοποίησης του πρωτεασώματος από το γλουταμινικό οξύ αλλά σε μια συγκεκριμένη ρυθμιζόμενη διαδικασία. Δεδομένων των πολλαπλών ρόλων του γλουταμινικού οξέος, κυρίως ως νευροδιαβιβαστής αλλά και ως πρόδρομο της γλουταθειόνης ή ως ρυθμιστή του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος μόλις αυτό μετατραπεί σε α-κετογλουταρικό, το γλουταμινικό οξύ θα μπορούσε να συμβάλει σε οξειδοαναγωγικές ή ενεργειακές μεταβολές που θα μπορούσαν να επηρεάσουν σημαντικά τη λειτουργία του πρωτεασώματος (Zhou & Danbolt, 2014; Magi *et al*, 2019). Για τις απαντήσεις σε αυτές τις υποθέσεις απαιτούνται πιο εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τις μεταβολικές επιδράσεις της υπερέκφρασης του γονιδίου *rbs-5* στους νευρώνες και τον ρόλο του γλουταμινικού οξέος.

Τα δεδομένα μας αποδεικνύουν πως είναι απαραίτητη συμμετοχή των SCVs στη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος μεταξύ των νευρώνων και του μυ, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις της συμμετοχής και των DCVs σε αυτή τη ρύθμιση. Το περιεχόμενο των DCVs έχει εξίσου σημαντική θέση στη μη αυτόνομη ρύθμιση του ΔΠ με εκείνο των SCVs. Έχει δειχθεί πως ο ρόλος των DCVs είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του UPR^{ER} και της αυτοφαγίας στο έντερο των στελεχών *C. elegans* που υπερεκφράζουν τον παράγοντα XBP-1s σε γλοιακά κύτταρα (Frakes *et al*, 2020; Metcalf *et al*, 2024). Δεδομένου ότι τα DCVs περιέχουν νευροπεπτίδια τα οποία είναι υποψήφια υποστρώματα του πρωτεασώματος, αλλά και λαμβάνοντας υπόψη την ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον απομακρυσμένο ιστό, θα αναμέναμε να αποτελούν πιθανότερο υποψήφιο αυτής της νευρομυϊκής επικοινωνίας σε σχέση με τα SCVs. Επιπλέον, έχει προταθεί η ύπαρξη μιας μορφής του 20S πρωτεασώματος η οποία είναι συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη των νευρώνων και εκτείνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτός ο τύπος πρωτεασώματος φαίνεται να μεσολαβεί στην αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών σε βιοενεργά εξωκυτταρικά πεπτίδια που ρυθμίζουν τη νευρωνική λειτουργία (He *et al*, 2023; Ramachandran & Margolis, 2017). Τα δεδομένα αυτά, δείχνουν πως η εμπλοκή των DCVs χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επιπλέον, η πιθανή συμβολή του συγκεκριμένου τύπου πρωτεασώματος (20S πρωτεάσωμα στην πλασματική μεμβράνη νευρικών κυττάρων) και των ενδεχόμενων πεπτιδίων που παράγονται, χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση.

Εν κατακλείδι, στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και οι επιπτώσεις της ιστοειδικής έκφρασης του πρωτεασώματος στη ρύθμιση του πρωτεασώματος σε απομακρυσμένους ιστούς, αποκαλύπτοντας τόσο την αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση αλλά και για πρώτη φορά τη μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμισή του. Η ιστοειδική αυτή έκφραση, αναλόγως τον ιστό στον οποίο πραγματοποιείται - νευρώνες, έντερο, μυς-, έχει διαφορετική δράση έναντι στρεσογόνων παράγοντων όπως το πρωτεοτοξικό και το οξειδωτικό στρες, και διαφορετική επίδραση στο οργανισμικό προσδόκιμο ζωής. Δείξαμε επίσης πως η απομακρυσμένη πρωτεασωμική επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και των μυών πραγματοποιείται μέσω των SCVs με τη βοήθεια τουλάχιστον του γλουταμινικού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται συνοπτικά στον **πίνακα Δ1**.

Πίνακας Δ1. Επιπτώσεις της ιστοειδικής υπερέκφρασης του γονιδίου *pbs-5*

Ιστοειδική έκφραση <i>pbs-5</i>	Δράση
<i>pbs-5</i>-νευρώνες 	- Αύξηση του προσδόκιμου ζωής και διατήρηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που φθίνουν με τη γήρανση - Διαμεσολαβούμενη από τα SCVs ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς (μη αυτόνομη ρύθμιση) - Απουσία επίδρασης στην πρωτεασωμική ενεργότητα στο έντερο - Καθυστέρηση του φαινοτύπου παράλυσης που προκαλείται από την έκφραση του ανθρώπινου Αβ στους μυς (μη αυτόνομη ρύθμιση) - Καθυστέρηση του επαγόμενου από το ανθρώπινο Αβ πεπτιδίο εκφυλισμού των γλουταμινεργικών νευρώνων (αυτόνομη ρύθμιση)
<i>pbs-5</i>-έντερο 	- Μείωση του προσδόκιμου ζωής - Ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς (μη αυτόνομη ρύθμιση) - Προστασία έναντι οξειδωτικού στρες - Καθυστέρηση του φαινοτύπου παράλυσης που προκαλείται από την έκφραση του ανθρώπινου Αβ στους μυς (μη αυτόνομη ρύθμιση)
<i>pbs-5</i>-μυς 	- Μείωση του προσδόκιμου ζωής - Ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στους μυς (αυτόνομη ρύθμιση) - Μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στο έντερο (μη αυτόνομη ρύθμιση) - Καθυστέρηση του φαινοτύπου παράλυσης που προκαλείται από την έκφραση του ανθρώπινου Αβ στους μυς (μη αυτόνομη ρύθμιση)

Η ιατρική πρόοδος και άλλες αναβαθμίσεις στην ποιότητα ζωής έχουν οδηγήσει σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Η επέκταση όμως του προσδόκιμου ζωής έφερε στο προσκήνιο την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών και ανάμεσά τους νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Η AD είναι από τις πιο συχνές νευροεκφυλιστικές νόσους που οδηγεί σε άνοια. Η συγκεκριμένη νόσος προσβάλλει πολύ μεγάλο αριθμό ατόμων και ο φαινότυπος της ασθένειας δεν περιορίζεται μόνο στον εγκέφαλο. Πολλές φορές επηρεάζονται και περιφερειακοί ιστοί και διάφορα μεταβολικά μονοπάτια με τρόπους που ελάχιστα κατανοούμε μέχρι στιγμής. Η αποσαφήνιση των ρυθμιστικών μηχανισμών της πρωτεόστασης μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό και στην ανάπτυξη στρατηγικών καταπολέμησης και αντιμετώπισης της ασθένειας. Τα αποτελέσματα αυτής της διδακτορικής διατριβής μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στη βελτιστοποίηση της ρύθμισης της πρωτεόστασης για την καταπολέμηση των νευροεκφυλιστικών πρωτεϊνοπαθειών μέσω

της στόχευσης συγκεκριμένων ιστών. Η διαλεύκανση όλων των πιθανών μη αυτόνομων κυτταρικών πλευρών της ρύθμισης των πρωτεοστατικών μηχανισμών είναι σημαντική όχι μόνο για να βελτιστοποιηθεί ένας ιστοειδικός χειρισμός του αλλά και για να διασφαλιστεί ότι λαμβάνονται υπόψη όλες τις αναμενόμενες παρενέργειες, θετικές ή αρνητικές. Επιπλέον, πέρα από τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, η ταυτοποίηση της μη αυτόνομης κυτταρικής ρύθμισης του πρωτεασώματος μπορεί να αποτελέσει εξίσου σημαντική γνώση σε διάφορους τομείς όπου στοχεύεται ο χειρισμός του, συμπεριλαμβανομένων των πεδίων του καρκίνου και της ελκυστικής όπου στόχος είναι η αναστολή του πρωτεασώματος και ο ιστοειδικός χειρισμός του ως θεραπευτική προσέγγιση. Συνολικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής παρέχουν νέες γνώσεις για την αποσαφήνιση του ακριβούς μηχανισμού μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η μη αυτόνομη κυτταρική ρύθμιση του πρωτεασώματος και υποδεικνύει πιθανές ιστοειδικές παρεμβάσεις έναντι πρωτεϊνοπαθειών και όχι μόνο.

Βιβλιογραφία

- Altun ZF, Herndon LA, Wolkow CA, Crocker C, Lints R & Hall DH (2024) No Title. *Handb C elegans Anatomy WormAtlas*
- Ambros V (2000) Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 10: 428–433
- Amorim JA, Coppotelli G, Rolo AP, Palmeira CM, Ross JM & Sinclair DA (2022) Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* 18: 243–258
- Anderson RT, Bradley TA & Smith DM (2022) Hyperactivation of the proteasome in *Caenorhabditis elegans* protects against proteotoxic stress and extends lifespan. *J Biol Chem* 298: 102415
- Andreadis A, Brown WM & Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31: 10626–10633
- Andux S & Ellis RE (2008) Apoptosis maintains oocyte quality in aging *Caenorhabditis elegans* females. *PLoS Genet* 4: e1000295
- Apfeld J & Kenyon C (1998) Cell nonautonomy of *C. elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and life span. *Cell*
- Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A & Kenyon C (2002) Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295: 502–505
- Avery L & Horvitz HR (1990) Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* 253: 263–270
- Avery L & Shtonda BB (2003) Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol* 206: 2441–2457
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G & Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*
- Baird L, Llères D, Swift S & Dinkova-Kostova AT (2013) Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15259–15264
- Balchin D, Hayer-Hartl M & Hartl FU (2016) In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 353: aac4354
- Barja G (2013) Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal* 19: 1420–1445
- Bennett MC, Mlady GW, Kwon YH & Rose GM (1996) Chronic in vivo sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J Neurochem* 66: 2606–2611
- Bhatt V & Tiwari AK (2023) Sirtuins, a key regulator of ageing and age-related neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci* 133: 1167–1192

- Bishop NA & Guarente L (2007) Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 447: 545–549
- Bjorksten J & Tenhu H (1990) The crosslinking theory of aging--added evidence. *Exp Gerontol* 25: 91–95
- Blackburn EH, Epel ES & Lin J (2015) Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350: 1193–1198
- Bonet-Costa V, Pomatto LC-D & Davies KJA (2016) The Proteasome and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Antioxid Redox Signal* 25: 886–901
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*
- Byerly L, Cassada RC & Russell RL (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* 51: 23–33
- Calahorra F & Izquierdo PG (2018) The presynaptic machinery at the synapse of *C. elegans*. *Invert Neurosci* 18: 4
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG & Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*
- Chakravarti D, LaBella KA & DePinho RA (2021) Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell* 184: 306–322
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW & Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802–805
- Chen C-H, Chen Y-C, Jiang H-C, Chen C-K & Pan C-L (2013) Neuronal aging: learning from *C. elegans*. *J Mol Signal* 8: 14
- Chen Q, Thorpe J, Dohmen JR, Li F & Keller JN (2006) Ump1 extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: central role for the proteasome? *Free Radic Biol Med* 40: 120–126
- Chocron SE, Munkácsy E, Harper, S. K, Karpowicz P, Jiang N, Van Skike C, DeRosa N, Banh AQ, Palavicini JP, Wityk P, *et al* (2022) Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models. *Sci Adv* 8: eabk2252
- Choi J, Ahn A, Kim S & Won CW (2015) Global Prevalence of Physical Frailty by Fried's Criteria in Community-Dwelling Elderly With National Population-Based Surveys. *J Am Med Dir Assoc* 16: 548–550
- Choi WH, de Poot SAH, Lee JH, Kim JH, Han DH, Kim YK, Finley D & Lee MJ (2016) Open-gate mutants of the mammalian proteasome show enhanced ubiquitin-conjugate degradation. *Nat Commun* 7: 10963
- Chondrogianni N, Georgila K, Kourtis N, Tavernarakis N & Gonos ES (2015a) 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*
- Chondrogianni N & Gonos ES (2004) Proteasome inhibition induces a senescence-

- like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology* 5: 55–61
- Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B & Gonos ES (2000) Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. In *Experimental Gerontology*
- Chondrogianni N, Sakellari M, Lefaki M, Papaevgeniou N & Gonos ES (2014) Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*
- Chondrogianni N, Stratford FLL, Trougakos IP, Friguet B, Rivett AJ & Gonos ES (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*
- Chondrogianni N, Tzavelas C, Pemberton AJ, Nezis IP, Rivett AJ & Gonos ES (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*
- Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, Delitsikou V, Papaevgeniou N, Sakellari M, Lefaki M, Filippopoulou K & Gonos ES (2015b) Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Res Rev* doi:10.1016/j.arr.2014.12.003
- Chow DK, Glenn CF, Johnston JL, Goldberg IG & Wolkow CA (2006) Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Exp Gerontol* 41: 252–260
- Ciechanover A (2017) Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Best Pract Res Clin Haematol* doi:10.1016/j.beha.2017.09.001
- Ciechanover A & Kwon YT (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med* 47: e147
- Ciechanover A & Stanhill A (2014) The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.007
- Clevers H & Watt FM (2018) Defining Adult Stem Cells by Function, not by Phenotype. *Annu Rev Biochem* 87: 1015–1027
- Coburn C, Allman E, Mahanti P, Benedetto A, Cabreiro F, Pincus Z, Matthijssens F, Araiz C, Mandel A, Vlachos M, *et al* (2013) Anthranilate fluorescence marks a calcium-propagated necrotic wave that promotes organismal death in *C. elegans*. *PLoS Biol* 11: e1001613
- Cochemé HM & Murphy MP (2008) Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem* 283: 1786–1798
- Collins JJ, Huang C, Hughes S & Kornfeld K (2008) The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*: 1–21
- Cook SJ, Jarrell TA, Brittin CA, Wang Y, Bloniarz AE, Yakovlev MA, Nguyen KCQ, Tang LT-H, Bayer EA, Duerr JS, *et al* (2019) Whole-animal connectomes of

- both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* 571: 63–71
- Cui H, Kong Y & Zhang H (2012) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* 2012: 646354
- David DC, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL & Kenyon C (2010) Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol* 8: e1000450
- Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N & Erceg P (2010) Old age as a privilege of the ‘selfish ones’. *Aging Dis* 1: 139–146
- Davies KJA (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. In *Biochimie*
- Davy A, Bello P, Thierry-Mieg N, Vaglio P, Hitti J, Doucette-Stamm L, Thierry-Mieg D, Reboul J, Boulton S, Walhout AJ, *et al* (2001) A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *EMBO Rep* 2: 821–828
- Dayalan Naidu S & Dinkova-Kostova AT (2017) Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J*
- Dikic I (2017) Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*
- Dong X, Liu OW, Howell AS & Shen K (2013) An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis. *Cell* 155: 296–307
- Durieux J, Wolff S & Dillin A (2011) The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*
- Dwivedi V, Yaniv K & Sharon M (2021) Beyond cells: The extracellular circulating 20S proteasomes. *Biochim Biophys Acta Mol basis Dis* 1867: 166041
- Erales J & Coffino P (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim Biophys Acta* 1843: 216–221
- Ferrucci L & Fabbri E (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 15: 505–522
- Förster A, Whitby FG & Hill CP (2003) The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J* 22: 4356–4364
- Frakes AE, Metcalf MG, Tronnes SU, Bar-Ziv R, Durieux J, Gildea HK, Kandahari N, Monshietehadi S & Dillin A (2020) Four glial cells regulate ER stress resistance and longevity via neuropeptide signaling in *C. elegans*. *Science* 367: 436–440
- Fransen F, van Beek AA, Borghuis T, Aidy S El, Hugenholtz F, van der Gaast-de Jongh C, Savelkoul HFJ, De Jonge MI, Boekschoten M V, Smidt H, *et al* (2017) Aged Gut Microbiota Contributes to Systemic Inflammation after Transfer to Germ-Free Mice. *Front Immunol* 8: 1385
- Friedman DB & Johnson TE (1988) A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118: 75–86
- Fulop T, Witkowski JM, Pawelec G, Alan C & Larbi A (2014) On the immunological theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol* 39: 163–176

- Furukawa M & Xiong Y (2005) BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol* 25: 162–171
- Gaczynska M, Goldberg AL, Tanaka K, Hendil KB & Rock KL (1996) Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* 271: 17275–17280
- Gadhav K, Bolshette N, Ahire A, Pardeshi R, Thakur K, Trandafir C, Istrate A, Ahmed S, Lahkar M, Muresanu DF, *et al* (2016) The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 20: 1392–1407
- Garigan D, Hsu A-L, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J & Kenyon C (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161: 1101–1112
- Gerstbrein B, Stamatas G, Kollias N & Driscoll M (2005) In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4: 127–137
- Glutzer M, Murray AW & Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132–138
- Goedert M, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ & Hill F (1996) PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 109 (Pt 1: 2661–2672
- Golden TR, Beckman KB, Lee AHJ, Dudek N, Hubbard A, Samper E & Melov S (2007) Dramatic age-related changes in nuclear and genome copy number in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6: 179–188
- Golden TR, Hubbard A, Dando C, Herren MA & Melov S (2008) Age-related behaviors have distinct transcriptional profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7: 850–865
- Goldsmith TC (2012) On the programmed/non-programmed aging controversy. *Biochemistry (Mosc)* 77: 729–732
- Goldsmith TC (2014) Modern evolutionary mechanics theories and resolving the programmed/non-programmed aging controversy. *Biochemistry (Mosc)* 79: 1049–1055
- Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, *et al* (2019) Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179: 813–827
- Greider CW & Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405–413
- Griffin EF, Caldwell KA & Caldwell GA (2017) Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Neurosci* doi:10.1021/acscchemneuro.7b00361
- Gu ZC & Enenkel C (2014) Proteasome assembly. *Cell Mol Life Sci* 71: 4729–4745

- Guglielmotto M, Monteleone D, Vasciaveo V, Repetto IE, Manassero G, Tabaton M & Tamagno E (2017) The Decrease of Uch-L1 Activity Is a Common Mechanism Responsible for A β 42 Accumulation in Alzheimer's and Vascular Disease. *Front Aging Neurosci* 9: 320
- Guo X, Huang X & Chen MJ (2017) Reversible phosphorylation of the 26S proteasome. *Protein Cell* 8: 255–272
- Hahm J-H, Kim S, DiLoreto R, Shi C, Lee S-J V, Murphy CT & Nam HG (2015) C. elegans maximum velocity correlates with healthspan and is maintained in worms with an insulin receptor mutation. *Nat Commun* 6: 8919
- Haithcock E, Dayani Y, Neufeld E, Zahand AJ, Feinstein N, Mattout A, Gruenbaum Y & Liu J (2005) Age-related changes of nuclear architecture in Caenorhabditis elegans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16690–16695
- Hamilton WD (1966) The moulding of senescence by natural selection. *J Theor Biol* 12: 12–45
- Harding HP, Novoa I, Bertolotti A, Zeng H, Zhang Y, Urano F, Jousse C & Ron D (2001) Translational regulation in the cellular response to biosynthetic load on the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 499–508
- Hardy J & Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–356
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–579
- Hassan WM, Merin DA, Fonte V & Link CD (2009) AIP-1 ameliorates beta-amyloid peptide toxicity in a Caenorhabditis elegans Alzheimer's disease model. *Hum Mol Genet* 18: 2739–2747
- He H-Y, Ahsan A, Bera R, McLain N, Faulkner R, Ramachandran K V, Margolis SS & Cline HT (2023) Neuronal membrane proteasomes regulate neuronal circuit activity in vivo and are required for learning-induced behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120: e2216537120
- van Heemst D (2010) Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging Dis* 1: 147–157
- Hendil KB, Khan S & Tanaka K (1998) Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* 332 (Pt 3): 749–754
- Herndon LA, Wolkow CA, Driscoll M & Hall DH (2017) Effects of Ageing on the Basic Biology and Anatomy of C. elegans. In *Ageing: Lessons from C. elegans*, Olsen A & Gill MS (eds) pp 9–39. Cham: Springer International Publishing
- Higuchi-Sanabria R, Durieux J, Kelet N, Homentcovschi S, de Los Rios Rogers M, Monshietehadi S, Garcia G, Dallarda S, Daniele JR, Ramachandran V, *et al* (2020) Divergent Nodes of Non-autonomous UPR(ER) Signaling through Serotonergic and Dopaminergic Neurons. *Cell Rep* 33: 108489
- Hipp MS, Kasturi P & Hartl FU (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* doi:10.1038/s41580-019-0101-y
- Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, Natsume T,

- Tanaka K & Murata S (2005) A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437: 1381–1385
- Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, Kato K, Tanaka K & Murata S (2008) Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J* 27: 2204–2213
- Hirata T, Arai Y, Yuasa S, Abe Y, Takayama M, Sasaki T, Kunitomi A, Inagaki H, Endo M, Morinaga J, *et al* (2020) Associations of cardiovascular biomarkers and plasma albumin with exceptional survival to the highest ages. *Nat Commun* 11: 3820
- Hobert O (2013) The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*: 1–106
- Hodge F, Bajuszova V & van Oosten-Hawle P (2022) The Intestine as a Lifespan- and Proteostasis-Promoting Signaling Tissue. *Front aging* 3: 897741
- Houtkooper RH, Williams RW & Auwerx J (2010) Metabolic networks of longevity. *Cell* 142: 9–14
- Hsu A-L, Feng Z, Hsieh M-Y & Xu XZS (2009) Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. *Neurobiol Aging* 30: 1498–1503
- Huang C, Xiong C & Kornfeld K (2004) Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8084–8089
- Hubbard EJA & Greenstein D (2005) Introduction to the germ line. *WormBook*: 1–4
- Hughes SE, Evason K, Xiong C & Kornfeld K (2007) Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. *PLoS Genet* 3: e25
- Imanikia S, Özbey NP, Krueger C, Casanueva MO & Taylor RC (2019) Neuronal XBP-1 Activates Intestinal Lysosomes to Improve Proteostasis in *C. elegans*. *Curr Biol* 29: 2322–2338.e7
- Jang J, Wang Y, Kim HS, Lalli MA & Kosik KS (2014) Nrf2, a regulator of the proteasome, controls self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*
- Jin K (2010) Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis* 1: 72–74
- Jusic A, Thomas PB, Wettinger SB, Dogan S, Farrugia R, Gaetano C, Tuna BG, Pinet F, Robinson EL, Tual-Chalot S, *et al* (2022) Noncoding RNAs in age-related cardiovascular diseases. *Ageing Res Rev* 77: 101610
- Kaneko M, Okuma Y & Nomura Y (2012) Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Possible Involvement of HRD1, a Novel Molecule Related to Endoplasmic Reticulum Stress, in Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Sci*
- Kapeta S, Chondrogianni N & Gonos ES (2010) Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*
- Kaushik S & Cuervo AM (2012) Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006

- Keck S, Nitsch R, Grune T & Ullrich O (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*
- Keller JN, Hanni KB & Markesbery WR (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75: 436–439
- Kelmer Sacramento E, Kirkpatrick JM, Mazzetto M, Baumgart M, Bartolome A, Di Sanzo S, Caterino C, Sanguanini M, Papaevgeniou N, Lefaki M, *et al* (2020) Reduced proteasome activity in the aging brain results in ribosome stoichiometry loss and aggregation. *Mol Syst Biol* 16: e9596
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A & Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–464
- Khandia R, Dadar M, Munjal A, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Yattoo MI, Iqbal HMN, Singh KP, Joshi SK, *et al* (2019) A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells*
- Kim H-M & Colaiácovo MP (2019) CRISPR-Cas9-Guided Genome Engineering in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Protoc Mol Biol* 129: e106
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*
- Kirkwood TB (1977) Evolution of ageing. *Nature* 270: 301–304
- Kirkwood TB & Cremer T (1982) Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Hum Genet* 60: 101–121
- Klass MR (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev* 6: 413–429
- Klass MR (1983) A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech Ageing Dev* 22: 279–286
- Kulak NA, Geyer PE & Mann M (2017) Loss-less Nano-fractionator for High Sensitivity, High Coverage Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 16: 694–705
- Kwak M-K, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M & Kensler TW (2003) Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*
- Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, Gartner C, Dimova N, Hanna J, Gygi SP, *et al* (2010a) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*
- Lee C, Kim H & Bardwell JCA (2018) Electrostatic interactions are important for chaperone-client interaction in vivo. *Microbiology* 164: 992–997
- Lee S-H, Park Y, Yoon SK & Yoon J-B (2010b) Osmotic stress inhibits proteasome by p38 MAPK-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 285: 41280–41289
- van Leeuwen FW, van Tijn P, Sonnemans MAF, Hobo B, Mann DMA, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S, Cras P, Leuba G, Savioz A, *et al* (2006) Frameshift proteins in autosomal dominant forms of Alzheimer disease and other

- tauopathies. *Neurology* 66: S86-92
- Levine B & Kroemer G (2019) Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 176: 11–42
- Levitan D & Greenwald I (1995) Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377: 351–354
- Lewis JA & Fleming JT (1995) Basic culture methods. *Methods Cell Biol* 48: 3–29
- Link CD (1995) Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9368–9372
- Link CD, Taft A, Kapulkin V, Duke K, Kim S, Fei Q, Wood DE & Sahagan BG (2003) Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging* 24: 397–413
- Liu B, Qu J, Zhang W, Izpisua Belmonte JC & Liu G-H (2022) A stem cell aging framework, from mechanisms to interventions. *Cell Rep* 41: 111451
- Liu G, Rogers J, Murphy CT & Rongo C (2011) EGF signalling activates the ubiquitin proteasome system to modulate *C. elegans* lifespan. *EMBO J* 30: 2990–3003
- Lokireddy S, Kukushkin NV & Goldberg AL (2015) cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E7176-85
- Lonskaya I, Desforgues NM, Hebron ML & Moussa CE-H (2013) Ubiquitination increases parkin activity to promote autophagic α -synuclein clearance. *PLoS One* 8: e83914
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M & Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell*
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M & Kroemer G (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186: 243–278
- López-Otín C & Kroemer G (2021) Hallmarks of Health. *Cell* 184: 33–63
- Lu Y-X, Regan JC, Eßer J, Drews LF, Weinseis T, Stinn J, Hahn O, Miller RA, Grönke S & Partridge L (2021) A TORC1-histone axis regulates chromatin organisation and non-canonical induction of autophagy to ameliorate ageing. *Elife* 10
- Madison JM, Nurrish S & Kaplan JM (2005) UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. *Curr Biol*
- Magi S, Piccirillo S, Amoroso S & Lariccia V (2019) Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. *Int J Mol Sci* 20
- Mannhaupt G, Schnall R, Karpov V, Vetter I & Feldmann H (1999) Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett*
- Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, Chen W, Aebersold R & Bähler J (2012) Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in

- proliferating and quiescent cells. *Cell* 151: 671–683
- Martínez G, Duran-Aniotz C, Cabral-Miranda F, Vivar JP & Hetz C (2017) Endoplasmic reticulum proteostasis impairment in aging. *Aging Cell* 16: 615–623
- Matilainen O, Jha S & Holmberg CI (2016) Fluorescent Tools for In Vivo Studies on the Ubiquitin-Proteasome System. *Methods Mol Biol* 1449: 215–222
- Matsumaru D & Motohashi H (2021) The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10
- Matsunami K (2018) Frailty and *Caenorhabditis elegans* as a Benchtop Animal Model for Screening Drugs Including Natural Herbs. *Front Nutr* 5: 111
- Mccoll G, Roberts BR, Pukala TL, Kenche VB, Roberts CM, Link CD, Ryan TM, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI, *et al* (2012) Utility of an improved model of amyloid-beta (A β 1-42) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*
- McGee MD, Weber D, Day N, Vitelli C, Crippen D, Herndon LA, Hall DH & Melov S (2011) Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*. *Aging Cell* 10: 699–710
- Medawar P. (1953) UNSOLVED problem of biology. *Med J Aust* 1: 854–855
- Medkour Y, Svistkova V & Titorenko VI (2016) Chapter Six - Cell-Nonautonomous Mechanisms Underlying Cellular and Organismal Aging. In, Jeon KW (ed) pp 259–297. Academic Press
- Mello C & Fire A (1995) Chapter 19 DNA Transformation. In *Cuenorhubditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*, Epstein HF & Shakes DC (eds) pp 451–482. Academic Press
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D & Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10: 3959–3970
- Metcalf MG, Monshietehadi S, Sahay A, Durieux J, Frakes AE, Velichkovska M, Mena C, Farinas A, Sanchez M & Dillin A (2024) Cell non-autonomous control of autophagy and metabolism by glial cells. *iScience* 27: 109354
- Miles J, Townend S, Milonaitytė D, Smith W, Hodge F, Westhead DR & van Oosten-Hawle P (2023) Transcellular chaperone signaling is an intercellular stress-response distinct from the HSF-1-mediated heat shock response. *PLoS Biol* 21: e3001605
- Miller HA, Dean ES, Pletcher SD & Leiser SF (2020) Cell non-autonomous regulation of health and longevity. *Elife* 9: e62659
- Minnerly J, Zhang J, Parker T, Kaul T & Jia K (2017) The cell non-autonomous function of ATG-18 is essential for neuroendocrine regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan. *PLoS Genet*
- Moerman DG & Fire A (1997) Muscle: Structure, function and development. In *C. elegans II.*, Riddle D Blumenthal T & Meyer B (eds) pp 417–470. NY: Cold

Spring Harbor Laboratory Press

- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* doi:10.1101/gad.12.24.3788
- Morimoto RI (2020) Cell-nonautonomous regulation of proteostasis in aging and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*
- Moskalev A, Guvatova Z, Shaposhnikov M, Lashmanova E, Proshkina E, Koval L, Zhavoronkov A, Krasnov G & Kudryavtseva A (2019) The neuronal overexpression of Gclcin *Drosophila melanogaster* induces life extension with longevity-associated transcriptomic changes in the thorax. *Front Genet*
- Munkácsy E, Chocron ES, Quintanilla L, Gendron CM, Pletcher SD & Pickering AM (2019) Neuronal-specific proteasome augmentation via Pros β 5 overexpression extends lifespan and reduces age-related cognitive decline. *Aging Cell*
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K & Ichihara A (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360: 597–599
- Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S-I, Hayashi H, Takahama Y & Tanaka K (2007) Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316: 1349–1353
- Murata S, Takahama Y, Kasahara M & Tanaka K (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nat Immunol* 19: 923–931
- Nguyen NN, Rana A, Goldman C, Moore R, Tai J, Hong Y, Shen J, Walker DW & Hur JH (2019) Proteasome β 5 subunit overexpression improves proteostasis during aging and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep*
- Nguyen T, Yang CS & Pickett CB (2004) The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.033 [PREPRINT]
- Njomen E & Tepe JJ (2019) Proteasome Activation as a New Therapeutic Approach To Target Proteotoxic Disorders. *J Med Chem* 62: 6469–6481
- O'Brien D, Jones LM, Good S, Miles J, Vijayabaskar MS, Aston R, Smith CE, Westhead DR & van Oosten-Hawle P (2018) A PQM-1-Mediated Response Triggers Transcellular Chaperone Signaling and Regulates Organismal Proteostasis. *Cell Rep* 23: 3905–3919
- Van Oosten-Hawle P, Porter RS & Morimoto RI (2013) Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *Cell*
- Page A & Johnstone I (2007) The cuticle. *Wormb Online Rev C elegans Biol*
- Pan C-L, Peng C-Y, Chen C-H & McIntire S (2011) Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9274–9279
- Panagiotidou E & Chondrogianni N (2020) We Are What We Eat: Ubiquitin-

Proteasome System (UPS) Modulation Through Dietary Products. *Adv Exp Med Biol*

- Pellegrino MW, Nargund AM & Haynes CM (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.019 [PREPRINT]
- Perry G, Friedman R, Shaw G & Chau V (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3033–3036
- Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, Ermak G, Grune T & Davies KJA (2010) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J* 432: 585–594
- Pickett CL, Dietrich N, Chen J, Xiong C & Kornfeld K (2013) Mated progeny production is a biomarker of aging in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* 3: 2219–2232
- Pincus Z, Mazer TC & Slack FJ (2016) Autofluorescence as a measure of senescence in *C. elegans*: look to red, not blue or green. *Aging (Albany NY)* 8: 889–898
- Pir GJ, Choudhary B & Mandelkow E (2017) *Caenorhabditis elegans* models of tauopathy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 31: 5137–5148
- Podshivalova K, Kerr RA & Kenyon C (2017) How a Mutation that Slows Aging Can Also Disproportionately Extend End-of-Life Decrepitude. *Cell Rep* 19: 441–450
- Ramachandran K V & Margolis SS (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nat Struct Mol Biol* 24: 419–430
- Read A & Schröder M (2021) The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)* 10
- Rechsteiner M & Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15: 27–33
- Reis-Rodrigues P, Czerwieniec G, Peters TW, Evani US, Alavez S, Gaman EA, Vantipalli M, Mooney SD, Gibson BW, Lithgow GJ, *et al* (2012) Proteomic analysis of age-dependent changes in protein solubility identifies genes that modulate lifespan. *Aging Cell* 11: 120–127
- Ribeiro FC, Cozachenko D, Heimfarth L, Fortuna JTS, de Freitas GB, de Sousa JM, Alves-Leon S V, Leite REP, Suemoto CK, Grinberg LT, *et al* (2023) Synaptic proteasome is inhibited in Alzheimer's disease models and associates with memory impairment in mice. *Commun Biol* 6: 1127
- Rodriguez KA, Edrey YH, Osmulski P, Gaczynska M & Buffenstein R (2012) Altered composition of liver proteasome assemblies contributes to enhanced proteasome activity in the exceptionally long-lived naked mole-rat. *PLoS One* 7: e35890
- Ron D & Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* doi:10.1038/nrm2199 [PREPRINT]

- Sadre-Bazzaz K, Whitby FG, Robinson H, Formosa T & Hill CP (2010) Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Mol Cell* 37: 728–735
- Sahu I, Mali SM, Sulkshane P, Xu C, Rozenberg A, Morag R, Sahoo MP, Singh SK, Ding Z, Wang Y, *et al* (2021) The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nat Commun* 12: 6173
- Savulescu AF & Glickman MH (2011) Proteasome activator 200: the heat is on.. *Mol Cell Proteomics* 10: R110.006890
- Schierenberg E, Miwa J & von Ehrenstein G (1980) Cell lineages and developmental defects of temperature-sensitive embryonic arrest mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 76: 141–159
- Schmidt M & Finley D (2014) Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1843: 13–25
- Schmidt RM, Schessner JP, Borner GH & Schuck S (2019) The proteasome biogenesis regulator Rpn4 cooperates with the unfolded protein response to promote ER stress resistance. *Elife* 8
- Schnell HM, Walsh RMJ, Rawson S, Kaur M, Bhanu MK, Tian G, Prado MA, Guerra-Moreno A, Paulo JA, Gygi SP, *et al* (2021) Structures of chaperone-associated assembly intermediates reveal coordinated mechanisms of proteasome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 28: 418–425
- Selarka K & Shrivastava B V (2024) Illuminating intercellular autophagy: A comprehensive review of cell non-autonomous autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 716: 150024
- Shao L-W, Niu R & Liu Y (2016) Neuropeptide signals cell non-autonomous mitochondrial unfolded protein response. *Cell Res* 26: 1182–1196
- Shen HM & Mizushima N (2014) At the end of the autophagic road: An emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem Sci* doi:10.1016/j.tibs.2013.12.001 [PREPRINT]
- Shim HS, Horner JW, Wu C-J, Li J, Lan ZD, Jiang S, Xu X, Hsu W-H, Zal T, Flores II, *et al* (2021) Telomerase Reverse Transcriptase Preserves Neuron Survival and Cognition in Alzheimer's Disease Models. *Nat aging* 1: 1162–1174
- Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR & Finley KD (2008) Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy*
- Singh PP, Demmitt BA, Nath RD & Brunet A (2019) The Genetics of Aging: A Vertebrate Perspective. *Cell* 177: 200–220
- Singson A (2001) Every Sperm Is Sacred: Fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 230: 101–109
- Sladowska M, Turek M, Kim M-J, Drabikowski K, Mussulini BHM, Mohanraj K, Serwa RA, Topf U & Chacinska A (2021) Proteasome activity contributes to pro-survival response upon mild mitochondrial stress in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 19: e3001302

- Son HG, Seo M, Ham S, Hwang W, Lee D, An SWA, Artan M, Seo K, Kaletsky R, Arey RN, *et al* (2017) RNA surveillance via nonsense-mediated mRNA decay is crucial for longevity in *daf-2/insulin/IGF-1* mutant *C. elegans*. *Nat Commun* 8: 14749
- Speese S, Petrie M, Schuske K, Ailion M, Ann K, Iwasaki K, Jorgensen EM & Martin TFJ (2007) UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*
- Stadtmueller BM & Hill CP (2011) Proteasome activators. *Mol Cell* 41: 8–19
- Sulston JE & Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56: 110–156
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG & Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100: 64–119
- Swier PB & Sharma R (2021) ATP-dependent chromatin remodelers in ageing and age-related disorders. *Biogerontology* 22: 1–17
- Tanaka K, Yoshimura T, Kumatori A, Ichihara A, Ikai A, Nishigai M, Kameyama K & Takagi T (1988) Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 263: 16209–16217
- Tavernarakis N (2019) Moderation of neural excitation promotes longevity. *Nature* 574: 338–340 doi:10.1038/d41586-019-02958-x [PREPRINT]
- Taylor RC, Berendzen KM & Dillin A (2014) Systemic stress signalling: understanding the cell non-autonomous control of proteostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 211–217
- Taylor RC & Dillin A (2013) XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell* 153: 1435–1447
- Tiku V, Jain C, Raz Y, Nakamura S, Heestand B, Liu W, Späth M, Suchiman HED, Müller R-U, Slagboom PE, *et al* (2017) Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat Commun* 8: 16083
- Timmons L, Court DL & Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103–112
- Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Baba T, Iwasaki S, *et al* (2009) Exclusive expression of proteasome subunit {beta}5t in the human thymic cortex. *Blood* 113: 5186–5191
- 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
- Tomko RJJ & Hochstrasser M (2013) Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem* 82: 415–445
- Toth ML, Melentijevic I, Shah L, Bhatia A, Lu K, Talwar A, Naji H, Ibanez-Ventoso C, Ghose P, Jevince A, *et al* (2012) Neurite sprouting and synapse deterioration

- in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32: 8778–8790
- Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, Matlack KES, Chung CY, Baru V, Shulman JM, Parrado A, Bevis BJ, Valastyan JS, *et al* (2011) Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* 334: 1241–1245
- Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M & LaFerla FM (2008) Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging* 29: 1607–1618
- Ustrell V, Hoffman L, Pratt G & Rechsteiner M (2002) PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J* 21: 3516–3525
- Vatner SF, Zhang J, Oydanich M, Berkman T, Naftalovich R & Vatner DE (2020) Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress. *Ageing Res Rev* 64: 101194
- Vernace VA, Arnaud L, Schmidt-Glenewinkel T & Figueiredo-Pereira ME (2007) Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 21: 2672–2682
- Vilchez D, Morante I, Liu Z, Douglas PM, Merkwirth C, Rodrigues APC, Manning G & Dillin A (2012) RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature*
- Vilchez D, Saez I & Dillin A (2014) The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* doi:10.1038/ncomms6659 [PREPRINT]
- Vu T-M, Hervé V, Ulfat AK, Lamontagne-Kam D & Brouillette J (2023) Impact of non-neuronal cells in Alzheimer's disease from a single-nucleus profiling perspective. *Front Cell Neurosci* 17: 1208122
- Walther DM, Kasturi P, Zheng M, Pinkert S, Vecchi G, Ciryam P, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M, Mann M, *et al* (2015) Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging *C. elegans*. *Cell* 161: 919–932
- Wang J & Maldonado MA (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 3: 255–261
- Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ & Prywes R (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* 275: 27013–27020
- Ward S, Thomson N, White JG & Brenner S (1975) Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 160: 313–337
- White JG, Southgate E, Thomson JN & Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci* 314: 1–340
- Whittemore K, Vera E, Martínez-Nevado E, Sanpera C & Blasco MA (2019) Telomere shortening rate predicts species life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- Williams GC (2001) Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Sci Aging Knowl Environ* 2001: cp13–cp13
- Witt E, Zantopf D, Schmidt M, Kraft R, Kloetzel PM & Krüger E (2000) Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* 301: 1–9
- Wolkow CA, Kimura KD, Lee MS & Ruvkun G (2000) Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* (80-)
- Xing Y, Jameson SC & Hogquist KA (2013) Thymoproteasome subunit-β5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 6979–6984
- Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N & Forrester J V (2008) Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 7: 58–68
- Xu P, Wang M, Song W-M, Wang Q, Yuan G-C, Sudmant PH, Zare H, Tu Z, Orr ME & Zhang B (2022) The landscape of human tissue and cell type specific expression and co-regulation of senescence genes. *Mol Neurodegener* 17: 5
- Yasuda K, Ishii T, Suda H, Akatsuka A, Hartman PS, Goto S, Miyazawa M & Ishii N (2006) Age-related changes of mitochondrial structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 127: 763–770
- Yi B, Sahn JJ, Ardestani PM, Evans AK, Scott LL, Chan JZ, Iyer S, Crisp A, Zuniga G, Pierce JT, *et al* (2017) Small molecule modulator of sigma 2 receptor is neuroprotective and reduces cognitive deficits and neuroinflammation in experimental models of Alzheimer’s disease. *J Neurochem* 140: 561–575
- Zhang L, Pitcher LE, Yousefzadeh MJ, Niedernhofer LJ, Robbins PD & Zhu Y (2022) Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases. *J Clin Invest* 132
- Zhou Y & Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm* 121: 799–817
- Zhu H & Cohen E (2023) Regulation of the proteostasis network by the neuronal system. *Front Mol Biosci* 10: 1290118
- Zmora N, Soffer E & Elinav E (2019) Transforming medicine with the microbiome. *Sci Transl Med* 11
- Zullo JM, Drake D, Aron L, O’Hern P, Dhamne SC, Davidsohn N, Mao C-A, Klein WH, Rotenberg A, Bennett DA, *et al* (2019) Regulation of lifespan by neural excitation and REST. *Nature* 574: 359–364

Παράρτημα

Δημοσιεύσεις

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό REDOX BIOLOGY με τίτλο «Neuron-specific proteasome activation exerts cell non-autonomous protection against amyloid-beta (A β) proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*» (doi: [10.1016/j.redox.2023.102817](https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102817)).

Παράλληλα, από τη μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας προέκυψαν ένα άρθρο ανασκόπησης στο περιοδικό Advances in Experimental Medicine and Biology με τίτλο «We Are What We Eat: Ubiquitin-Proteasome System (UPS) Modulation Through Dietary Products» (doi: [10.1007/978-3-030-38266-7_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38266-7_15)) και ένα κεφάλαιο στο βιβλίο Modulation of Oxidative Stress: Biochemical, Physiological and Pharmacological Aspects με τίτλο «Antioxidants as modulators of the ubiquitin–proteasome system against aging and proteinopathies» (doi: [0.1016/B978-0-443-19247-0.00007-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19247-0.00007-2)).

Συνέδρια

Μέρος των αποτελεσμάτων παρουσιάστηκε στο 72ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (EEBMB) 2022 με τίτλο «Cell non-autonomous proteasome regulation attenuates proteotoxicity in distal tissues in *C. elegans*» (προφορική ανακοίνωση) και στο SFRR-E Summer School FEBS Advanced Lecture Course 2022 με τίτλο «Tissue-specific proteasome activation affects proteotoxic effects in distal tissues» (προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση).

Υποτροφίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδασκτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας: 1540).



Neuron-specific proteasome activation exerts cell non-autonomous protection against amyloid-beta ($A\beta$) proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*

Eleni Panagiotidou^{a,b,1}, Anna Gioran^{a,1}, Daniele Bano^c, Niki Chondrogianni^{a,*}

^a Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, 11635, Athens, Greece

^b Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 41334, Larissa, Greece

^c German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 53127, Bonn, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

C. elegans

Cell non-autonomous regulation

Proteasome

Proteinopathies

Proteostasis

ABSTRACT

Proteostasis reinforcement is a promising approach in the design of therapeutic interventions against proteinopathies, including Alzheimer's disease. Understanding how and which parts of the proteostasis network should be enhanced is crucial in developing efficient therapeutic strategies. The ability of specific tissues to induce proteostatic responses in distal ones (cell non-autonomous regulation of proteostasis) is attracting interest. Although the proteasome is a major protein degradation node, nothing is known on its cell non-autonomous regulation. We show that proteasome activation in the nervous system can enhance the proteasome activity in the muscle of *Caenorhabditis elegans*. Mechanistically, this communication depends on Small Clear Vesicles, with glutamate as one of the neurotransmitters required for the distal regulation. More importantly, we demonstrate that this cell non-autonomous proteasome activation is translated into efficient prevention of amyloid-beta ($A\beta$)-mediated proteotoxic effects in the muscle of *C. elegans* but notably not to resistance against oxidative stress. Our *in vivo* data establish a mechanistic link between neuronal proteasome reinforcement and decreased $A\beta$ proteotoxicity in the muscle. The identified distal communication may have serious implications in the design of therapeutic strategies based on tissue-specific proteasome manipulation.

1. Introduction

Organisms are exposed to various stresses throughout their whole lifespan. To preserve their protein homeostasis (proteostasis) and therefore ensure the integrity of the proteome, cells have developed a complex proteostasis network regulating protein synthesis, folding and protein degradation through either the ubiquitin-proteasome system (UPS) or the autophagy lysosomal pathway (ALP). There are also surveillance stress response pathways that detect and respond to protein damage; the heat shock response (HSR) and the unfolded protein response in mitochondria (UPR^{mit}) and endoplasmic reticulum (UPR^{ER}). The proteostasis mechanisms have been shown to become deregulated during ageing and age-related diseases, including proteinopathies [1]. Given this failure of proteostasis along with the fact that ageing is the major risk factor for neurodegenerative diseases, it is reasonable to assume that the induction of proteostatic mechanisms and the elucidation

of the involved pathways are central to design preventive/therapeutic strategies against both ageing and neurodegenerative diseases [2].

The proteasome is one of the major molecular regulators of cellular proteostasis and one of the main secondary antioxidant mechanisms subjected to tight redox control [3]. It is responsible for the rapid degradation of misfolded and damaged proteins but also the proteolysis of normal cellular proteins [4]. The 26S/30S proteasome consists of two different sub-complexes, the 20S core and the 19S regulatory particle. The 20S complex can be capped by one (26S) or two (30S) 19S regulatory particle(s). The 20S particle is composed of 28 subunits (14 α -type and 14 β -type) and exerts its proteolytic activities through the β 1, β 2 and β 5 subunits that host the caspase-like, trypsin-like, and chymotrypsin-like activities, respectively [5]. There is increasing interest in the upregulation of proteasome function through various means, including the direct stereochemical alterations of the 20S core that might lead to enhanced activity levels due to the opening of the α -gated channel of the core, the activity-modifying phosphorylation of

* Corresponding author. Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Avenue, Athens, 11635, Greece.

E-mail addresses: epanagiotidou@eie.gr (E. Panagiotidou), agioran@eie.gr (A. Gioran), Daniele.Bano@dzne.de (D. Bano), nikichon@eie.gr (N. Chondrogianni).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102817>

Received 19 June 2023; Received in revised form 11 July 2023; Accepted 11 July 2023

Available online 13 July 2023

2213-2317/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
ALP	autophagy lysosomal pathway
APP	Amyloid precursor protein
A β	amyloid-beta
A β ₁₋₄₂	amyloid-beta amino acids 1 to 42
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DCVs	dense core vesicles
dFP	dual fluorescent protein
DMSO	dimethyl sulfoxide
GABA	γ -aminobutyric acid
HSR	heat shock response
mFP	monomeric fluorescent protein
OE	overexpression
RNAi	RNA interference
SCVs	small clear vesicles
UPR ^{ER}	unfolded protein response related to the endoplasmic reticulum
UPR ^{mit}	unfolded protein response related to mitochondria
UPS	ubiquitin-proteasome system
wt	wild type

the proteasome itself or the enhanced expression of proteasome subunits; the translational ramifications for proteinopathies are obvious [6, 7]. We and others have previously shown that overexpression of 20S [β 5 subunit and its orthologs/homologs in the nematode *C. elegans* (*pbs-5*), *Drosophila* (*Prosβ5*) and mice (PSMB5)], or 19S [PSMD11 subunit and its homolog in the nematode (*rpn-6*)] subunits is sufficient to enhance proteasome activity in human cells, *C. elegans*, *Drosophila* and mice and to positively modulate ageing progression and protect against proteotoxicity in A β -, amyloid precursor protein (APP)- or polyglutamine-expressing animal models [8–12].

The cell autonomous regulation of various key proteostasis players is increasingly revealed but there are still many molecular processes that need to be elucidated. Notably, the cell non-autonomous regulation of a few, but importantly not all, key players has also emerged the past few years, further pinpointing the need to understand how tissues can exchange signals, thus affecting phenomenically distal tissues and impacting on organismal physiology. In this regard, *C. elegans* has played a central role in the investigation of the proteostatic cell non-autonomous responses *in vivo*. More specifically, regulation of the cellular heat shock response of somatic cells in *C. elegans* is regulated in a cell non-autonomous manner by thermosensory neurons [13]. Mitochondrial deficiency in neurons activates the UPR^{mit} in the intestine of *C. elegans* [14,15]. Likewise, germline proteostasis affects mitochondrial function and protein aggregation across multiple tissues via the UPR^{mit} and long-range Wnt signaling pathway [16], while binding of an aggregation-prone protein expressed in the neurons of *C. elegans* to the mitochondria elicits a global induction of UPR^{mit}, affecting whole-animal physiology [17]. This inter-tissue communication also extends to the UPR^{ER}; overexpression of a UPR^{ER}-related protein in the nervous system of *C. elegans* leads to the activation of UPR^{ER} in non-neuronal tissues of the animal [18,19]. Neuronal and intestinal overexpression of the autophagy-related gene *atg-18* in *C. elegans* leads to lifespan extension in a cell non-autonomous manner [20], while a microRNA produced and secreted by the intestine can regulate the autophagy levels in the body wall muscle of the animal [21]. Cell non-autonomous proteostasis regulation has been also reported in *Drosophila*. Neuron-specific upregulation of AMPK (AMP-activated protein kinase) can elevate autophagy in the intestine of the flies [22]. Similarly, neuronal overexpression of *Gclc* (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) increases longevity in *Drosophila* and causes

longevity-associated gene transcription changes in the thorax [23]. Despite the highly important role of the proteasome, it is noteworthy that no reports exist so far on its potential cell non-autonomous regulation and the potential downstream effects on animal physiology.

With the knowledge that proteasome activity can be pharmacologically modulated and, therefore, may be exploited for novel therapeutic approaches, we sought to unravel the potential cell-non autonomous regulation of the proteasome and the downstream effects on proteotoxicity in a distal tissue. To this end, we generated transgenic nematodes overexpressing the *pbs-5* proteasome subunit in the nervous system and examined its effects in the muscle tissue of the animal. Our results reveal that *pbs-5* overexpression in the nervous system is sufficient to cell non-autonomously increase the proteasome activity and function in the muscle. We also provide evidence that this interconnection occurs via a specific type of synaptic vesicles, the small clear vesicles (SCVs). Furthermore, we identify glutamate as at least one of the responsible neurotransmitters and we reveal that the dense core vesicles (DCVs), a different type of synaptic vesicles, are also involved in the proteasome-regulating signal transmission. Together, our *in vivo* findings may significantly contribute to shaping our current perception of how the proteasome should be manipulated in therapeutic strategies targeting proteinopathies.

2. Materials and Methods

2.1. *C. elegans* strains and culture

All strains were grown and maintained at 20°C, unless otherwise specified, using standard techniques for maintenance [24] and RNAi experiments [25]. The following *C. elegans* strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC): wild type (wt) N2 (Bristol), CL4176 *dvl-27[myo-3p::A β ₁₋₄₂:let-851 3'UTR + rol-6(su1006)]*, DLM9 *uwaEx5[myo-3p::CERULEAN-VENUSlgg-1 + unc-119(+)]*, GMC101 *dvl-100[unc-54p::A β ₁₋₄₂:unc-54 3'UTR + mtl-2p::GFP]*, CB246 *unc-64(e246)*, CB928 *unc-31(e928)*, KR1787 *unc-13(e51)*. The modified ZsProSensor-1 reporter strains YD114 *xzIs2[unc-54p::UIM2ZsProSensor-1]* and YD70 *xzIs1[vha-6p::UIM2ZsProSensor-1]* were a kind gift from Dr. Carina I. Holmberg (University of Helsinki). The strain expressing A β in glutamatergic neurons UA198 *baln34[eat-4p::ssA β 42 + myo-2p::mCherry]; adIs1240[eat-4p::GFP]* [26] was a kind gift from Prof. Guy A. Caldwell (The University of Alabama). The following strains carrying extrachromosomal arrays were also used: Ex[*myo-2p::GFP*], Ex[*let-858p::pbs-5 + myo-2p::GFP*], Ex[*rgef-1p::pbs-5 + myo-2p::GFP*], Ex[*rol-6(su1006)*], Ex[*let-858p::pbs-5 + rol-6(su1006)*] and Ex[*rgef-1p::pbs-5 + rol-6(su1006)*]. A full list of the strains used in this work is documented in Table S1.

2.2. Cloning and *C. elegans* transgenesis

For the construct encoding the *rgef-1p::pbs-5* transgene, the Gateway® Cloning (Invitrogen life technologies, CA, USA) was used. The *rgef-1p* was amplified with a PCR on gDNA of wt nematodes with the attB primers Fw: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTactt actgtctcatgctgctgct and Rev: GGGGACAACCTTTGTATACAAAGTTGTc gttccgataccctcttatca gc and recombined with BP recombinase in pDONR™ 221 P1-P5r. The sequence of *pbs-5* was amplified also from wt gDNA with the attB primers Fw: GGGGACAACCTTTGTATACAAAGTTGTAAATG TGGGGCGAGACATTCG and Rev: GGGGACCACTTTGTACAAAGCTGGGTACGT CATCAACACCCAGCC and recombined with BP recombinase in pDONR221™ P5-P2. The two entry clones carrying *rgef-1p* and *pbs-5* were recombined with pGC93 with the LR recombinase to produce an expression clone. This vector was microinjected in the gonads of wt nematodes at 50 ng/μL together with either 5 ng/μL of the co-injection marker *myo-2p::GFP* or 50 ng/μL of the pRF4 plasmid *rol-6(su1006)*. The nematode strain overexpressing *pbs-5* under *let-858p* was generated using a construct made previously [10]

and microinjected at 20 ng/μL. Control strains were microinjected with either co-injection marker only, at the same concentrations. All transgenes were carried in extrachromosomal arrays.

2.3. *C. elegans* treatment with neurotransmitters

All neurotransmitters (acetylcholine; Alfa Aesar, MA, USA, #L02168, GABA; Acros Organics, Belgium, #103280250, glutamate; Alfa Aesar, MA, USA, #A12919, octopamine; Thermo Scientific, MA, USA, #J61281.03, serotonin; Sigma-Aldrich, MO, USA, #H7752, dopamine; Alfa Aesar, MA, USA, #A11136.06, tyramine; Fluorochem, UK, #078887), were dissolved in M9 buffer (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄). The stock solutions were diluted with M9 and 200 μL were spread onto plates seeded with UV-inactivated OP50. Nematodes of L3 stage were transferred on these NGM plates containing acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, serotonin, dopamine or tyramine at final concentrations 50 μM - 100 mM, 150 μM - 30 mM, 15 μM - 15 mM, 40 μM - 20 mM, 1.5 μM - 73 μM, 5.2 μM - 158 μM and 14 μM - 143 μM respectively. The nematodes were treated for 20 h and imaged at the stage of young adult for *unc-13(e51)* and of L4 for *unc-64(e246)* mutants.

2.4. *C. elegans* treatment with epoxomicin

Epoxomicin (UBPBio, USA, #F1440-5) was dissolved in DMSO (180 mM stock solution). *C. elegans* embryos were obtained following treatment of gravid adults with a hypochlorite solution and seeding onto NGM plates with UV-killed bacteria. Once the nematodes reached the L3 stage they were transferred into a microcentrifuge tube with 200 μL M9 in which the pellet of 4 mL heat-inactivated OP50 culture had been dissolved, containing 1 mM epoxomicin [27] or DMSO (vehicle). In the case of epoxomicin-treated Muscle ZsProSensor-1 reporter animals, the tubes were stirred for 12 h at 20°C before the animals were imaged. In the case of paralysis experiments with CL4176 animals, the epoxomicin treatment was started at the time of the temperature upshift from 16°C to 25°C and after 12 h the animals were transferred on regular NGM plates seeded with UV-killed OP50. The paralysis assessment was then performed as described below.

2.5. *C. elegans* treatment with chloroquine

Chloroquine (TCI Chemicals, Tokyo Japan, #C2301) was dissolved in M9 buffer (20 mM final working solution). Synchronized day 1 adult nematodes were transferred into a microcentrifuge tube with 200 μL M9 or 200 μL M9+chloroquine. In either case the pellet of 4 mL heat-inactivated OP50 culture had been dissolved in the tube. The tubes were stirred for 16 h at 20°C before the animals were rinsed and collected for protein extraction and western blotting.

2.6. *C. elegans* treatment with oxidative stressors

Paraquat (Sigma-Aldrich, MO, USA, #856177) and NaN₃ (Merck, Darmstadt, Germany, #1.06688) were dissolved in ddH₂O and M9 buffer, respectively. Synchronized L4 nematodes were transferred to plates containing 2 mM paraquat and transferred to freshly prepared plates every other day. Survival was scored until all animals were dead (~8 days after the beginning of the treatment). Synchronized young adult nematodes were transferred to plates supplemented with 180 μM freshly prepared NaN₃ for 24 h and survival was scored after 24 h recovery.

2.7. RNA extraction

~200 young adult nematodes/sample were resuspended in 1 mL Trizol™ (Invitrogen, MA, USA, #15596-026) and underwent 3–4 cycles of freezing (liquid N₂) and thawing (37°C) until intact bodies were no

longer visible. Following addition of 200 μL chloroform (Sigma-Aldrich, MO, USA, #372978) and vigorous mixing, the samples were centrifuged at 13000 rpm for 15 min at 4°C. The upper aqueous phase was pipetted and mixed with 500 μL of chilled isopropanol and centrifuged again at 13000 rpm for 10 min at 4°C. The RNA pellet was washed with 300 μL of 75% ethanol and centrifuged again at 13000 rpm for 10 min at 4°C. Once air dried, the pellet was resuspended in 25 μL RNase-free water and quantified using a spectrophotometer (Quawell, CA, USA, Q5000).

2.8. cDNA synthesis and qRT-PCR

1 μg of RNA was used for reverse transcription using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, CA, USA, #1708891) according to manufacturer instructions. After cDNA synthesis, the reactions were diluted with 80 μL of nuclease-free water and 1 μL of this was used for the qRT-PCR reaction with the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, CA, USA, #17251224) on a Bio-Rad CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA). Each set of primers was verified through a two-step protocol that included (i) testing of nine combinations of primer concentrations against 10 ng of wt cDNA, choosing the combination which gave the lowest C_T value and only the expected product when the qRT-PCR reaction was run on a 2% agarose gel, and (ii) testing of the linearity of C_T values given by the primer combination identified in step (i) with a serial dilution of cDNA ranging from 50 to 1.56 ng. The following primers were used in this study at 400 nM: *pbs-5*, Fw: GAGATCGTATGGTTGC-CACG, *pbs-5*, Rev: GGAGCTCGTACAAAGTGCAG, *cdc-42*, Fw: CGT TGACGCAGAAAGGGACTG, *cdc-42*, Rev: CTTCTTCTCTGTGTGGTG GGT, *Aβ*, Fw: GCAGAATTCGACATGACTCAGG, *Aβ*, Rev: GCCCAC-CATGAGTCCAATGATT, *dod-24*, Fw: CAAACACTTCACCGAGCCAG, *dod-24*, Rev: AGTCATCGTTCTGGAGCAATTC, *nit-1*, Fw: GCATAGGTGGC CAGATTCAAAA, *nit-1*, Rev: CCAGCTGCTCTTCCACATTT, *skn-1*, Fw: GAGACGAGACGATAA *skn-1*, Rev: CAGATGAATATGGACGACACTC, *gst-4*, Fw: AAGTTGTTGAACCGAGCCC, *gst-4*, Rev: AATCACAATATCA GCCCAAGTC.

2.9. Protein extraction, dot and western blotting

Nematodes were lysed via sonication in RIPA buffer supplemented with proteinase inhibitors. Protein concentration was determined with DC assay (Bio-Rad, CA, USA, #500-0113, -0114, -0115) and 15–20 μg of protein were separated with SDS-PAGE or 5–7 μg of protein were directly loaded on a nitrocellulose membrane mounted on a dot blotter. In the case of western blotting, the separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. All membranes were blocked with 5% BSA or 5% non-fat milk for 1 h at RT and incubated overnight with a primary antibody. The secondary antibodies were incubated at RT for 1 h and the membranes were developed using an ECL kit (Bio-Rad, CA, USA, #170-5051) and a Bio-Rad XRS+ Chemidoc (Bio-Rad, CA, USA). Coomassie Brilliant Blue staining was used for equal loading control. The primary antibodies used in this study were: anti-6E10 (BioLegend, CA, USA, #803001), anti-amyloid oligomer (EMD Millipore Corp., MA, USA, #AB9234) and anti-GFP (Cell Signaling, MA, USA, #2956). The secondary antibodies used in this study were: anti-rabbit (Santa Cruz, TX, USA, sc-2357) and anti-mouse (Santa Cruz, sc-516102).

2.10. Proteasome activities

To measure the chymotrypsin-like (CT-L) activity in cell-free assays, 0.5 μg of human purified proteasome (Proteasome Protein Center Kibbutz Ramat-Yohanan, Israel) was mixed with glutamate (Alfa Aesar, MA, USA, #A12919) in concentrations ranging from 15 μM to 15 mM and with Succinyl-Leucine-Leucine-Valine-Tyrosine-7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC, UBPBio, TX, USA, #G1100) at a 100 μM final concentration in a final volume of 100 μL in the wells of a black 96 well plate. 5 technical replicates per sample were used for each assay. SDS at final concentration 0.01% was used as a positive control

and the proteasome inhibitor MG132 (UBPBio, TX, USA, #F1101) at a final concentration 20 μ M was used as a negative control. The fluorescence was measured at 380/460 nm excitation/emission every 5 min for 1 h in a TECAN (Tecan Ltd., Switzerland) plate reader at 37°C.

2.11. Paralysis assays

For transgenic animals crossed with the CL4176 strain: 150–300 animals of L3 stage were shifted from 16°C to 25°C and 16 h later they were scored over the span of 10–14 h for paralysis until the entire population was paralyzed. For transgenic animals crossed with the GMC101 strain: 80–120 animals of L4 stage were transferred on NGM plates with 40 μ M FUDR (Acros Organics, Belgium, #227601000) seeded with UV-inactivated OP50. Once they reached the stage of young adult, the animals were shifted from 20°C to 25°C. Scoring of paralyzed nematodes was initiated 12 h after temperature upshift and lasted until the entire population was paralyzed. For both A β models, the animals were scored as paralyzed if they failed to undergo a full body wave propagation upon prodding and each paralysis assay was repeated at least three times by two blinded experimenters.

2.12. Microscopy and image analysis

The animals were mounted on 2% agarose pads on glass slides and immobilized using 50 mM levamisole (Sigma-Aldrich, MO, USA, #L9756) dissolved in M9 buffer. The imaging was performed with a Leica TCS SPE confocal laser scanning microscope. For the animals expressing ZsProSensor-1, images from the anterior part of the animal were acquired using a 20x/0.70 objective and Z-stacks were obtained with stable laser intensity and gain throughout all conditions of every experiment. Regions of interest were determined on maximum intensity projection images of the Z-stacks and their intensity was determined with ImageJ. For transgenic animals crossed with UA198 animals, a 40x/1.15 oil immersion objective was used and the number of neurons in the tail was determined with Z-stacks and maximum intensity projection images.

2.13. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism Software (San Diego, USA). Depending on the experiment, a variety of statistical tests was used and each is mentioned in the respective figure legend together with the sample size for each experiment. For analyses comparing the mean of two groups, we used the parametric two-tailed Student's *t*-test, provided that each group comprised of at least 10 values. For fewer than 10 values we used the non-parametric test Mann-Whitney. When fewer than 10 replicates were included in an experimental condition, individual points representing each replicate are shown in the bar charts. For the comparison of more than 2 groups with fewer than 10 values per group, we used a non-parametric ANOVA-single factor with a post-hoc correction for multiple comparisons (Kruskal-Wallis test with Dunn's correction). For the comparison of more than 2 groups with more than 10 values per group, we used a parametric ANOVA-single factor with a post-hoc correction for multiple comparisons (Tukey's multiple comparisons test). For paralysis curves we used the log-rank Mantel-Cox test. All bar charts indicate the mean of the independent experiments $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Neuron-specific proteasome overexpression increases proteasome activity in the muscle

We have previously shown that ubiquitous overexpression of *pbs-5* proteasome subunit is sufficient to increase the overall proteasome activity and to promote enhanced resistance against A β proteotoxicity in

C. elegans [10]. Given that there are no reports on the potential cell non-autonomous regulation of the proteasome and since the nervous system is one of the main tissues communicating with other tissues, we sought to investigate whether neuron-specific *pbs-5* overexpression affects (a) the proteasome activity in distal tissues and, (b) their resistance/response to proteotoxicity in a cell non-autonomous manner. To generate transgenic animals with proteasome overexpression, we took advantage of our previously published *pbs-5* transgene [10]. To drive proteasome overexpression in the nervous system, we introduced in wt N2 nematodes a transgene (as an extrachromosomal array) composed of the promoter of the neuron-specific gene *rgef-1* [28] fused to *pbs-5* (*rgef-1p::pbs-5*) (referred to *pbs-5*-neuron hereafter; for simplicity we use simplified names for the various strains throughout the text, for complete genotypes please refer to the Materials and Methods section as well as to Table S1). We also created transgenic nematodes overexpressing *pbs-5* under the ubiquitous promoter of the gene *let-858* (*let-858p::pbs-5* strain; referred to *pbs-5*-ubiquitous hereafter). The relative control strain was only overexpressing the co-injection marker (*myo-2p::GFP*; referred to control hereafter). In accordance with our previous results [10], we detected increased transcript levels of *pbs-5* subunit in *pbs-5*-ubiquitous animals (Fig. S1). With regard to the *pbs-5*-neuron animals, although we generated two independent lines using different transformation markers (*myo-2p::GFP* and *rol-6(su1006)*), at most we only observed a slight increase in the levels of the *pbs-5* transcript (Fig. S1), probably due to the tissue-specific expression only in the neurons. Given that overexpression of $\beta 5$ subunit in all tissues in *C. elegans* (*pbs-5* [10]) and in neurons in *Drosophila* (*Pros β 5* [8,29]) and mouse (PSMB5 [8]) have been shown to enhance the resistance against proteotoxicity and to prevent cognitive deficits, we validated the neuronal proteasome overexpression with a functional assay. To this end, we crossed the *pbs-5*-neuron strain with the UA198 strain that expresses the human A β_{1-42} peptide in its GFP-tagged glutamatergic neurons, showing progressive, age-dependent neurodegeneration [26,30,31]. We scored significantly more surviving neurons in UA198 *pbs-5*-neuron animals compared to control nematodes on day 6 of adulthood (Fig. 1), thus suggesting a positive effect of neuronal *pbs-5* overexpression. Furthermore, these results also reveal an anti-proteotoxic effect of proteasome overexpression in a cell autonomous manner (modulation in neurons, positive effects in neurons).

Using the *pbs-5*-neuron strain, we initially addressed the question whether neuron-specific *pbs-5* overexpression affects the proteasome activity in a distal tissue. We took advantage of a well-characterized nematode strain expressing a modified ZsProSensor-1 fluorescent reporter under a muscle-specific promoter (referred to Muscle ZsProSensor-1 hereafter). More specifically, the modified ZsProSensor-1 reporter is fused to ubiquitin-interacting motifs derived from the *C. elegans* proteasome subunit RPN-10. Therefore, decreased fluorescence indicates increased proteasome-mediated degradation and vice versa (Fig. 2A) [32]. We crossed our control, *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals with the Muscle ZsProSensor-1 strain. The fluorescence levels of ZsProSensor-1 reporter were significantly reduced in the muscle of both *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals (Fig. 2B), thus revealing proteasome activation. To confirm these results and exclude potential effects due to the co-injection marker, we crossed the Muscle ZsProSensor-1 strain with *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals carrying the *rol-6(su1006)* dominant transformation marker as a co-injection marker. We detected a consistent phenotype with the previous transgenic animals (Fig. 2C). We further sought to investigate whether neuron specific proteasome activation was also affecting other tissues. To this end, we crossed our *pbs-5*-neuron animals with the nematode strain expressing the modified ZsProSensor-1 fluorescent reporter under a gut-specific promoter (referred to Gut ZsProSensor-1); we did not detect enhanced proteasome activity in the gut, thus suggesting a tissue-specific cell non-autonomous effect (Fig. 2D). In total, our results reveal a cell non-autonomous regulation of the proteasome, since *pbs-5* overexpression in the nervous system led to enhanced proteasome activity levels in the muscle.

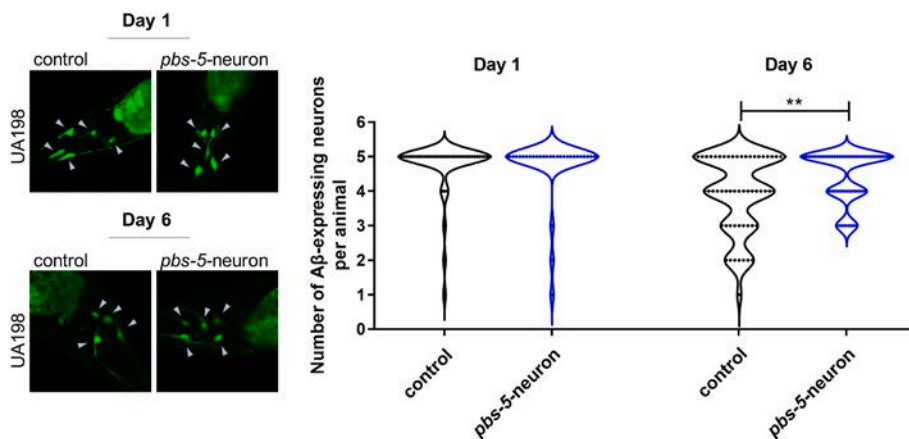


Fig. 1. Delayed A β -mediated glutamatergic neurodegeneration in *pbs-5*-neuron animals. Representative fluorescence micrographs of UA198 control and *pbs-5*-neuron animals expressing the human A β ₁₋₄₂ peptide in their GFP-tagged glutamatergic neurons, on days 1 and 6 of adulthood. The arrows point to intact neurons (left panel). Violin graph showing the number of tail glutamatergic neurons expressing the human A β ₁₋₄₂ peptide in each examined animal from UA198 control and *pbs-5*-neuron populations, on days 1 and 6 of adulthood. Each dot represents an examined animal (right panel). Graph shows the distribution of pooled values from 3 independent experiments, >30 animals/condition, ***p* value < 0.01 (two-tailed Student's *t*-test).

3.2. Neuron-specific proteasome overexpression confers anti-proteotoxic effects in a cell non-autonomous manner

We then sought to investigate whether the cell non-autonomous proteasome activation in the muscle may counteract a proteotoxic threat as it was previously shown for the ubiquitous *pbs-5* overexpression [10]. To this end, we crossed our *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals with the CL4176 strain, an A β *C. elegans* model. This strain expresses the human A β ₁₋₄₂ peptide under a muscle-specific promoter and upon temperature upshift, they accumulate A β peptide in their body wall muscle cells and become paralyzed in a few hours [33]. Ubiquitous as well as neuron-specific proteasome overexpression significantly delayed the proteotoxic effects of A β peptide leading to delayed paralysis (Fig. 3A, Table S2). To confirm this protective effect, we evaluated the effects of ubiquitous and pan-neuronal proteasome overexpression in an additional A β nematode model, the GMC101 strain. These animals constitutively express the human A β ₁₋₄₂ peptide under a muscle-specific promoter and manifest age-progressive paralysis [34]. Consistent with our previous data, paralysis was also significantly delayed in GMC101 *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals (Fig. 3B, Table S2). Moreover, ubiquitous and neuron-specific proteasome activation significantly reduced the levels of A β oligomers (Fig. 3C, Fig. S2). A tendency for reduced total A β levels was also recorded. Lack of significant changes in the transcript levels of A β peptide in our transgenic animals verified that the observed differences in the protein levels of A β forms are unlikely to arise from changes in the transcription of the transgene (Fig. 3D). To verify that the activation of the proteasome is responsible for the observed positive outcomes, we have then sought to inhibit this activation. We attempted to pharmacologically alter the proteasome activity by using epoxomicin, a highly specific proteasome inhibitor [35]. Following a series of dose-response experiments, we found that 1 mM epoxomicin (constant treatment for up to 12 h) could decrease proteasome activity in the Muscle ZsProSensor-1 strain (Fig. S3) without compromising survival. We then treated both CL4176 *pbs-5*-neuron and control animals with DMSO (vehicle) and 1 mM epoxomicin and paralysis assays were performed. Despite a small developmental delay exhibited by the animals treated with epoxomicin, we found that epoxomicin not only abrogated the delayed paralysis of *pbs-5*-neuron animals but it accelerated it compared to control animals treated with epoxomicin (Fig. 3E). This strongly suggests that proteasome activation underlies the observed beneficial effects on A β -mediated paralysis.

To further prove the link between proteasome activation and protection against proteotoxicity, we attempted to perform RNAi of *pbs-5* subunit in GMC101 *pbs-5*-neuron animals. Nonetheless, this proved technically impossible as the GMC101 *pbs-5*-neuron animals lost their delayed paralysis rates over their control counterparts, once grown on HT115 bacteria used for RNAi experiments (Fig. S4A). To cross-validate

these results, we evaluated the proteasome activity in Muscle ZsProSensor-1 *pbs-5*-neuron and control animals grown on HT115 bacteria. Indeed, the signal was not reduced anymore (Fig. S4B), as opposed to the observed reduction when the animals are grown on OP50 bacteria (Fig. 2B), thus suggesting that HT115 bacteria interfere with either the function of the proteasome and/or the communication between the neurons and the muscle. Nevertheless, we performed paralysis assays in GMC101 control animals in the presence of *pbs-5* RNAi; the paralysis was significantly accelerated (Fig. S4C), thus verifying the importance of the proteasome function on the paralysis phenotype.

As a proof of concept and to verify the link between proteasome activation in the muscle and the protection against A β proteotoxicity in the muscle, we created transgenic nematodes overexpressing *pbs-5* subunit under the promoter of the muscle-specific gene *myo-3* (*myo-3::pbs-5* strain; referred to *pbs-5*-muscle hereafter). The relative control strain carried only the co-injection marker (*myo-2::GFP*; referred to control hereafter). Quantitative PCR analysis confirmed *pbs-5* overexpression (Fig. 4A). To test whether muscle-specific *pbs-5* overexpression results in enhanced proteasome activity in the same tissue (i. e. cell autonomously), we initially crossed the *pbs-5*-muscle strain with the strain expressing the modified ZsProSensor-1 fluorescent reporter in the muscle. As expected, we found reduced levels of fluorescence indicating proteasome activation in Muscle ZsProSensor-1 *pbs-5*-muscle animals (Fig. 4B). We then crossed the *pbs-5*-muscle strain with the GMC101 animals. Paralysis was significantly delayed in GMC101 *pbs-5*-muscle animals, thus verifying that proteasome activation is sufficient for protection against A β proteotoxicity (Fig. 4C). Moreover, this result reveals a cell autonomous anti-proteotoxic effect (modulation in the muscle, positive effects in the muscle).

Mounting evidence suggests that the ALP is implicated in the clearance of misfolded or aggregated A β forms in various models, including *C. elegans* [36,37]. Moreover, the cross-talk between the UPS and ALP is well-accepted although not fully elucidated [38]. We therefore examined the potential involvement of autophagy in our setting. We took advantage of DLM9 strain that expresses under the muscle-specific promoter *myo-3p* a dual fluorescent protein (dFP) fused to LGG-1, a key protein in autophagosome formation. Upon docking and fusion to the lysosome, a monomeric fluorescent protein (mFP) is released, easily distinguishable from dFP via immunoblotting [39]. The ratio mFP/dFP gives an indication of the rate of autophagosome fusion with lysosomes, while a flux assay in the presence of chloroquine that inhibits the acidification of the lysosome thus, blocking the turnover of autolysosomes, reveals if the increased mFP/dFP ratio originates from increased autophagosome formation or block of autolysosome turnover (Fig. 4D). We crossed this strain with *pbs-5*-neuron and control animals. Autophagic flux was found unchanged in the muscle of DLM9 *pbs-5*-neuron animals (Fig. 4E), thus suggesting that the anti-proteotoxic effect of neuron-specific proteasome overexpression was independent of ALP

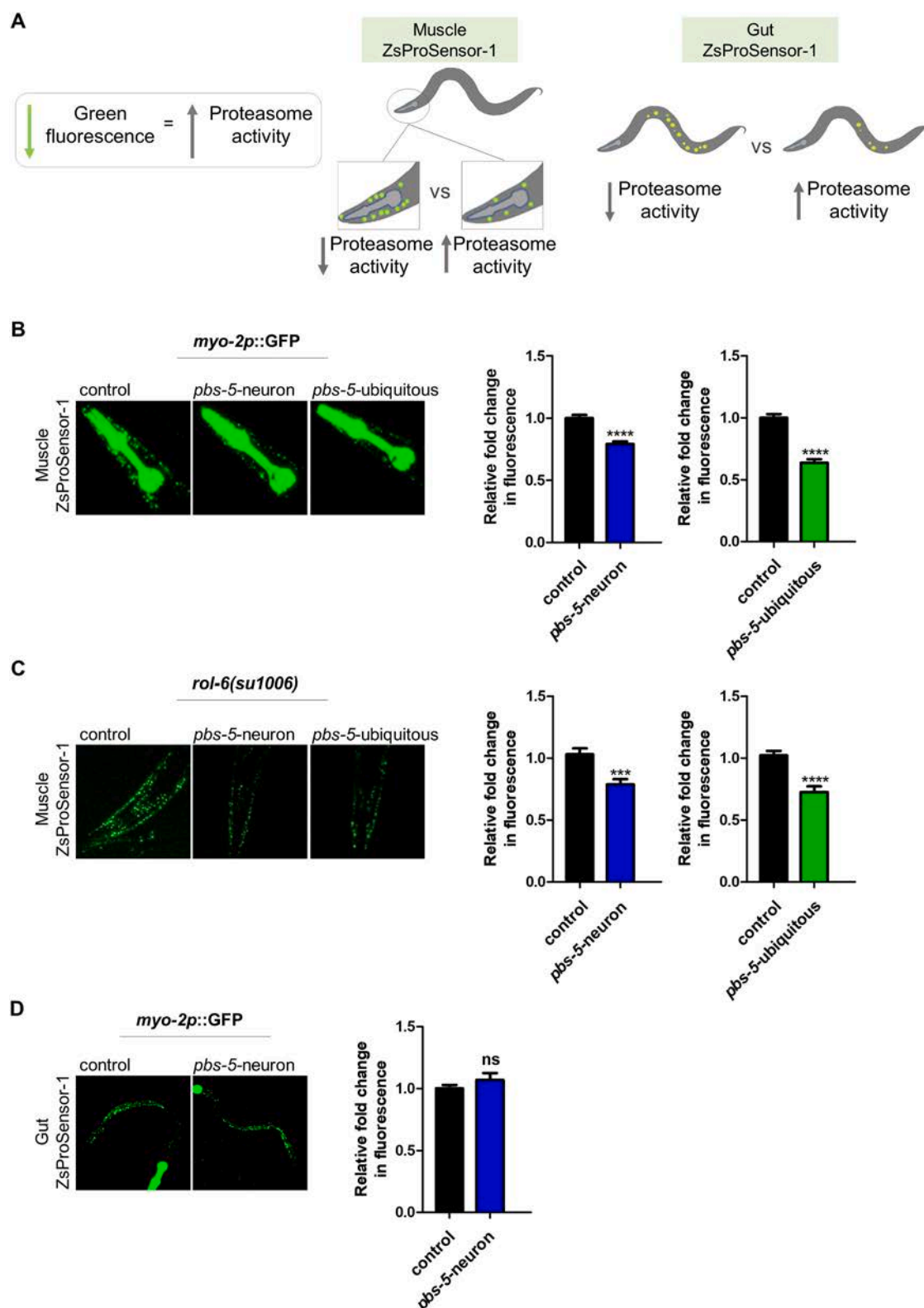
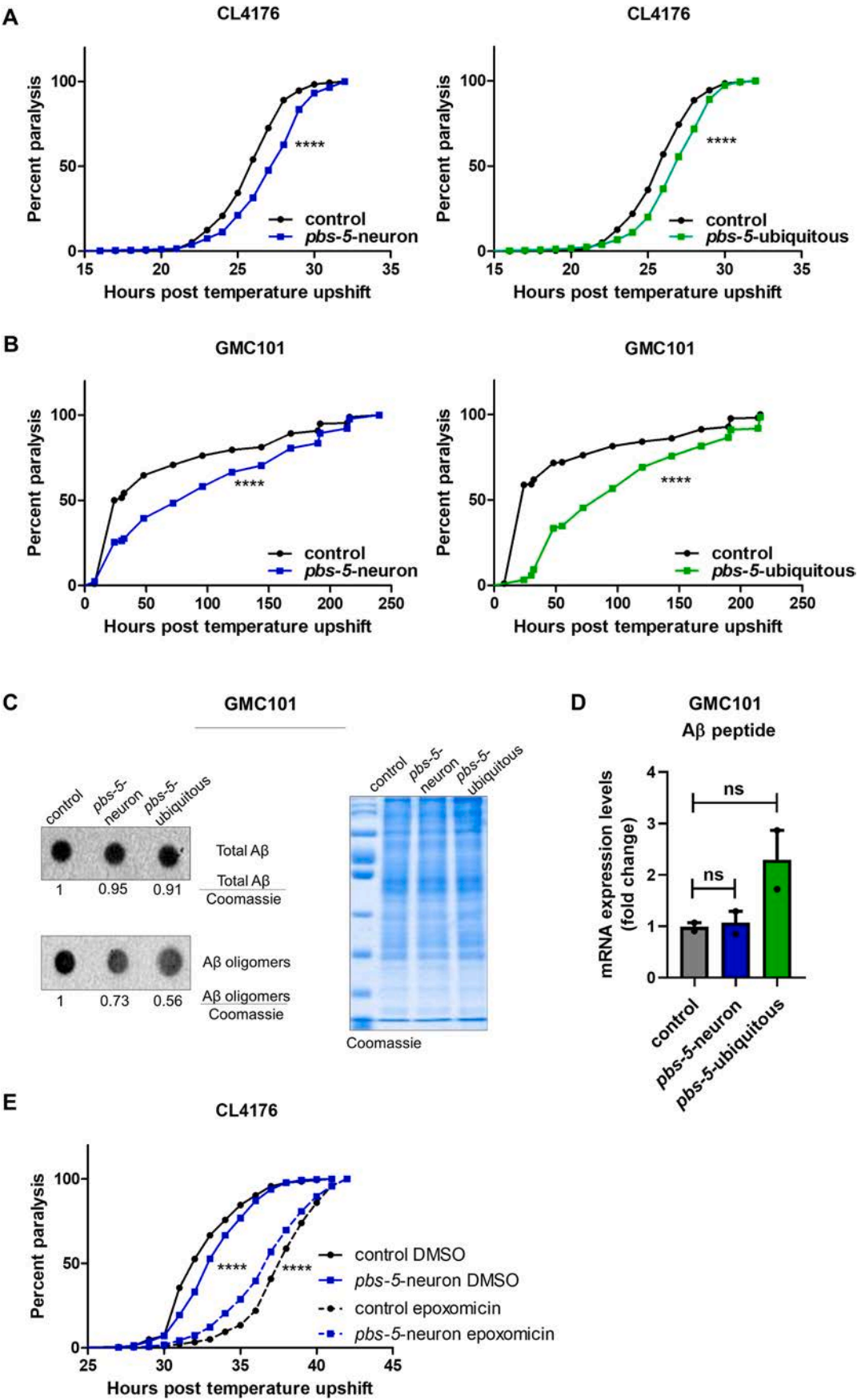


Fig. 2. Enhanced proteasome activity in the muscle of *pbs-5-neuron* animals. (A) Schematic describing the interpretation of the changes in the ZsProSensor-1 signal while monitoring proteasome activity in the muscle (Muscle ZsProSensor-1) or the gut (Gut ZsProSensor-1) of transgenic nematodes. Decreased fluorescence indicates increased proteasome activity and vice versa. (B, C, D) Representative fluorescence micrographs of animals expressing the ZsProSensor-1 reporter (left panel) and quantification of the ZsProSensor-1 signal (right panel) in (B, C) the muscle and (D) the gut, crossed with control, *pbs-5-neuron* or *pbs-5-ubiquitous* animals (only control and *pbs-5-neuron* animals in D) carrying (B, D) the *myo-2p::GFP* co-injection marker and, (C) the *rol-6(su1006)* co-injection marker. The mean value of fluorescence in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of at least 3 independent experiments $\pm$ SEM, >20 animals/condition, ***p value < 0.001, ****p value < 0.0001, ns, not significant (two-tailed Student's *t*-test).



(caption on next page)

Fig. 3. Neuron-specific proteasome overexpression confers protection against A β proteotoxicity in the muscle of *pbs-5*-neuron animals (cell non-autonomous effect). (A, B) Paralysis curves of control, *pbs-5*-neuron (left panels) and *pbs-5*-ubiquitous (right panels) animals expressing the human A β_{1-42} peptide in their body wall muscle cells, (A) CL4176 strain (temperature-dependent expression of the human A β_{1-42} peptide in the muscle with progressive paralysis within hours), 8 independent experiments with >800 animals, *****p* value < 0.0001 (log-rank Mantel-Cox test) and, (B) GMC101 strain (constitutive expression of the human A β_{1-42} peptide in the muscle with age-progressive paralysis), 3 independent experiments with >140 animals, *****p* value < 0.0001 (log-rank Mantel-Cox test). Curves are the pooled result of the indicated independent experiments. (C) Dot blot analysis (representative blots from 4 independent experiments) of total A β and A β oligomers in GMC101 control, *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals expressing the human A β_{1-42} peptide in their body wall muscle cells, collected when 50% of the control population was paralyzed. A gel stained with Coomassie brilliant blue was used as a loading control in each experiment. The mean value of signal of the protein of interest to the Coomassie signal in control animals was set to 1. Quantification that appears underneath the blots represents the mean of 4 independent experiments. (D) mRNA expression levels of A β peptide in GMC101 control, *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals expressing the human A β_{1-42} peptide in their body wall muscle cells on day 1 of adulthood. The mean value of A β peptide mRNA expression in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of 2 independent experiments $\pm$ SEM, ns, not significant (Kruskal-Wallis test). (E) Paralysis curves of CL4176 control and *pbs-5*-neuron animals expressing the human A β_{1-42} peptide in their body wall muscle cells treated with DMSO or 1 mM epoxomicin, 4 independent experiments with >450 animals, *****p* value < 0.0001 (log-rank Mantel-Cox test). Curves are the pooled result of 4 independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

activation.

In conclusion, neuron-specific proteasome activation can exert protection against A β proteotoxicity in the muscle in a cell non-autonomous manner.

3.3. The cell non-autonomous protective effects following neuronal proteasome activation are not related to protection against oxidative stress

Given the established link between oxidative stress and AD [40,41] along with the interplay between the proteasome and oxidative stress response [42–44], we sought to investigate whether the observed beneficial effects against A β proteotoxicity were linked to enhanced oxidative stress response. We thus challenged our *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals with two different oxidative stressors, namely paraquat and NaN₃. Although proteasome activation in all tissues induced protection against oxidative stress (Fig. 5A–B; *pbs-5*-ubiquitous) in accordance with our previous results [10], notably, no resistance against oxidative stress was recorded in the *pbs-5*-neuron animals (Fig. 5A–B; *pbs-5*-neuron). Our results suggest that the neuronal proteasome activation confers cell non-autonomous protective effects in the muscle specifically against proteotoxic stress and not against oxidative stress. Given that the transcription factor SKN-1 is pivotal in oxidative stress resistance while it triggers strong responses to proteasome perturbations [45–47], we also investigated whether SKN-1 activation could account for the protective effects against A β -proteotoxicity. We therefore revealed the mRNA expression levels of *skn-1* as well as of three of its target genes, namely *gst-4*, *dod-24* and *nit-1* [47], in control, *pbs-5*-neuron and *pbs-5*-ubiquitous animals in wt and GMC101 backgrounds. Although in the *pbs-5*-ubiquitous animals, *gst-4* was significantly upregulated (statistically significant in wt background, exhibiting a tendency in GMC101 background without reaching statistical significance), none of the *skn-1* target genes or *skn-1* itself were upregulated in *pbs-5*-neuron animals in either background (Fig. 5C). In total our results suggest that the distal protective effects we score upon neuronal proteasome activation are specific for the A β proteotoxic stress and not for the related oxidative stress.

3.4. The cell non-autonomous activation of the proteasome in the muscle is mediated by SCVs

Our results suggested that one or more neuronal-derived signals prompt proteasome reinforcement in a non-neuronal tissue such as the muscle. The communication between the nervous and the muscle tissues is accomplished via synaptic transmission [48]. In *C. elegans*, neurotransmitters are secreted from neurons in two types of vesicles classified as SCVs and DCVs, based on their size and appearance in electron micrographs [49]; Fig. 6A). We hypothesized that neurons that overexpress the *pbs-5* subunit may affect proteasome activation in the muscle through a neuroendocrine signaling pathway mediated by SCVs and/or DCVs. To address this hypothesis, we crossed our *pbs-5*-neuron animals

with *unc-64* mutants that are deficient in the priming or exocytosis of both DCVs and SCVs [50]. To obtain a fast readout, the derived transgenic animals (*unc-64(e246)*; *pbs-5*-neuron) and their controls were further crossed with the Muscle ZsProSensor-1 strain. We found that the loss-of-function *unc-64(e246)* allele completely abolished the proteasome-activating effect of neuronal *pbs-5* overexpression on muscular proteasome activity (Fig. 6B), indicating that the activating signal is most likely contained in SCVs and/or DCVs.

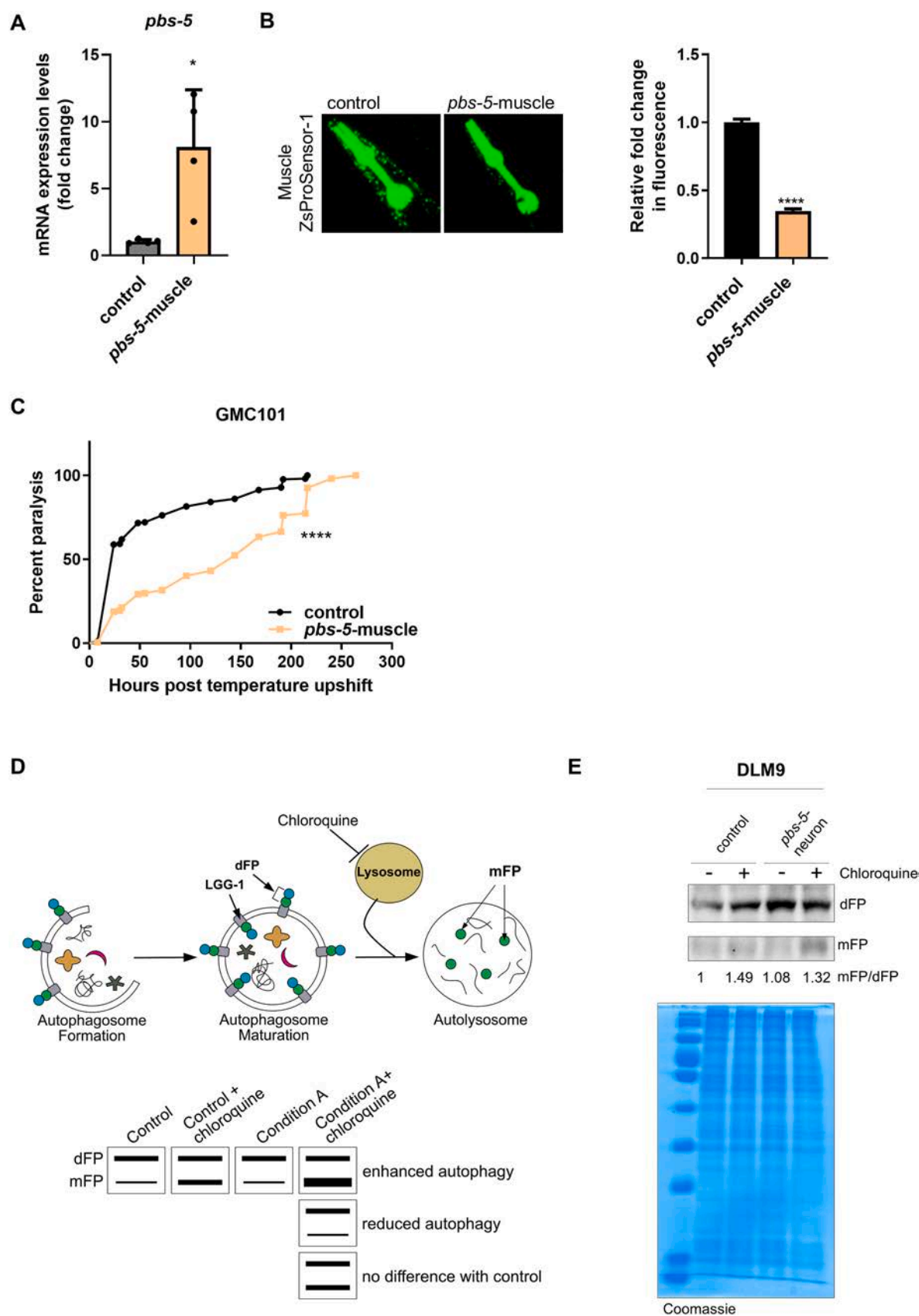
We then sought to tease apart the roles of the two vesicle types and to reveal which one is responsible for the cell non-autonomous communication of neuronal proteasome activation. The *unc-31* gene is known to participate in the exocytosis of DCVs while the *unc-13* in the priming of SCVs [51] (Fig. 6A). Although the *unc-31(e928)* loss-of-function allele did not inhibit the cell non-autonomous effect of proteasome activation in the muscle (Fig. 6C), the *unc-13(e51)* loss-of-function allele completely abolished the proteasome activation occurring in the muscle of ZsProSensor-1 *pbs-5*-neuron animals (Fig. 6D). Our results show that SCVs are responsible for the cell non-autonomous proteasome activation in the muscle following neuronal proteasome overexpression.

Next, we asked whether disruption of the SCVs-mediated communication between neurons and muscle is also translated into loss of protection against A β proteotoxicity. Since *unc-13(e51)* mutants are almost completely immobile, performing paralysis assays in *unc-13(e51)*; *pbs-5*-neuron animals was impossible. Nevertheless, *unc-64(e246)* mutants are not immobile. They have defects in both DCVs and SCVs but our results had already excluded the involvement of DCVs in the cell non-autonomous proteasome activation in the muscle (Fig. 6C). The *unc-64(e246)*; *pbs-5*-neuron animals did not exhibit decreased paralysis rates in neither CL4176 (Fig. 6E) nor GMC101 (Fig. 6F) backgrounds (Table S2). Together, our findings demonstrate that *pbs-5* overexpression in neurons stimulates proteasome activation in the muscle through SCVs, resulting in protection against A β proteotoxicity.

3.5. Glutamate can restore proteasome activity levels in the muscle of *pbs-5*-neuron animals lacking SCVs

We then sought to identify the potential neurotransmitter(s) contained in SCVs that could transmit the signal from the neurons leading to proteasome activation in the muscle. SCVs contain classical neurotransmitters such as glutamate, γ -aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine [49]. Since the *unc-13(e51)* mutants are unable to produce SCVs, we anticipated that external supplementation of the responsible molecule(s) would restore the effects of neuronal *pbs-5* overexpression in the muscle of *unc-13(e51)*; *pbs-5*-neuron animals. We therefore tested various concentrations of the three main neurotransmitters, namely glutamate, GABA and acetylcholine in Muscle ZsProSensor-1 *unc-13*; *pbs-5*-neuron animals and their controls (Fig. S5). Proteasome activity was enhanced only upon glutamate supplementation (Fig. 7A, Fig. S5A).

Since we could not perform paralysis assays in *unc-13(e51)* mutants due to their immobile phenotype, we tested whether glutamate



(caption on next page)

Fig. 4. Proteasome activation in the muscle confers protection against A β proteotoxicity in the muscle (cell autonomous effect). (A) mRNA expression levels of *pbs-5* proteasome subunit in control and *pbs-5*-muscle animals. The mean value of *pbs-5* mRNA expression in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of 4 independent experiments $\pm$ SEM, **p* value < 0.05 (Mann-Whitney test). (B) Representative fluorescence micrographs of control and *pbs-5*-muscle animals carrying the Muscle ZsProSensor-1 reporter (left panel) and quantification of the Muscle ZsProSensor-1 signal (right panel). The mean value of fluorescence in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of at least 3 independent experiments $\pm$ SEM, >25 animals/condition, *****p* value < 0.0001 (two-tailed Student's *t*-test). (C) Paralysis curves of GMC101 control and *pbs-5*-muscle animals expressing the human A β ₁₋₄₂ peptide in their body wall muscle cells, 3 independent experiments with >140 animals, *****p* value < 0.0001 (log-rank Mantel-Cox test). Curves are the pooled result of 3 independent experiments. (D) Schematic describing the potential outcomes and their interpretation when performing a flux assay to a strain expressing a dual fluorescent protein (dFP) fused to LGG-1. LGG-1dFP is localized on the membrane of the autophagosome. During autophagosome maturation some mFP is released but most of the mFP is released by the lysosomal proteases once the autophagosome fuses with the lysosome. However, the mFP released in the autolysosome is rapidly degraded, hence very little is detected in steady-state levels. The steady-state amount of mFP can reflect both the efficiency of the lysosomal proteolysis as well as the rate of autophagosome formation. Chloroquine inhibits the acidification of the lysosome, thus inhibiting lysosomal proteases and blocking lysosomal proteolysis. Hence addition of chloroquine can induce the accumulation of mFP. Depending on the accumulated mFP levels in the sample compared to control, the results from the sample treated with chloroquine indicate the origin of mFP, thus the status of autophagic flux. (E) Immunoblot analysis (representative blots from 5 independent experiments) of dFP and mFP in lysates from control and *pbs-5*-neuron animals expressing LGG-1 tagged with dFP, in the absence (-) or presence (+) of chloroquine for evaluation of the autophagic flux. A gel stained with Coomassie brilliant blue was used as a loading control. The mean value of signal of mFP/dFP in control (-) animals was set to 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

supplementation could restore the proteasome activity in the muscle of *unc-64(e246)* mutants. Surprisingly, we found that external glutamate supplementation did not restore the proteasome activity in the muscle of *pbs-5*-neuron animals in an *unc-64* mutant background (Fig. 7B). Given that the *unc-64* mutants have defects in both SCVs and DCVs, the inability of glutamate alone to restore the proteasome activity in the muscle in these mutants suggests that glutamate can compensate for the lack of SCVs only in the presence of functional DCVs, thus attributing a role to the DCVs and their cargo in this inter-tissue communication. We therefore investigated whether combined supplementation of glutamate (mainly found in SCVs) and other neurotransmitters that are most probably found in DCVs, could restore the proteasome activity in the muscle of *unc-64* mutants and thus the neuron-muscle communication. To this end, we treated Muscle ZsProSensor-1 *unc-64*; *pbs-5*-neuron animals, with glutamate and various concentrations of the 4 biogenic amines that are packaged in DCVs, namely octopamine, serotonin, dopamine and tyramine [49]. We did not detect any restoration of the proteasome activity with the combined supplementation of glutamate and biogenic amines in *unc-64* mutants (Figs. S6A–D). Consequently, the observed results might be due to the action of neuropeptides found in DCVs and therefore the potential cargo of DCVs that plays a role in the neuron-muscle communication needs further investigation. Although GABA and acetylcholine did not restore muscular proteasome activity in *unc-13* mutants (SCVs-defective animals; Figs. S5B–C), *unc-64* mutants have defects in both SCVs and DCVs and therefore, we reasoned that in these animals, neurotransmitters commonly found in SCVs could take over and exhibit additional regulatory roles. We therefore treated Muscle ZsProSensor-1 *unc-64*; *pbs-5*-neuron animals with a combination of glutamate and GABA or acetylcholine. Interestingly, we found that the double supplementation with glutamate and either GABA or acetylcholine results in reduction of proteasome activity in Muscle ZsProSensor-1 *unc-64*; *pbs-5*-neuron animals (Figs. S6E–F). This suggests that GABA and acetylcholine may have proteasome inhibitory roles that are counteracted by DCVs-dependent signals, as we never observed proteasome inhibition by GABA or acetylcholine in animals that are defective for SCVs but have intact DCVs (Figs. S5B–C).

To dissect the mechanism behind glutamate-mediated proteasome activation, we assessed whether glutamate may have direct stereochemical effects on the proteasome complex resulting in its activation. Incubation of purified proteasome with different concentrations of glutamate did not reveal any proteasome activating properties (Fig. 7C), thus suggesting that the glutamate effect on proteasome activity is most likely indirect. We have also checked whether glutamate addition in animals can phenocopy the results of neuronal *pbs-5* overexpression on proteasome activity. Glutamate supplementation in Muscle ZsProSensor-1 control animals did not affect their proteasome activity in the muscle (Figs. 7D, 2 first columns). Likewise, glutamate supplementation of Muscle ZsProSensor-1 *pbs-5*-neuron animals did not further

alter the already enhanced proteasome activity due to the *pbs-5* overexpression (Figs. 7D, 2 last columns). These results suggest that proteasome activation in the muscle of *pbs-5*-neuron animals is not due to a generic or unspecific proteasome-activating effect of glutamate but rather to a specific regulated process.

In conclusion, we show that proteasome activity is subjected to cell non-autonomous regulation since *pbs-5* overexpression in the neurons promotes proteasome activation in the muscle of *C. elegans*. Glutamate contained in SCVs is necessary for this activation but the presence of intact DCVs is also required. This cell non-autonomous proteasome activation is translated into efficient prevention of A β -mediated proteotoxic effects in the muscle of *C. elegans*.

4. Discussion

Proteinopathies including AD have been linked to inefficient protein degradation machineries, such as the UPS or the ALP [52,53]. This inefficiency is further accentuated during ageing which in turn is a top risk factor for aggregation-related diseases [2,54]. Consequently, reinforcement of the proteolytic part of proteostasis during ageing and upon disease progression has been suggested as a pivotal potential preventive and/or therapeutic approach. Here, we report the cell non-autonomous communication of neuronal proteasome activation. We show that overexpression of the *pbs-5* proteasome subunit in the nervous system can promote proteasome activation in the muscle tissue of *C. elegans*. The result is enhanced resistance to A β proteotoxicity in the distal tissue (muscle) but not enhanced resistance to oxidative stress. This communication depends on intact SCVs and glutamate, thus establishing a mechanistic link between neuronal proteasome reinforcement and decreased A β proteotoxicity in the muscle. Furthermore, we show that in the absence of SCVs, glutamate can compensate only in the presence of functional DCVs, thus suggesting a role of the DCVs' cargo in this distal tissue communication as well. Cell autonomous anti-proteotoxic effects are also revealed upon neuron- and muscle-specific proteasome activation.

Our *in vivo* approach conclusively demonstrates the cell non-autonomous control of proteasome function as previously described for other players of proteostasis such as the HSR [13], UPR^{ER} [18,19,55], UPR^{mit} [17] and autophagy [20]. Among the proteolytic pathways, the lysosome-mediated degradation [18] has been already shown to be affected in other tissues once proteostatic mechanisms such as the UPR^{ER} are modulated in neurons [18,55] or in the intestine [18]. Neuron-specific *Prosβ5* overexpression in *Drosophila* has been shown to slow down age-related deficits in learning, memory, and circadian rhythmicity [29]. A follow-up of this study showed that neuronal-specific overexpression of β5 subunit in *Drosophila* (*Prosβ5*) and in mice (PSMB5) was sufficient to ameliorate disease-related phenotypes in the respective AD models [8]. Notably, despite the attempts

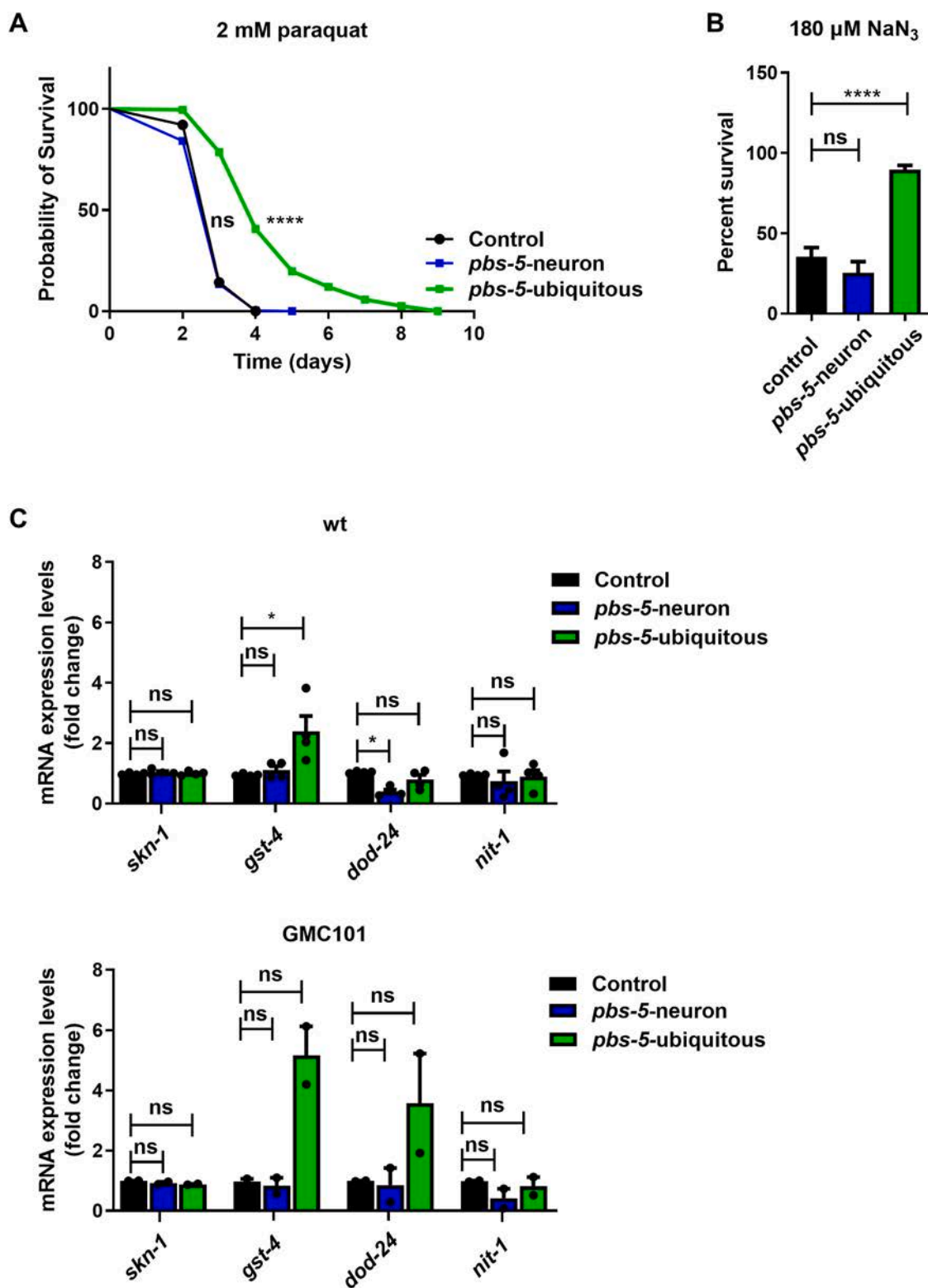
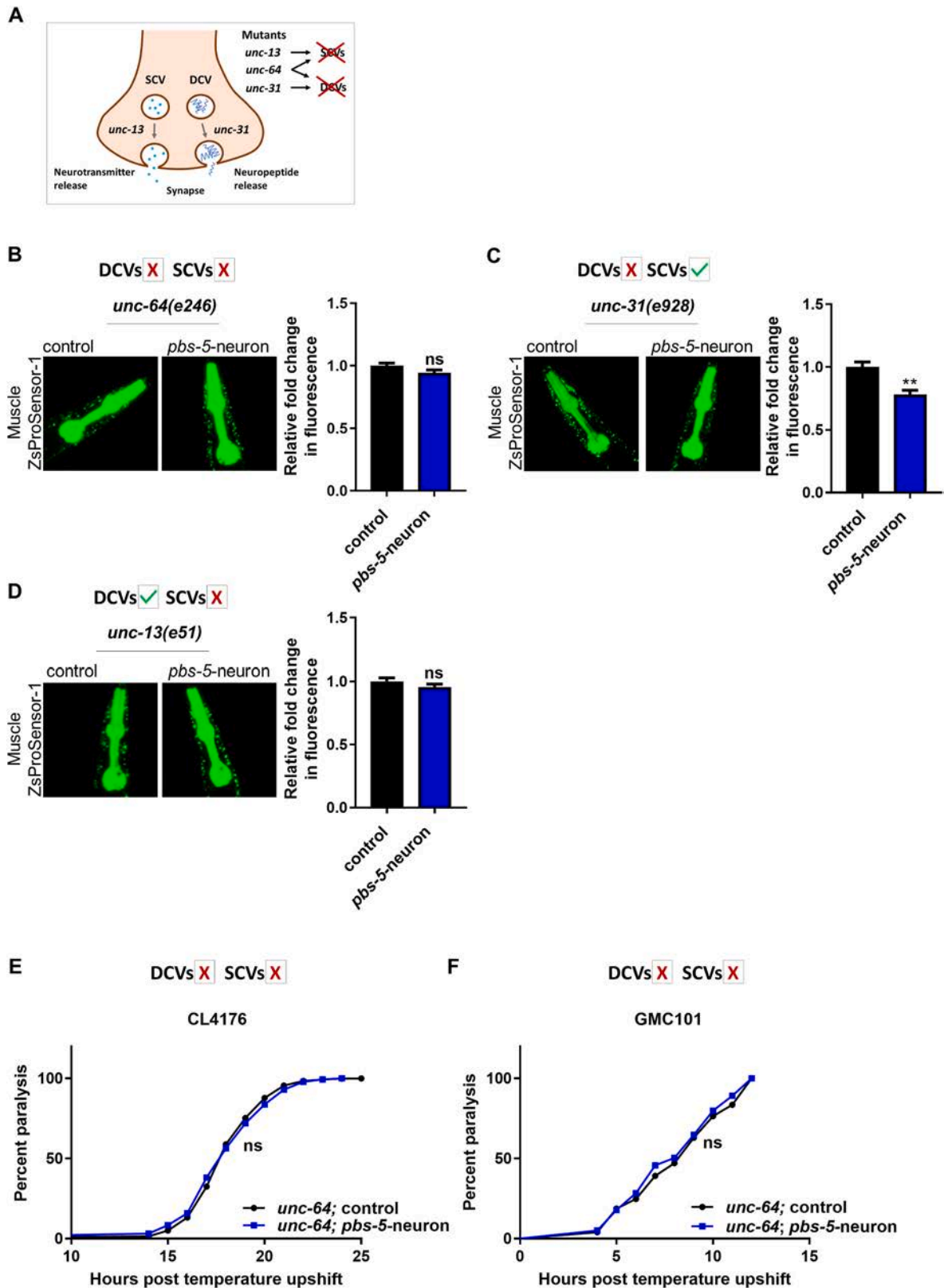


Fig. 5. Neuron-specific proteasome overexpression does not confer protection against oxidative stress as opposed to ubiquitous proteasome overexpression. (A) Lifespan curve of control, *pbs-5-neuron* and *pbs-5-ubiquitous* animals treated with 2 mM paraquat, 3 independent experiments with >190 animals per condition, *****p* value < 0.0001, ns, not significant (log-rank Mantel-Cox test). Curves are the pooled result of 3 independent experiments. (B) Survival percentage of control, *pbs-5-neuron* and *pbs-5-ubiquitous* animals 24 h after exposure to 180 μM NaN_3 , 3 independent experiments with >350 animals per condition, *****p* value < 0.0001, ns, not significant (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test). (C) mRNA expression levels of *skn-1* and *skn-1* target genes (*gst-4*, *dod-24*, *nit-1*) in wt (upper panel) and GMC101 (lower panel) control, *pbs-5-neuron* and *pbs-5-ubiquitous* animals in the young adult stage. The mean value of the mRNA expression of each gene in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of 4 (for the wt animals) and 2 (for the GMC101 animals) independent experiments $\pm$ SEM, **p* value < 0.05, ns, not significant (Mann-Whitney test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

for tissue-specific proteasome activation, no data exists on its cell non-autonomous regulation and the outcomes in distal tissues.

Tissue-specific proteotoxic stress has been shown to trigger various

proteostatic mechanisms cell non-autonomously in distal tissues as a compensatory response to stress. For example, neuronal overexpression of an aggregation-prone protein (polyQ40) and its binding on neuronal



(caption on next page)

Fig. 6. The cell non-autonomous effects of neuron-specific proteasome overexpression is dependent on SCVs. (A) Schematic describing the involvement of UNC-13 and UNC-31 in the release of neurosecretory vesicles. UNC-13 participates in the priming of SCVs containing small-molecule neurotransmitters. UNC-31 participates in the exocytosis of DCVs primarily containing neuropeptides. (B, C, D) Representative fluorescence micrographs of animals expressing the Muscle ZsProSensor-1 reporter crossed with control or *pbs-5*-neuron animals carrying the *myo-2p::GFP* co-injection marker in (B) *unc-64*, (C) *unc-31* and, (D) *unc-13* mutant backgrounds (left panels) and quantification of the Muscle ZsProSensor-1 signal for each set of experiments (right panels). The mean value of fluorescence in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of at least 3 independent experiments $\pm$ SEM, >20 animals/condition, ***p* value < 0.01 , ns, not significant (two-tailed Student's *t*-test). (E, F) Paralysis curves of control and *pbs-5*-neuron animals expressing the human A β_{1-42} peptide in their body wall muscle cells in an *unc-64* mutant background, (E) CL4176 strain (temperature-dependent expression of the human A β_{1-42} peptide in the muscle with progressive paralysis within hours), 9 independent experiments with >1000 animals per condition, ns, not significant (log-rank Mantel-Cox test) and, (F) GMC101 strain (constitutive expression of the human A β_{1-42} peptide in the muscle with age-progressive paralysis), 3 independent experiments with >250 animals per condition, ns, not significant (log-rank Mantel-Cox test). Curves are the pooled result of the indicated independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

mitochondria has been shown to elicit a global induction of a mitochondrial-specific unfolded protein response (UPR^{mit}), affecting whole-animal physiology [17]. With regard to the proteasome, silencing of various proteasome subunits (i.e. proteasome stress) in the skeletal muscle of *Drosophila* has been shown to mount an adaptive response in the brain that finally hinders retinal and brain ageing [56]. Nevertheless, our study is the first to show that a positive modulation of the proteasome (activation) is communicated to a distal tissue resulting in tissue protection (increased resistance to A β proteotoxicity).

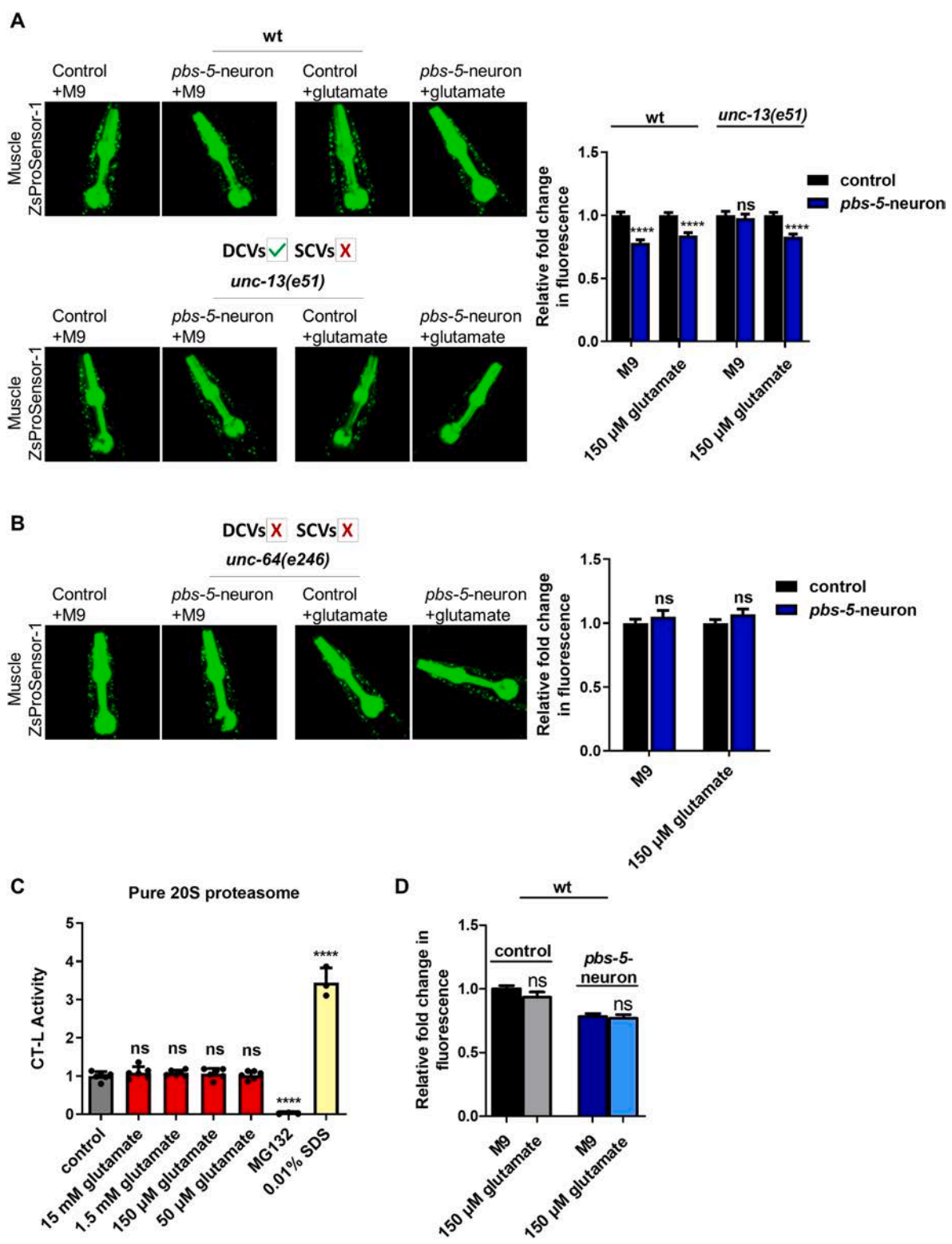
Our data clearly show that neuronal overexpression of the *pbs-5* subunit leads to proteasome activation in a distal tissue such as the muscle and its resistance to A β proteotoxicity. Although we excluded the implication of the intestine since we did not detect enhanced proteasome activity in this tissue upon neuronal proteasome overexpression, we cannot rule out that other tissues like hypodermis or the somatic gonad could be also affected by the proteasome activation in the nervous system. It would be interesting to assess if non-neuronal tissues that are affected by the nervous system also respond to the neuronal proteasome activation and further communicate with other tissues thereby creating an inter-tissue network of higher complexity.

One could ask how proteasome activation confers protection against A β proteotoxicity. Our results revealed significantly lower oligomeric A β levels (and a tendency for reduced total A β levels) in *pbs-5*-neuron animals. This suggests that proteasome activation may promote the degradation of A β species before they become highly aggregated and thus inaccessible and inhibitory to the proteasome [57,58]. In our previous work, proteasome activation through genetic means (systemic *pbs-5* overexpression) [10] or through natural compounds with proteasome-activating properties [59,60], had elicited similar results. Likewise, in a very recent work, genetic and pharmacological proteasome augmentation also resulted in enhanced clearance of APP in flies, cultured cells and mice [8]. Even more importantly, a negative correlation between proteasome activity and protein levels of APP and soluble A β_{42} levels in human hippocampal tissues of AD patients was revealed, thus strengthening the biological relevance of the findings in the organismal models [8]. Finally, combined supplementation of 18 α -glycyrrhetic acid (that activates the proteasome through enhanced transcription of several proteasome subunits [59,61]) and omega-3 fatty acids (that have been shown to directly positively modulate proteasome activity [62]) also resulted in a significant reduced percentage of A β_{42} coverage in the parietal cortex as well as in the hippocampus of 5xFAD (transgenic mice carrying 5 familial AD-associated mutations) mice [62]. It is well established in yeast and mammalian cells that the proteasome crosstalks with autophagy [63] while the same has been demonstrated in *C. elegans* [64,65]. Although we did not detect ALP activation in our setting, thus attributing a major role to the proteasome system for the observed results, one cannot rule out the potential implication of the ALP possibly in a later stage, when heavily aggregated proteins are formed. This was also suggested recently by an elegant study on small molecule VCP/p97 activators where both proteasome and autophagy routes shared a role in the clearance of different forms of misfolded species [66]. In total, our findings suggest that proteasome-related protection against A β

proteotoxicity emerges from enhanced clearance of various A β forms.

In cases where tissue-specific manipulation of a proteostatic mechanism has been achieved, studies mainly focused on the overall organismal fitness and longevity without focusing on the effects on specific distal tissues. Only a few studies have dealt with the effects of proteostasis manipulation in specific tissues and the downstream distal effects in models for protein aggregation [18,67]. Most importantly, none of them has investigated the role of the proteasome. We clearly show the beneficial effects of neuronal proteasome overexpression against A β proteotoxicity in the neuronal tissue but also in the periphery. Mechanistically, the “nervous system-to-periphery” cell non-autonomous communication usually occurs via extracellular signaling molecule release [68,69]. The distal activation of stress responses upon interventions in the nervous system has been shown to be mediated by neurons [13,19,55] and recently by glial cells [67]. Depending on the proteostatic mechanism that is modulated, either SCVs [55,70] or DCVs [17,67] have been shown to be responsible for the distal effects. We clearly show that SCVs are required for the cell non-autonomous communication of the neuronal proteasome activation which was rather surprising. Given that DCVs contain neuropeptides that are potential proteasome substrates and since in our setting the proteasome activity is enhanced, we had speculated that neuropeptides (and thus DCVs) could be the ones to be responsible for the observed effects. Moreover, a 20S proteasome form that is tightly associated with the neuronal plasma membrane and exposed to the extracellular space has been suggested to exist. This proteasome type has been shown to mediate the 20S-dependent degradation of intracellular proteins into bioactive extracellular peptides that modulate neuronal function [71,72]. As our results indicate the implication of DCVs as well, it would be interesting to investigate further their role and to examine whether the observed enhanced proteasome activity in our *pbs-5*-neuron animals affects this particular type of proteasomes and therefore the extracellular peptides produced by those proteasomes.

We also identified glutamate as a central player, without however being able to exclude the involvement of other neurotransmitters. How can glutamate restore this “proteasome activating” signal in *pbs-5*-neuron animals that lack SCVs? A direct or an indirect impingement of glutamate on proteasome activity could be speculated. We ruled out a direct effect on the proteasome complex since glutamate was not able to activate the 20S core proteasome in a cell-free assay. Moreover, direct administration of glutamate in wt background animals was not sufficient to promote proteasome activation whereas glutamate supplementation in animals with neuronal proteasome activation did not further enhance the proteasome activity. It seems that neuron-specific proteasome overexpression should precede before glutamate can function as a messenger provided however that DCVs are also functional. Given the multiple roles of glutamate, primarily as a neurotransmitter [73] but also as a precursor to the antioxidant glutathione [74] or as a modulator of the tricarboxylic acid cycle once converted into α -ketoglutarate [74], glutamate could contribute to redox or energy status alterations that may significantly impact proteasome activity and function. More extensive studies on the metabolic effects of *pbs-5* neuronal overexpression are needed.



(caption on next page)

Fig. 7. Glutamate supplementation restores the cell non-autonomous activation of the proteasome in *unc-13* mutants. (A, B) Representative fluorescence micrographs of animals expressing the Muscle ZsProSensor-1 reporter crossed with control or *pbs-5*-neuron animals carrying the *myo-2p::GFP* co-injection marker, in (A) wt and *unc-13* mutant backgrounds treated with M9 (vehicle) or 150 μ M glutamate (left panel) and quantification of the Muscle ZsProSensor-1 signal (right panel). The mean value of fluorescence in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of 3 independent experiments $\pm$ SEM, >20 animals/condition, *****p* value < 0.0001, ns, not significant (two-tailed Student's *t*-test) and, (B) *unc-64* mutant background treated with M9 (vehicle) or 150 μ M glutamate (left panel) and quantification of the Muscle ZsProSensor-1 signal (right panel). The mean value of fluorescence in control animals was set to 1. All values are reported as the mean of 3 independent experiments $\pm$ SEM, >20 animals/condition, ns, not significant (two-tailed Student's *t*-test). (C) CT-L proteasome activity of pure 20S proteasome in the presence of various concentrations of glutamate in cell-free assays. MG132 (proteasome inhibitor) was used as a negative and SDS (proteasome activator) as a positive control. The mean value of CT-L activity in control sample (no glutamate) was set to 1. All values are reported as the mean of 2 independent experiments $\pm$ SEM, *****p* value < 0.0001, ns, not significant (one-way ANOVA with Dunnett's Multiple Comparison). (D) Quantification of data from (A) comparing the relative fold change in fluorescence between wt control animals carrying the *myo-2p::GFP* co-injection marker (left columns) and *pbs-5*-neuron animals (right columns) supplemented with M9 (vehicle) or 150 μ M glutamate. The mean value of fluorescence in control animals supplemented with M9 was set to 1. All values are reported as the mean of 3 independent experiments $\pm$ SEM, >20 animals/condition, ns, not significant (two-tailed Student's *t*-test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

There are limitations in our study mainly linked to constraints imposed by our model. For example, although we partially respond to the question, we were not able to fully elucidate the mechanistic details through which glutamate triggers the increase of the proteasome activity in the muscle. This is mainly due to the fact that in *C. elegans* it is virtually impossible to isolate and analyse the different involved tissues in order to understand tissue-specific dysregulation in an inter-tissue communication context. Finally, we cannot investigate the role of the nervous system in the regulation of the proteasome activity of the muscle under more physiological conditions, i.e. in the absence of *pbs-5* OE. This would suggest the comparison of wt nematodes to mutants for the genes we have identified as responsible for the distal communication, i.e. *unc-64* and *unc-13*. Since these mutants have severe feeding defects (reduced pharyngeal pumping), this comparison is not adequate as these defects may significantly affect the proteasome activity. Nevertheless, our results emphasize on functional insights and are important for potential future applications.

In this study, we show that cell non-autonomous proteasome activation can contribute to anti-proteotoxic effects in nematode models for $\text{A}\beta$ toxicity. This could be a common regulatory mechanism in other metazoans, as well as in other protein aggregation-related diseases. This point is of particular significance as it demonstrates how cell non-autonomous proteostasis regulation can have a functional outcome in distal tissues. It is highly important since various neurodegenerative diseases are rarely restrained to a single tissue and are rather accompanied by peripheral maladies exhibited as metabolic alterations and deficiencies in non-neuronal tissues [75,76]. Deciphering this cell non-autonomous communication further in invertebrates along with complementary studies in vertebrates, may have serious implications in the design of tissue-specific proteasome manipulation strategies with therapeutic interest. Our results may contribute significantly to the optimization of proteostatic manipulation to fight proteinopathies through tissue-targeting. It is however also important to reveal all the potential cell non-autonomous affected aspects of proteostatic mechanisms, not only to optimize a tissue-specific manipulation *per se* but also to guarantee that one takes into account all the anticipated side effects, whether positive or negative. Moreover, the identification of the proteasome cell non-autonomous regulation may affect the translation of results of groups working in various fields where the proteasome is affected or manipulated, including the cancer and malaria fields where proteasome inhibition is aimed and tissue-specific manipulation is targeted as anti-cancer and anti-malaria therapeutic avenues, respectively. Finally, our results are also important for physiological processes in which the proteasome and its manipulation are important such as ageing. In total, our study provides the context for elucidating the precise mechanism through which cell non-autonomous proteasome regulation occurs and indicates potential tissue-specific avenues against, but not exclusively, proteinopathies.

5. Conclusions

Our study demonstrates that proteasome activation in the nervous system can enhance the proteasome activity in the muscle of *C. elegans*, thus revealing for the first time a cell non-autonomous regulation of the proteasome function. We show that this distal communication is mediated through SCVs and glutamate. More importantly, we demonstrate that this cell non-autonomous proteasome activation results in effective prevention of the human $\text{A}\beta$ -mediated proteotoxicity in the distal tissue (muscle). Notably, this distal effect does not apply to all kinds of stress since neuronal proteasome activation did not confer resistance to oxidative stress. These distal effects should be considered when designing tissue-specific interventions targeting the proteasome as they might dampen the effects that are anticipated through the tissue-specific manipulation.

Author contributions

NC conceived the idea. AG and NC conceptualized and designed the work. AG and DB designed the constructs for *pbs-5* overexpression. EP and AG performed experiments and analyzed the data. EP, AG and NC interpreted the data. AG and NC prepared the first manuscript and all authors reviewed and edited the text. AG and NC supervised the work.

Declaration of competing interest

None.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

Nematode strains used in this study were provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC) which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We are grateful to Prof. Guy A. Caldwell for the UA198 strain and to Dr. Carina I. Holmberg for the ZsProSensor-1 strains. EP was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) under the HFRI PhD Fellowship grant (Fellowship Number: 1540) (salaries only). With the exception of the HFRI PhD Fellowship grant to EP, this research did not receive any other specific grant from funding agencies in the public, commercial, or, not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102817>

References

- [1] W.E. Balch, R.I. Morimoto, A. Dillin, J.W. Kelly, Adapting proteostasis for disease intervention, *Science* (New York, N.Y.) 319 (5865) (2008) 916–919, <https://doi.org/10.1126/science.1141448>.
- [2] R.C. Taylor, A. Dillin, Aging as an event of proteostasis collapse, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3 (5) (2011), a004440, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004440>.
- [3] M. Lefaki, N. Papaevgeniou, N. Chondrogianni, Redox regulation of proteasome function, *Redox Biol.* 13 (2017) 452–458, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.005>.
- [4] G.A. Collins, A.L. Goldberg, The logic of the 26S proteasome, *Cell* 169 (5) (2017) 792–806, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>.
- [5] N. Chondrogianni, I. Petropoulos, S. Grimm, K. Georgila, B. Catalgol, B. Friguet, T. Grune, E.S. Gonos, Protein damage, repair and proteolysis, *Mol. Aspect. Med.* 35 (2014) 1–71, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>.
- [6] B. Boland, W.H. Yu, O. Corti, B. Mollereau, A. Henriques, E. Bezard, G.M. Pastores, D.C. Rubinstein, R.A. Nixon, M.R. Duchon, G.R. Mallucci, G. Kroemer, B. Levine, E.-L. Eskelinen, F. Mochel, M. Spedding, C. Louis, O.R. Martin, M.J. Millan, Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (9) (2018) 660–688, <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.109>.
- [7] E. Njomen, J.J. Tepe, Proteasome activation as a new therapeutic approach to target proteotoxic disorders, *J. Med. Chem.* 62 (14) (2019) 6469–6481, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00101>.
- [8] S.E. Chocron, E. Munkácsy, S.K. Harper, P. Karpowicz, N. Jiang, C. Van Skike, N. DeRosa, A.Q. Banh, J.P. Palavicini, P. Witlyk, L. Kalinowski, V. Galvan, P. A. Osmulski, E. Jankowska, M. Gaczynska, A.M. Pickering, Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models, *Sci. Adv.* 8 (23) (2022) eabk2252, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk2252>.
- [9] N. Chondrogianni, C. Tzavelas, A.J. Pemberton, I.P. Nezis, A.J. Rivett, E.S. Gonos, Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates, *J. Biol. Chem.* 280 (12) (2005) 11840–11850, <https://doi.org/10.1074/jbc.M413007200>.
- [10] N. Chondrogianni, K. Georgila, N. Kourtis, N. Tavernarakis, E.S. Gonos, 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*, *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J. : Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29 (2) (2015) 611–622, <https://doi.org/10.1096/fj.14-252189>.
- [11] N.N. Nguyen, A. Rana, C. Goldman, R. Moore, J. Tai, Y. Hong, J. Shen, D. W. Walker, J.H. Hur, Proteasome $\beta 5$ subunit overexpression improves proteostasis during aging and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*, *Sci. Rep.* (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39508-4>.
- [12] D. Vilchez, I. Morante, Z. Liu, P.M. Douglas, C. Merkwirth, A.P.C. Rodrigues, G. Manning, A. Dillin, RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions, *Nature* 489 (7415) (2012) 263–268, <https://doi.org/10.1038/nature11315>.
- [13] V. Prahlad, T. Cornelius, R.I. Morimoto, Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons, *Science* (New York, N.Y.) 320 (5877) (2008) 811–814, <https://doi.org/10.1126/science.1156093>.
- [14] J. Durieux, S. Wolff, A. Dillin, The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity, *Cell* 144 (1) (2011) 79–91, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.016>.
- [15] Q. Zhang, X. Wu, P. Chen, L. Liu, N. Xin, Y. Tian, A. Dillin, The mitochondrial unfolded protein response is mediated cell-non-autonomously by retromer-dependent Wnt signaling, *Cell* 174 (4) (2018) 870–883.e17, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.029>.
- [16] G. Calcutti, H.J. Lee, K. Shen, U. Pham, M. Herholz, A. Trifunovic, A. Dillin, D. Vilchez, Systemic regulation of mitochondria by germline proteostasis prevents protein aggregation in the soma of *C. elegans*, *Sci. Adv.* 7 (26) (2021), <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg3012>.
- [17] K.M. Berendzen, J. Durieux, L.-W. Shao, Y. Tian, H.-E. Kim, S. Wolff, Y. Liu, A. Dillin, Neuroendocrine coordination of mitochondrial stress signaling and proteostasis, *Cell* 166 (6) (2016) 1553–1563.e10, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.042>.
- [18] S. Imanikia, N.P. Özbek, C. Krueger, M.O. Casanueva, R.C. Taylor, Neuronal XBP-1 activates intestinal lysosomes to improve proteostasis in *C. elegans*, *Curr. Biol. : CB* 29 (14) (2019) 2322–2338.e7, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.031>.
- [19] R.C. Taylor, A. Dillin, XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity, *Cell* 153 (7) (2013) 1435–1447, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.042>.
- [20] J. Minnerly, J. Zhang, T. Parker, T. Kaul, K. Jia, The cell non-autonomous function of ATG-18 is essential for neuroendocrine regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan, *PLoS Genet.* 13 (5) (2017), e1006764, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006764>.
- [21] Yifei Zhou, X. Wang, M. Song, Z. He, G. Cui, G. Peng, C. Dieterich, A. Antebi, N. Jing, Y. Shen, A secreted microRNA disrupts autophagy in distinct tissues of *Caenorhabditis elegans* upon ageing, *Nat. Commun.* 10 (1) (2019) 4827, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12821-2>.
- [22] M. Ulgherait, A. Rana, M. Rera, J. Graniel, D.W. Walker, AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner, *Cell Rep.* 8 (6) (2014) 1767–1780, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.006>.
- [23] A. Moskalev, Z. Guvatova, M. Shaposhnikov, E. Lashmanova, E. Proshkina, L. Koval, A. Zhavoronkov, G. Krasnov, A. Kudryavtseva, The neuronal overexpression of Glc in *Drosophila melanogaster* induces life extension with longevity-associated transcriptomic changes in the thorax, *Front. Genet.* 10 (2019) 149, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00149>.
- [24] S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 77 (1) (1974) 71–94, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4366476>.
- [25] R.S. Kamath, M. Martinez-Campos, P. Zipperlen, A.G. Fraser, J. Ahringer, Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Genome Biol.* 2 (1) (2000), <https://doi.org/10.1186/gb-2000-2-1-research0002> research0002.1.
- [26] B.A. Martinez, H. Kim, A. Ray, G.A. Caldwell, K.A. Caldwell, A bacterial metabolite induces glutathione-tractable proteostatic damage, proteasomal disturbances, and PINK1-dependent autophagy in *C. elegans*, *Cell Death Dis.* 6 (10) (2015), e1908, <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.270>.
- [27] S. Nayak, M. Fiaschi, D. King, E.R. Tabakin, L. Wood, D.A. Hunt, Development of small molecular proteasome inhibitors using a *Caenorhabditis elegans* screen, *Int. J. Med. Chem.* (2014), 237286, <https://doi.org/10.1155/2014/237286>, 2014.
- [28] Z. Altun-Gultekin, Y. Andachi, E.L. Tsalik, D. Pilgrim, Y. Kohara, O. Hobert, A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23*, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C. elegans*, *Development* 128 (11) (2001) 1951–1969, <https://doi.org/10.1242/dev.128.11.1951>.
- [29] E. Munkácsy, E.S. Chocron, L. Quintanilla, C.M. Gendron, S.D. Pletcher, A. M. Pickering, Neuronal-specific proteasome augmentation via Prosβ5 overexpression extends lifespan and reduces age-related cognitive decline, *Aging Cell* (2019), <https://doi.org/10.1111/acel.13005>.
- [30] E.F. Griffin, X. Yan, K.A. Caldwell, G.A. Caldwell, Distinct functional roles of Vps41-mediated neuroprotection in Alzheimer's and Parkinson's disease models of neurodegeneration, *Hum. Mol. Genet.* 27 (24) (2018) 4176–4193, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy308>.
- [31] E.F. Griffin, S.E. Scopel, C.A. Stephen, A.C. Holzhauser, M.A. Vaji, R.A. Tuckey, L. A. Berkowitz, K.A. Caldwell, G.A. Caldwell, ApoE-associated modulation of neuroprotection from β -mediated neurodegeneration in transgenic *Caenorhabditis elegans*, *Disease Models & Mechanisms* 12 (2) (2019), <https://doi.org/10.1242/dmm.037218>.
- [32] O. Matilainen, S. Jha, C.I. Holmberg, Fluorescent tools for in vivo studies on the ubiquitin-proteasome system, *Methods Mol. Biol.* 1449 (2016) 215–222, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3756-1_12.
- [33] C.D. Link, A. Taft, V. Kapulkin, K. Duke, S. Kim, Q. Fei, D.E. Wood, B.G. Sahagan, Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model, *Neurobiol. Aging* 24 (3) (2003) 397–413, [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00224-5](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00224-5).
- [34] G. McColl, B.R. Roberts, T.L. Pukala, V.B. Kenche, C.M. Roberts, C.D. Link, T. M. Ryan, C.L. Masters, K.J. Barnham, A.I. Bush, R.A. Cherny, Utility of an improved model of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.* 7 (2012) 57, <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-57>.
- [35] K.B. Kim, J. Myung, N. Sin, C.M. Crews, Proteasome inhibition by the natural products epoxomicin and dihydroeponepinin: insights into specificity and potency, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (23) (1999) 3335–3340, [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(99\)00612-5](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(99)00612-5).
- [36] H. Lin, Y. Gao, C. Zhang, B. Ma, M. Wu, X. Cui, H. Wang, Autophagy regulation influences β -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*, *Front. Aging Neurosci.* 14 (2022), 885145, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.885145>.
- [37] M.A. Rahman, M.D.H. Rahman, A.N.M. Mamun-Or-Rashid, H. Hwang, S. Chung, B. Kim, H. Rhim, Autophagy modulation in aggregate formation: emerging implications and treatments of Alzheimer's disease, *Biomedicines* 10 (5) (2022), <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051027>.
- [38] V.I. Korolchuk, F.M. Menzies, D.C. Rubinsztajn, Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 584 (7) (2010) 1393–1398, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.047>.
- [39] H.C. Chapin, M. Okada, A.J. Merz, D.L. Miller, Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*, *Aging* 7 (6) (2015) 419–434, <https://doi.org/10.18632/aging.100765>.
- [40] D.A. Butterfield, A.M. Swomley, R. Sultana, Amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression, *Antioxidants Redox Signal.* 19 (8) (2013) 823–835, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5027>.
- [41] H.J. Forman, H. Zhang, Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (9) (2021) 689–709, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.
- [42] I. Korovila, M. Hugo, J.P. Castro, D. Weber, A. Höhn, T. Grune, T. Jung, Proteostasis, oxidative stress and aging, *Redox Biol.* 13 (2017) 550–567, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.008>.
- [43] A.M. Pickering, A.L. Koop, C.Y. Teoh, G. Ermak, T. Grune, K.J.A. Davies, The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 α proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes, *Biochem. J.* 432 (3) (2010) 585–594, <https://doi.org/10.1042/BJ20100878>.
- [44] A.M. Pickering, T.A. Staab, J. Tower, D. Sieburth, K.J.A. Davies, A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*, *J. Exp. Biol.* 216 (Pt 4) (2013) 543–553, <https://doi.org/10.1242/jeb.074757>.
- [45] N.W. Kahn, S.L. Rea, S. Moyle, A. Kell, T.E. Johnson, Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*, *Biochem. J.* 409 (1) (2008) 205–213, <https://doi.org/10.1042/BJ20070521>.

- [46] X. Li, O. Matilainen, C. Jin, K.M. Glover-Cutter, C.I. Holmberg, T.K. Blackwell, Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity, *PLoS Genet.* 7 (6) (2011), e1002119, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002119>.
- [47] R.P. Oliveira, J. Porter Abate, K. Dilks, J. Landis, J. Ashraf, C.T. Murphy, T. K. Blackwell, Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf, *Aging Cell* 8 (5) (2009) 524–541, <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00501.x>.
- [48] J. Richmond, Synaptic function, in: E.M. Jorgensen, J.M. Kaplan (Eds.), *WormBook, The C. elegans Research Community, WormBook*, 2007, <https://doi.org/10.1895/wormbook>.
- [49] F. Calahorra, P.G. Izquierdo, The presynaptic machinery at the synapse of *C. elegans*, *Invertebr. Neurosci.* 18 (2) (2018) 4, <https://doi.org/10.1007/s10158-018-0207-5>.
- [50] C.-W. Tien, B. Yu, M. Huang, K.P. Stepien, K. Sugita, X. Xie, L. Han, P.P. Monnier, M. Zhen, J. Rizo, S. Gao, S. Sugita, Open syntaxin overcomes exocytosis defects of diverse mutants in *C. elegans*, *Nat. Commun.* 11 (1) (2020) 5516, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19178-x>.
- [51] S. Speese, M. Petrie, K. Schuske, M. Ailion, K. Ann, K. Iwasaki, E.M. Jorgensen, T.F. J. Martin, UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*, *J. Neurosci.* 27 (23) (2007) 6150, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1466-07.2007>. LP – 6162.
- [52] L. Hong, H.-C. Huang, Z.-F. Jiang, Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease, *Neurol. Res.* 36 (3) (2014) 276–282, <https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000288>.
- [53] W. Zhang, C. Xu, J. Sun, H.-M. Shen, J. Wang, C. Yang, Impairment of the autophagy-lysosomal pathway in Alzheimer's diseases: pathogenic mechanisms and therapeutic potential, *Acta Pharm. Sin. B* 12 (3) (2022) 1019–1040, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.01.008>.
- [54] N.S. Ilyinsky, S.V. Nesterov, E.I. Shestoperova, A.V. Fonin, V.N. Uversky, V. I. Gordeliy, On the role of normal aging processes in the onset and pathogenesis of diseases associated with the Abnormal accumulation of protein Aggregates, *Biochemistry. Biokhimiia* 86 (3) (2021) 275–289, <https://doi.org/10.1134/S0006297921030056>.
- [55] J.R. Daniele, R. Higuchi-Sanabria, J. Durieux, S. Monshietehadi, V. Ramachandran, S.U. Tronnes, N. Kelet, M. Sanchez, M.G. Metcalf, G. Garcia, P.A. Frankino, C. Benitez, M. Zeng, D.J. Esping, L. Joe, A. Dillin, UPR(ER) promotes lipophagy independent of chaperones to extend life span, *Sci. Adv.* 6 (1) (2020), <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1441> eaaz1441.
- [56] M. Rai, Z. Coleman, M. Curley, A. Nityanandam, A. Platt, M. Robles-Murguia, J. Jiao, D. Finkelstein, Y.-D. Wang, B. Xu, Y. Fan, F. Demontis, Proteasome stress in skeletal muscle mounts a long-range protective response that delays retinal and brain aging, *Cell Metabol.* 33 (6) (2021) 1137–1154.e9, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.005>.
- [57] N.F. Bence, R.M. Sampat, R.R. Kopito, Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation, *Science (New York, N.Y.)* 292 (5521) (2001) 1552–1555, <https://doi.org/10.1126/science.292.5521.1552>.
- [58] T.A. Thibadeau, R.T. Anderson, D.M. Smith, A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers, *Nat. Commun.* 9 (1) (2018) 1097, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03509-0>.
- [59] N. Papaevgeniou, M. Sakellari, S. Jha, N. Tavernarakis, C.I. Holmberg, E.S. Gonos, N. Chondrogianni, 18 α -Glycyrrhetic acid proteasome activator decelerates aging and Alzheimer's disease progression in *Caenorhabditis elegans* and neuronal cultures, *Antioxidants Redox Signal.* 25 (16) (2016) 855–869, <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6494>.
- [60] M.A. Vasilopoulou, A. Gioran, M. Theodoropoulou, A. Koutsaviti, V. Roussis, E. Ioannou, N. Chondrogianni, Healthspan improvement and anti-aggregation effects induced by a marine-derived structural proteasome activator, *Redox Biol.* 56 (2022), 102462, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102462>.
- [61] S. Kapeta, N. Chondrogianni, E.S. Gonos, Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 285 (11) (2010) 8171–8184, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031575>.
- [62] A.N. Mladenovic Djordjevic, M. Kapetanou, N. Loncarevic-Vasiljkovic, S. Todorovic, S. Athanasopoulou, M. Jovic, M. Prvulovic, E. Taoufik, R. Matsas, S. Kanazir, E.S. Gonos, Pharmacological intervention in a transgenic mouse model improves Alzheimer's-associated pathological phenotype: involvement of proteasome activation, *Free Radical Biol. Med.* 162 (2021) 88–103, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.038>.
- [63] J.L. Sun-Wang, S. Ivanova, A. Zorzano, The dialogue between the ubiquitin-proteasome system and autophagy: implications in ageing, *Ageing Res. Rev.* 64 (2020), 101203, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101203>.
- [64] S. Jha, C.I. Holmberg, Tissue-specific impact of autophagy genes on the ubiquitin-proteasome system in *C. elegans*, *Cells* 9 (8) (2020), <https://doi.org/10.3390/cells9081858>.
- [65] S.A. Keith, S.K. Maddux, Y. Zhong, M.N. Chinchankar, A.A. Ferguson, A. Ghazi, A. L. Fisher, Graded proteasome dysfunction in *Caenorhabditis elegans* activates an adaptive response involving the conserved SKN-1 and ELT-2 transcription factors and the autophagy-lysosome pathway, *PLoS Genet.* 12 (2) (2016), e1005823, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005823>.
- [66] L. Wrobel, S.M. Hill, A. Djajadikerta, M. Fernandez-Estevez, C. Karabiyyik, A. Ashkenazi, V.J. Barratt, E. Stamatakou, A. Gunnarsson, T. Rasmussen, E. W. Miele, N. Beaton, R. Bruderer, Y. Feng, L. Reiter, M.P. Castaldi, R. Jarvis, K. Tan, R.W. Bürli, D.C. Rubinsztein, Compounds activating VCP D1 ATPase enhance both autophagic and proteasomal neurotoxic protein clearance, *Nat. Commun.* 13 (1) (2022) 4146, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31905-0>.
- [67] A.E. Frakes, M.G. Metcalf, S.U. Tronnes, R. Bar-Ziv, J. Durieux, H.K. Gildea, N. Kandahari, S. Monshietehadi, A. Dillin, Four glial cells regulate ER stress resistance and longevity via neuropeptide signaling in *C. elegans*, *Science (New York, N.Y.)* 367 (6476) (2020) 436–440, <https://doi.org/10.1126/science.aaz6896>.
- [68] N.A. Bishop, L. Guarente, Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*, *Nature* 447 (7144) (2007) 545–549, <https://doi.org/10.1038/nature05904>.
- [69] C.A. Wolkow, K.D. Kimura, M.S. Lee, G. Ruvkun, Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system, *Science (New York, N.Y.)* 290 (5489) (2000) 147–150, <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.147>.
- [70] R. Higuchi-Sanabria, J. Durieux, N. Kelet, S. Homentcovschi, M. de Los Rios Rogers, S. Monshietehadi, G. Garcia, S. Dallarda, J.R. Daniele, V. Ramachandran, A. Sahay, S.U. Tronnes, L. Joe, A. Dillin, Divergent nodes of non-autonomous UPR (ER) signaling through serotonergic and dopaminergic neurons, *Cell Rep.* 33 (10) (2020), 108489, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108489>.
- [71] H.-Y. He, A. Ahsan, R. Bera, N. McLain, R. Faulkner, K.V. Ramachandran, S. S. Margolis, H.T. Cline, Neuronal membrane proteasomes regulate neuronal circuit activity in vivo and are required for learning-induced behavioral plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 120 (3) (2023), e2216537120, <https://doi.org/10.1073/pnas.2216537120>.
- [72] K.V. Ramachandran, S.S. Margolis, A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (4) (2017) 419–430, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3389>.
- [73] Y. Zhou, N.C. Danbolt, Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain, *J. Neural. Transm.* 121 (8) (2014) 799–817, <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>. Vienna, Austria : 1996.
- [74] S. Magi, S. Piccirillo, S. Amoroso, V. Lariccia, Excitatory amino acid transporters (EAATs): glutamate transport and beyond, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (22) (2019), <https://doi.org/10.3390/ijms20225674>.
- [75] H. Iliev, M. Polymenidou, D.W. Cleveland, Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond, *J. Cell Biol.* 187 (6) (2009) 761–772, <https://doi.org/10.1083/jcb.200908164>.
- [76] S.A. Liddelow, Modern approaches to investigating non-neuronal aspects of Alzheimer's disease, *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J. : Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33 (2) (2019) 1528–1535, <https://doi.org/10.1096/fj.201802592>.

We Are What We Eat: Ubiquitin–Proteasome System (UPS) Modulation Through Dietary Products

15

Eleni Panagiotidou and Niki Chondrogianni

Abstract

During lifetime, the molecular mechanisms that are responsible for cellular defense against adverse conditions such as oxidative and heat stress tend to be less efficient, thus gradually leading to the natural phenomenon of aging. Aging is linked to increased oxidative stress and is characterized by the accumulation of damaged macromolecules. The accumulation of oxidized and misfolded proteins is also accusable for various neurodegenerative pathologies that are linked to aging. Among self-defense mechanisms of cells, proteostasis network is responsible for the proper biogenesis/folding/trafficking of proteins and their elimination through proteolysis. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major proteolytic mechanism that has attracted the interest of many researchers as an antiaging target. Interestingly, many natural compounds have been identified as potent UPS activators. Given that diet is a manageable environmental factor that affects aging, consumption of natural dietary products that may

potentially enhance the UPS function, would contribute to increased health span and delayed onset or progression of age-related disorders. Herein, we summarize natural compounds and extracts derived from edible products that have exhibited antiaging and anti-aggregation properties and the beneficial properties have been linked to the UPS modulation.

Keywords

Ubiquitin–proteasome system (UPS) · Proteasome modulation · Aging · Age-related diseases · Dietary compounds

Abbreviations

A β	Amyloid β
AD	Alzheimer's disease
ALP	Autophagy-lysosome pathway
APP	Amyloid precursor protein
C-L	Caspase-like
CP	Core proteasome
CT-L	Chymotrypsin-like
DUB	Deubiquitinating enzymes/deubiquitinases
D3T	3H-1,2dithiole-3-thione
EVOO	Extra virgin olive oil
GHE	Guarana hydroalcoholic extract
HD	Huntington's disease
HGPS	Hutchinson-Gilford progeria syndrome

E. Panagiotidou
Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Department of Biochemistry and Biotechnology,
University of Thessaly, Larissa, Greece
e-mail: epanagiotidou@eie.gr

N. Chondrogianni (✉)
Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece
e-mail: nikichon@eie.gr

© Springer Nature Switzerland AG 2020

R. Barrio et al. (eds.), *Proteostasis and Disease*, Advances in Experimental Medicine and Biology 1233,
https://doi.org/10.1007/978-3-030-38266-7_15

329

HSP	Heat shock protein
HTT	Huntingtin
NHDF	Normal human dermal fibroblasts
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PD	Parkinson's disease
PDMs	Polyphenol digested metabolites
PKA	Protein kinase A
PolyQ	Polyglutamine
RP	Regulated particle
UPS	Ubiquitin-proteasome system
T-L	Trypsin-like
6-OHDA	6-hydroxydopamine
18 α -GA	18 α -glycyrrhetic acid

15.1 Introduction

Protein integrity is vital for the normal function of all cell types. To maintain a healthy proteome, cells have developed a protein quality control system which is crucial for cell metabolism and stress adaptation. The proteostasis network is responsible for: (a) protein synthesis, stabilization, folding mostly by chaperons of the heat shock protein (HSP) family and trafficking, and (b) protein degradation mainly through the ubiquitin–proteasome system (UPS) and the autophagy–lysosome pathway (ALP) [1, 2]. Molecular chaperons recognize misfolded protein species and if the repair is impossible, they cooperate with the proteolytic systems favoring the degradation of these proteins [3, 4]. Attenuation of proteostasis mechanisms is linked to aging and is considered as one of the hallmarks of aging [5, 6]. Moreover, impaired function of proteostasis has also been reported in various age-related disorders such as Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD) and Huntington's (HD) diseases which are characterized by chronic expression of misfolded or aggregated proteins [7].

The average life expectancy has progressively elevated in the last decades. Subsequently, the development of age-related disorders has ensued this rapid increase. Aging and age-related

neurodegeneration have been associated with increased oxidative stress but also with nutrients and their metabolites that may alleviate these toxic processes, playing a pivotal role in the battle against organismal time decline [8]. For example, a plethora of studies gives prominence to the antiaging properties of polyphenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, stilbenes, lignans) [9]. Given that these substances mainly contribute to plant protection from adverse environmental conditions through their antioxidant activities, it is possible to be effective as antiaging factors in mammalian cells as well [10]. These compounds can be easily isolated from plants and are included in daily nutritional products like fruits, vegetables, and cereals.

Among the proteostasis mechanisms, the UPS system has been extensively investigated for its involvement in aging and age-related disorders [11]. Due to its capacity to degrade prone-to-aggregation proteins and oxidatively damaged proteins, UPS activation by natural or synthetic substances consists a desirable strategy against aging and aggregation-related disorders [12–14].

Herein, we review natural compounds that have been shown to positively affect the UPS and to exert beneficial properties against aging and age-related disorders. The reported substances can be found in edible natural products that we daily consume in the context of a normal nutrition or in dietary supplements.

15.2 The UPS System

The UPS is a key player for the degradation of short-lived, misfolded, and damaged proteins and under normal conditions it is involved in cell cycle progression, apoptosis, and cell proliferation, among others [15]. The proteasome is a large multi-subunit enzymatic complex that is the core of the UPS system catalyzing the ATP/ubiquitin-dependent and independent proteolysis (Fig. 15.1) [16, 17].

Ubiquitin is a conserved protein that modifies and tags proteins for degradation through the

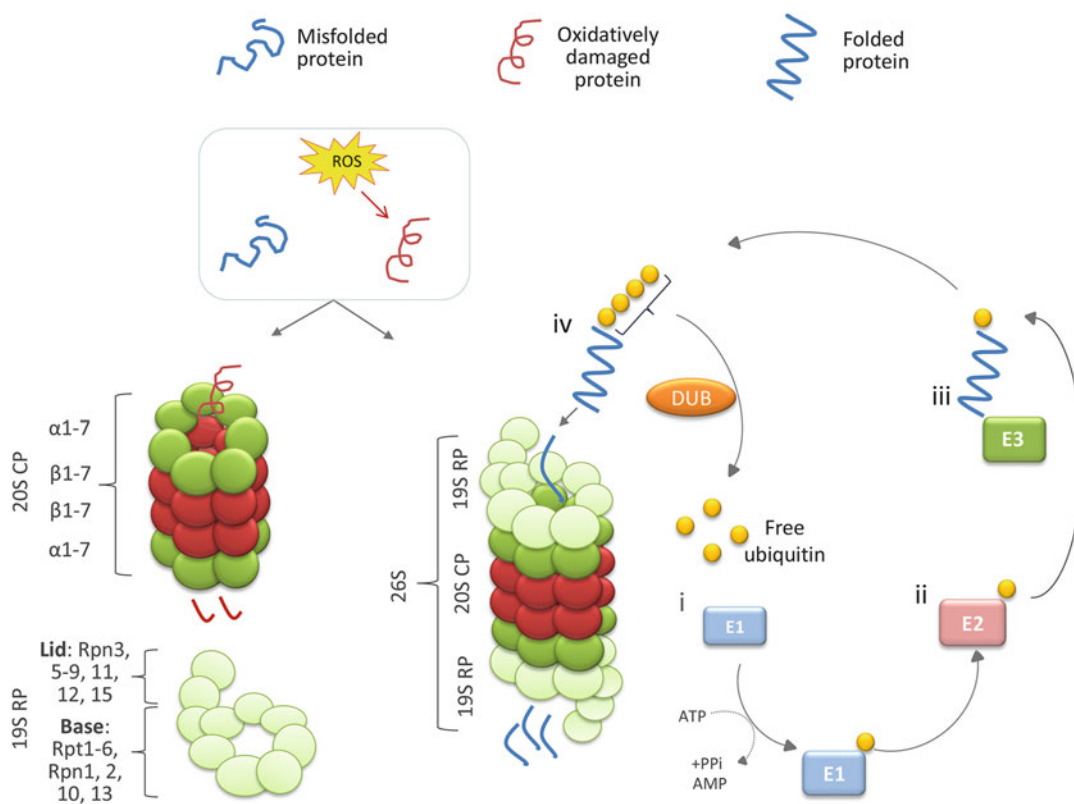


Fig. 15.1 The UPS system. Misfolded, oxidatively damaged or normally folded proteins are degraded in an ATP/ubiquitin-dependent or independent manner by the 26S and 20S proteasomes, respectively

ubiquitination process which includes three steps. (i) The E1 ubiquitin-activating enzyme activates the ubiquitin which (ii) is transferred to E2 ubiquitin-conjugating enzyme. Subsequently, the ubiquitin-charged E2 binds to (iii) the E3 ubiquitin-ligase enzyme which catalyzes the final step of ubiquitination. E3 ligase carries the substrate for degradation and thus ubiquitin is transferred to the substrate. This cycle is repeated and results in the poly-ubiquitination of the target protein which in turn (iv) is recognized and degraded by the 26S proteasome followed by the release of the ubiquitin molecules (through the action of deubiquitinases) to be reused [17].

The 26S/30S (referred to 26S proteasome hereafter) proteasome is formed following the capping of the 20S core proteasome (CP) by one (26S) or two (30S) 19S regulated particles (RP) and is mostly responsible for the degradation of

ubiquitinated proteins. The 20S proteasome is composed of 28 subunits (14- α type and 14- β type). The 20S subunits form four rings with seven subunits of the same type per two rings in a barrel-like structure. The two inner rings are formed by β subunits ($\beta 1-7$) and exert proteolysis through $\beta 1$ (caspase-like/C-L), $\beta 2$ (trypsin-like/T-L), and $\beta 5$ (chymotrypsin-like/CT-L) subunits. The two outer rings are formed by α -type subunits and create a gated channel through which the protein substrate reaches the three catalytic centers [18]. The 19S RP consists of two sub-complexes: the lid that consists of nine subunits (Rpn3, Rpn 5-Rpn9, Rpn11, Rpn12, and Rpn15) and the base, which interacts directly with the 20S core and is composed of hexameric AAA-ATPases (Rpt1-6) and tetrameric non-ATP-ases namely Rpn1, Rpn2, Rpn10, and Rpn13. Rpn11 subunit possesses deubiquitination activity while Rpn3 and Rpn10

Table 15.1 Human genes that encode the 26S/30S and 20S proteasome subunits

20S CP				19S RP			
α subunits	Gene	β subunits	Gene	Base subunits	Gene	Lid subunits	Gene
$\alpha 6$	PSMA1	$\beta 1$	PSMB6	Rpt1	PSMC2	Rpn3	PSMD3
$\alpha 2$	PSMA2	$\beta 2$	PSMB7	Rpt2	PSMC1	Rpn5	PSMD12
$\alpha 7$	PSMA3	$\beta 3$	PSMB3	Rpt3	PSMC4	Rpn6	PSMD11
$\alpha 3$	PSMA4	$\beta 4$	PSMB2	Rpt4	PSMC6	Rpn7	PSMD6
$\alpha 5$	PSMA5	$\beta 5$	PSMB5	Rpt5	PSMC3	Rpn8	PSMD7
$\alpha 1$	PSMA6	$\beta 6$	PSMB1	Rpt6	PSMC5	Rpn9	PSMD13
$\alpha 4$	PSMA7	$\beta 7$	PSMB4	Rpn1	PSMD2	Rpn11	PSMD14
				Rpn2	PSMD1	Rpn12	PSMD8
				Rpn10	PSMD4	Rpn15	SEM1
				Rpn13	ADRM1		

serve as ubiquitin receptors [19, 20] (Table 15.1). In the 26S proteasome ubiquitin-ATP-dependent proteolysis, proteins tagged with ubiquitin are recognized by Rpn3 and Rpn10 receptors and deubiquitinating enzymes (DUB) like Rpn11, USP14, and UCH37 remove the ubiquitin tag [21]. Subsequently, the base of the 19S complex unfolds the protein and promotes it to the catalytic centers for degradation [22]. On the other hand, the 20S proteasome has been suggested to promote the degradation of unfolded and oxidized proteins in an ATP-independent manner and does not require poly-ubiquitination of target proteins and 19S-mediated protein unfolding [16] (Fig. 15.1).

15.3 Proteasome Activation

Proteasome activation is feasible through genetic manipulation, post-translational modifications of specific proteasome subunits, or conformational alterations of the 20S core structure [14]. Treatment with specific compounds (including some that are part of our diet) can also modulate the expression and/or the function of the proteasome and they will be further presented below (Fig. 15.2).

The transcription factor Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) is the key response factor against oxidative stress that regulates the induction of the expression of various antioxidant enzymes [23]. A cross talk between Nrf2 and the proteasome has been reported and several studies have shown that Nrf2 is able to modulate the 20S and 19S gene expression following oxidative

stress or dietary Nrf2 modulation [24, 25]. Apart from Nrf2, Rpn4 is another transcription factor in yeast that has been shown to regulate proteasome biogenesis. Under normal conditions, Rpn4 is short lived and rapidly degraded by the proteasome. However, upon proteasome inhibition following proteotoxic stress, Rpn4 is stabilized to upregulate the expression of proteasome genes. With regard to genetic manipulation of the proteasome, we have previously demonstrated that stable overexpression of the $\beta 5$ catalytic subunit or the hUPM1/POMP chaperone in human fibroblasts may induce all three proteasomal activities [26, 27], while PSMD11 (RPN-6 in *C. elegans*) has also been shown to be correlated with increased proteasome assembly and activity [123, 124].

Proteasome activation has also been succeeded through post-translational modifications such as phosphorylation. 26S upregulation has been achieved through cAMP-dependent protein kinase A (PKA) phosphorylation of the Rpt6 proteasome subunit [28]. Moreover, PKA-mediated phosphorylation of Rpn6 has been shown to enhance the degradation of ubiquitinated proteins [29]. Additionally, inhibition of the proteasome deubiquitinases such as USP14 and UCH37 resulted in elevated proteasome activities [30]. Finally, various peptides and compounds have been shown to favor proteasome function through conformational alterations that mainly affect the α -gated channel of the 20S core. Molecules that modulate 20S and/or 26S proteasome function are known as gate-openers or stimulators [14].

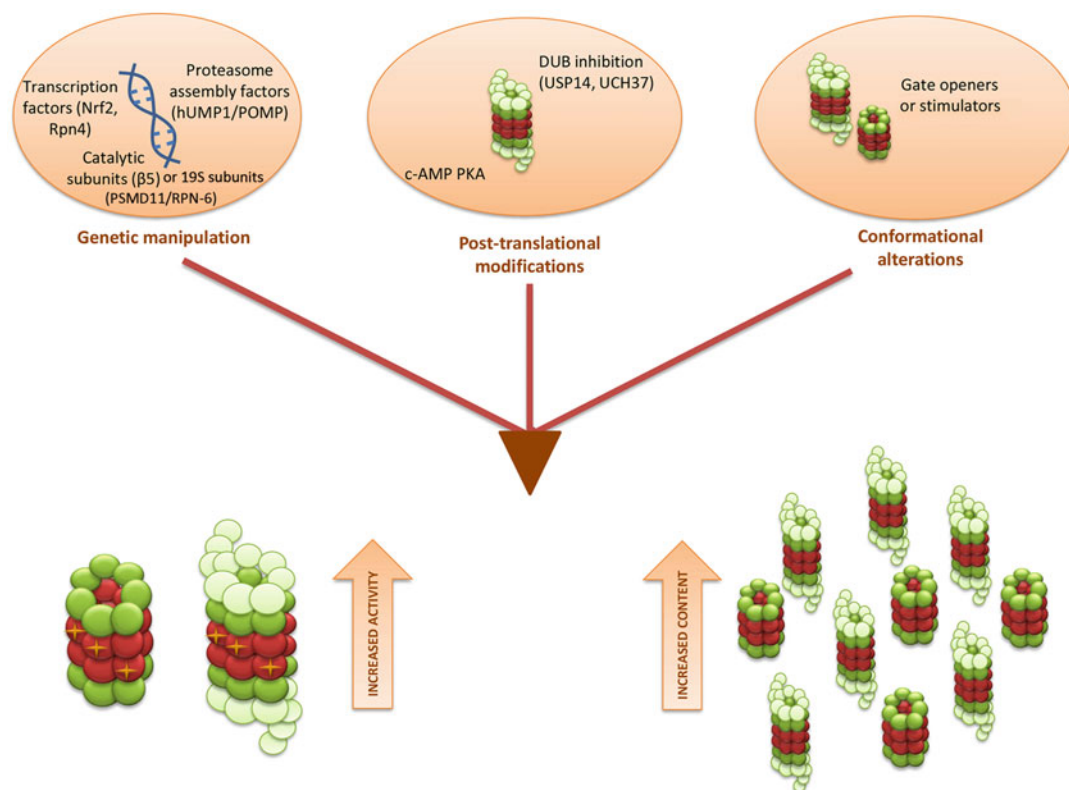


Fig. 15.2 Proteasome activation. Increased proteasome activity or content may occur through genetic manipulation, post-translational modifications, and conformational alterations. Natural or synthetic compounds can modulate

proteasome activity and function either directly as stimulators or through modulation of molecules responsible for proteasome activation

15.4 UPS Modulation in Aging and Neurodegenerative Diseases

Aging is a natural decline of the organism and its function during lifetime affects, in several rhythms, almost whole animal and plant kingdoms. This natural process is characterized by the attenuation of self-defense mechanisms and the decline of homeostatic mechanisms. Impairment of proteostasis has been associated with aging and results in reduced capacity of cells to repair misfolded or damaged proteins or to remove them through degradation pathways [31]. Proteasome activation has been shown to decelerate aging *in vivo* and *in vitro* [32]. The accumulation of misfolded proteins also characterizes many neurodegenerative disorders

that are linked to aging such as AD, HD, PD, and Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS).

AD is the most common cause of dementia and is characterized by loss of synaptic connections and brain atrophy. The accumulation of amyloid β ($A\beta$) plaques and hyper-phosphorylated Tau protein in neurofibrillary tangles are distinctive AD features [33]. $A\beta$ is formed by the Amyloid Precursor Protein (APP) when the latter is cleaved by β - and γ -secretases. The proteasome is one of the major agents for $A\beta$ metabolism, albeit the $A\beta$ aggregates lead to proteasome impairment resulting in accumulation of aggregates in a vicious cycle [34]. Additionally, the E3 ubiquitin ligase HRD1 and the deubiquitinase UCHL-1 are downregulated during AD further highlighting the importance of UPS restoration in this disorder [35, 36].

Huntingtin (HTT) is the most involved protein in HD pathogenesis. Mutations in *HTT* gene are related to expansion of the CAG triplet resulting in a polyglutamine (polyQ) tract in the N-terminus of the HTT protein [37]. Like in other proteinopathies, there is evidence of the UPS implication in HD. Mutations in ubiquitin UBB⁺, PARKIN, NHLRC1 (an E3 ubiquitin ligase), and reduction of E1 and E2 ubiquitin enzyme activities along with 26S proteasome inhibition by HTT are characteristic alterations that lead to the UPS impairment in HD [38, 39].

PD is characterized by the accumulation of Lewy bodies (eosinophilic intracytoplasmic inclusions); α -synuclein is the main component [40]. α -synuclein has been shown to impede both the 20S and 26S proteasome function [41]. Moreover PARKIN, an E3 ligase, is the second most involved protein in PD pathology. PARKIN has been shown to enhance the interaction between 19S proteasome subunits underlining the importance of this ligase on the 26S proteasome activation [42]. PARKIN is affected by Lewy bodies that along with PARKIN mutations result in the degradation impairment observed in PD [43, 44].

Finally, progeroid syndromes are genetic conditions characterized by premature aging. Given that aging is accompanied by impairment of proteostatic mechanisms subsequently the UPS may also affect this type of syndromes. HGPS is a genetic condition in which a point mutation in the *LMNA* gene is observed. There are not many studies referring to UPS implication in HGPS; however, the downregulation of $\beta 5$ and $\beta 7$ proteasome subunits and reduction of CT-L proteasome activity have been reported [45]. Therefore, the UPS also appears as an attractive target against HGPS.

15.5 UPS and Diet

Several compounds have been shown to induce the UPS expression and/or function and thus to affect the progression of aging and age-related disorders. These compounds are summarized in the following sections and in Table 15.2.

15.5.1 Aggregation-Related Disorders

Well known for its stimulant activity on the central nervous system, **guarana** (*Paullinia cupana*) is consumed widely in Brazil in high-energy drinks and dietary supplements. Guarana compounds such as polyphenols, caffeine, and other methylxanthines have been associated with its beneficial biological properties which include antioxidant, antimicrobial, and chemopreventive activities in carcinogenesis [75]. Moreover, guarana powder has been shown to prevent A β aggregation in human neuronal-like cells while guarana water extract reduced the formation of polyQ aggregates expressed in *C. elegans*, suggesting a beneficial effect in AD and HD, respectively [76, 77]. According to a recent study, treatment with guarana hydroalcoholic extract (GHE) increased proteasomal and lysosomal activities and reduced intracellular ROS in *C. elegans*. It was also demonstrated that GHE eliminated the toxic phenotypes associated with protein misfolding and accumulation in nematode models of HD and AD. All the data above suggest the contribution of protein degradation mechanisms in GHE-mediated protection against polyQ protein aggregation and A β -induced toxicity [46].

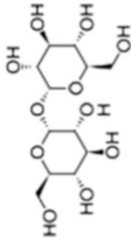
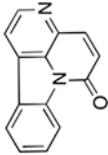
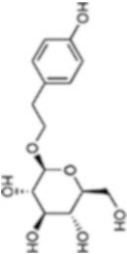
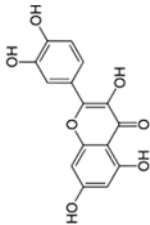
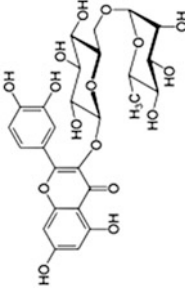
Numerous studies have extensively investigated the pivotal role of the Mediterranean Diet in the prevention of a wide range of age-related pathological conditions [78]. The extra virgin olive oil (EVOO) is one of the most characteristic components of the Mediterranean Diet and it has attracted the interest of many researchers due to its antioxidant and antiaging properties while many of EVOO's ingredients have been proposed as nutraceuticals against AD disease [79, 80]. **Oleocanthal** is one of the EVOO's phenols responsible for its bitter and pungent taste. Many studies demonstrated the potential neuroprotective and anti-aggregation effects of oleocanthal [81–83]. According to a recent study, oleocanthal upregulated the expression of *PSMD1* and *PSMB4* subunits in neuron-like SH-SY5Y cells under stress and normal conditions, suggesting the involvement of oleocanthal in the degradation of misfolded proteins rather than oxidized ones. Moreover, oleocanthal increased

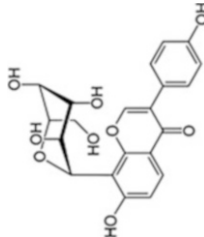
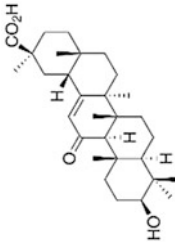
Table 15.2 Natural compounds/extracts that trigger UPS activation and affect aging and/or age-related disorders

Natural compound/ extract	Structure	Source	UPS target	Model	Disorder	References
Guarana hydroalcoholic extract (GHE) ^a		<i>Paulinia cupana</i>	CT-L activity	<i>C. elegans</i> (CL2006, CL4176, AM141)	AD/HD	[46]
Oleocanthal		Extra virgin olive oil (EVOO)	<i>PSMD1, PSMB4</i>	SH-SY5Y cells	AD	[47]
Morin		Leaves of <i>Psidium guajava</i> (guava tea), white mulberry and red wine	26S proteasome	APP695- transfected SH-SY5Y cells	AD	[48]
Isoquercitrin		<i>Mangifera indica</i> (mango), leaves of <i>Ammonia squamosa</i> and <i>Camellia sinensis</i>	26S proteasome	APP695- transfected SH-SY5Y cells	AD	[48]
Resveratrol		Blueberries, raspberries, peanuts, the skin of grapes, red wine, cocoa and various other herbs	Aβ proteasome-dependent reduction CT-L activity, UBA-1 T-L activity	APP695- transfected HEK293 cells <i>C. elegans</i> (CL2006) Mouse (3xTg- AD) (cerebral cortex)	AD	[49–51]

(continued)

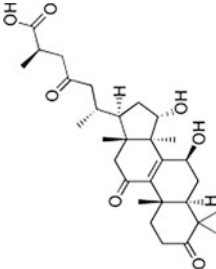
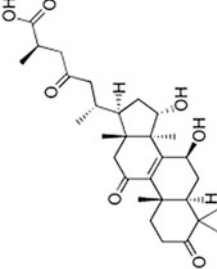
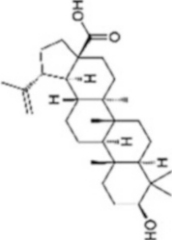
Table 15.2 (continued)

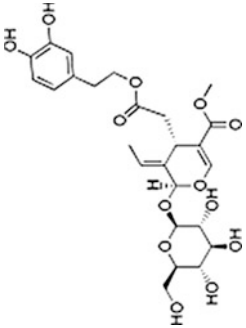
Natural compound/ extract	Structure	Source	UPS target	Model	Disorder	References
Trehalose		Honey, mushrooms, lobsters, shrimps, wine	CT-L activity	Glial cultures from R6/1 mouse model of HD	HD	[52]
Canthin-6-one		Extract of many plants including <i>Zanthoxylum chiloperone</i> , <i>Eurycoma longifolia</i> and <i>Aerva lanata</i>	CT-L activity, <i>Psm1</i>	HD human fibroblasts	PD	[53]
Salidroside		<i>Rhodiola rosea</i>	PARKIN, UCH-L1, CT-L activity	PC12 cells	PD	[54]
Quercetin		Variety of widely consumed products including green tea, honey, red wine, and onions	<i>uba-1</i> , <i>ubq-1</i> , CT-L activity	A30P α -synuclein-transfected SH-SY5Y cells	PD	[55]
Rutin		Variety of plants including citrus fruits	CT-L activity	<i>C. elegans</i> (CL2006)	AD	[56]
			CT-L activity	APP695-transfected SH-SY5Y cells		[57]
			CT-L activity	HFL-1 cells	Aging	[58]
			CT-L activity	mHTT-transfected Neuro2a cells	HD	[59]
Rutin		Variety of plants including citrus fruits	CT-L activity	APP695-transfected SH-SY5Y cells	AD	[57]

Sulforaphane		Cruciferous vegetables	CT-L activity, T-L activity, C-L activity	mHTT-transfected HEK293 cells	HD	[60]
			CT-L activity, PSMC2	Fibroblasts from patients with HGPS	HGPS	[61]
			CT-L activity	hESCs (human embryonic stem cells)	Aging	[62]
Polyphenol digested metabolites (PDMs) from leaves and fruits of <i>Arbutus unedo</i>		<i>Arbutus unedo</i> (strawberry tree)	HRD-1, proteasome function	Yeast cells transformed with α -synuclein	PD	[63]
Ginkgo biloba extract EGb761		Ginkgo biloba	<i>PSMB6</i> , <i>PSMB6</i> , <i>PSMB7</i>	mHTT-transfected HEK293 cells	HD	[64]
Puerarin		<i>Pueraria lobata</i>	CT-L activity	MPP ⁺ -treated SH-SY5Y cells	PD	[65]
18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA)		<i>Glycyrrhiza radix</i>	CT-L activity	<i>C. elegans</i> (CL2006, CL4176, CL2331)	AD	[66]
			CT-L	SH-SY5Y cells exposed to 7PA2-conditioned medium		
			CT-L activity, T-L activity, PBS-5, PAS-1-7, RPT-6	<i>C. elegans</i>	Aging	[66, 67]
			CT-L activity, T-L activity, C-L activity	HFL-1 cells		

(continued)

Table 15.2 (continued)

Natural compound/ extract	Structure	Source	UPS target	Model	Disorder	References
Ganoderic acid DM		Ganoderma mushrooms	Proteasome function	T-REx293 expressing Aβ42-EGFP	AD	[68]
Polysaccharide 5		<i>Rubia cordifolia</i> L.	Proteasome function	T-REx293 expressing Aβ42-EGFP	AD	[68]
3H-1,2dithiole-3-thione (D3T) ^a		Cruciferous vegetables	CT-L activity, T-L activity, C-L activity, PSMA1, PSMA4, PSMB3, PSMB5, PSMB6	Mouse	AD	[69]
Betulinic acid ^a		Many plants including <i>Betula pubescens</i> , <i>Ziziphus mauritiana</i> and <i>Prunella vulgaris</i>	CT-L activity	Purified proteasome	AD	[70]

Oleuropein		Green olives, olive leaves and EVOO	CT-L activity, T-L activity, C-L activity	IMR90, W138 cells	Aging	[71]
Lipoic acid		Broccoli, spinach, tomatoes and brussels sprouts	CT-L activity, PSMB5	NHDF cells	Aging	[72]
Bee pollen extract		Bee pollen	CT-L activity	HFL-1 cells	Aging	[73]
Zinc		Plethora of natural edible products	CT-L activity	Humans (population study)	Aging	[74]

^aCompounds that have demonstrated anti-aggregation properties, but the association, if there is any, between their potency to act as proteasome activators and their contribution in protection against age-related disorders has not been studied yet

HSP90 levels, a chaperone that is essential for proteasome integrity and function [47, 84, 85].

Morin is a flavonol present in guava leaf tea (*Psidium guajava*), white mulberry (*Morus Alba L.*), and red wine. It is known for its antioxidant activity as well for its antiapoptotic and neuroprotective properties [86, 87]. Regarding its neuroprotective effects in AD, morin restricted β - and γ -secretase activities to impede A β aggregation as well as to disaggregate preformed fibrils and to act against H₂O₂-induced stress in APP695-transfected SH-SY5Y cells. In the same cell line, morin positively affected the 26S proteasome activity under H₂O₂ stress conditions. The same results were also produced by another flavonoid namely **isoquercitrin** [48].

The potential therapeutic properties of **resveratrol** including life span extension, neuroprotection, and cytoprotection, foreshadow the potential contribution of this polyphenol in age-related disorders [88, 89]. Resveratrol's effects on neurodegenerative disorders have been studied both in cellular and organismal level in models of AD; the effects on UPS among their positive outcomes have also been investigated [90]. For instance, in APP695-transfected HEK293 cell line, resveratrol reduced A β levels through proteasomal degradation [49]. The same phenotype was reported in *C. elegans*; treatment with resveratrol reduced A β aggregates in CL2006 strain which expresses the human A β 1-42 and paralyzes as A β aggregates accumulate [91]. Reduced A β aggregates have also been linked to proteostasis factors including UBA-1 (the only ubiquitin-activating enzyme in *C. elegans*) and enhanced proteasome activity [50]. Resveratrol was also shown to activate the brain proteasome function in the 3xTg-AD mouse model. Moreover, resveratrol administration enhanced the levels of neprilysin, an amyloid-degrading enzyme and diminished the levels of the amyloidogenic secretase BACE-1 [51]. On top of these effects, the already known effect of resveratrol on deacetylase SIRT1 [92] seems to dictate a preferential degradation of phosphorylated-Tau through enhanced deacetylation of Tau [51]. The abovementioned biochemical alterations led to

ameliorated cognitive behavior and function. Natural sources of resveratrol are blueberries, raspberries, peanuts, the skin of grapes, red wine, cocoa and various other herbs [93].

Trehalose is a disaccharide that is characterized as an autophagy enhancer [94]. During the last decades, many studies have reported the longevity effects of trehalose and its neuroprotective properties against HD [95]. In vivo experiments with mouse models of HD showed that trehalose administration reversed many aspects of pathological phenotype caused by polyQ aggregates [96]. In HD human fibroblasts, trehalose increased proteasome activities and decreased HTT protein levels [53]. Similar results were observed in glial cultures from R6/1 mice [52]. Trehalose is found naturally in honey, mushrooms, lobsters, shrimps, wine, and other edible products.

Canthin-6-one is a natural derived alkaloid that can be isolated by many herbs including the edible plant *Aerva lanata*. In PD cellular models (PC12 cells), canthin-6-one promoted α -synuclein degradation through the UPS. Specifically, this alkaloid promoted the expression of *Psm1* gene by activating PKA, subsequently favoring the UPS activation [54].

Salidroside is a glycoside with antiaging, antioxidant, and neuroprotective properties. In SH-SY5Y cells treated with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), salidroside alleviated pSer129- α -synuclein burden. Additionally, in the same PD model salidroside elevated the protein levels of PARKIN and UCH-L1 which are two of the most involved constituents of UPS in PD. Free ubiquitin protein levels were also increased due to salidroside treatment along with the 20S proteasome activity (CT-L activity). Moreover, treatment with salidroside enhanced 20S proteasome activity in SH-SY5Y cells transfected with A30P α -synuclein [55]. The herb *Rhodiola rosea* is the main source of salidroside. *Rhodiola rosea* is consumed in the form of tea, made from the roots of the plant and it has been used as an antiaging herb in traditional Chinese medicine.

Quercetin is a flavonoid found in many edible products like green tea, onions, and red wine.

Many studies reveal the positive outcome of quercetin in AD in vivo and in vitro [56]. In CL2006 transgenic strain of *C. elegans*, quercetin was able to reduce A β aggregates and the downstream paralysis phenotype. Among the defense mechanisms, quercetin promoted the UPS activation. Restriction of *uba-1* and *ubq-1* expression hindered the protective effects of quercetin against paralysis. The same research group observed enhanced proteasome activity in CL2006 animals treated with quercetin [56]. Proteasome activation by quercetin was also observed in APP695-transfected SH-SY5Y cells [57]. The same action was also revealed for **rutin**, a flavonoid mostly derived from citrus fruits that has the potential to prevent A β aggregation [97]. Both quercetin and rutin target agents related to proteasome activation, like Nrf2 [98]. Finally, in an HD cell line model, quercetin eliminated mHTT aggregates through proteasome activity enhancement [59].

Sulforaphane is an organic compound mainly found in many dietary products like onions, broccoli, cherries, and red grapes as well as in edible products like green tea and red wine. Through its strong antioxidant activity, sulforaphane exerts protective effects against neurodegenerative diseases [99, 100]. In murine neuroblastoma cells, sulforaphane enhanced proteasome activity via the Nrf2 transcription factor leading to elevated expression of proteasome subunits and thus to resistance against oxidative stress [25]. In an HD cellular model (mHTT-transfected HEK293 cells) treatment with sulforaphane enhanced mHTT degradation by the proteasome [60]. Additionally, sulforaphane was also able to induce proteasome activation in fibroblasts derived from patients with HGPS and improved the growth rate of these cells. In the same study, increased levels of HSP27 protein were also reported; sulforaphane has been shown to enhance proteasome activity through upregulation of HSP27 [61, 101].

As mentioned above polyphenols exhibit antioxidant and anti-aggregation activities. Interestingly, a recent study revealed the implication of **polyphenol digested metabolites** (PDMs) in PD [63]. PDMs from leaves and fruits of *Arbutus*

unedo limited α -synuclein aggregates in a yeast model of PD through proteostasis network modulation, including proteasome elevated activity. Moreover, PDMs influenced the transcription levels of HRD-1, an ubiquitin ligase which is induced by unfolded protein response (UPR). HRD-1 recognizes and ubiquitinates misfolded proteins in ER favoring their degradation through the proteasome indicating a cross talk between the UPR and the UPS in the clearance of α -synuclein by PDMs.

Many phenolic acids and flavonoid compounds such as myricetin, quercetin, and kaempferol along with terpenes attribute to **Ginkgo biloba extract** strong antioxidant properties [102]. Treatment of mHTT-transfected HEK293 cells with Ginkgo biloba extract EGb761 was able to decrease the amount of poly-Q proteins. Accordingly, it was reported that EGb761 promotes proteasome activation and elevated transcript levels of *PSMB5*, *PSMB6*, and *PSMB7* subunits [64].

Puerarin is mainly isolated from *Pueraria lobata* and belongs to the isoflavone family. Beverages made by roots of *Pueraria lobata* contain a small number of isoflavones including puerarin. Many studies reveal the positive effects of puerarin in neuronal survival and cytoprotection in PD organismal and cellular models [103, 104]. In 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-treated SH-SY5Y cells, treatment with puerarin increased CT-L activity and lowered the amount of α -synuclein and ubiquitin-conjugated proteins, suggesting the implication of the UPS in puerarin positive results in PD [65].

18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA) is a triterpenoid isolated from *Glycyrrhiza radix*. We have shown that 18 α -GA enhanced proteasome activity and function through elevated protein expression of PBS-5, PAS-1-7 and RPT-6 subunits that are orthologs of PSMB5, α -subunits and Rpt-6 proteasome subunits, respectively in *C. elegans*. In the same study, 18 α -GA was able to promote deceleration of the paralysis phenotype in a proteasome-dependent manner in nematode models of AD [66]. 18 α -GA has been shown to enhance

proteasome activity through the induction of Nrf2 transcription factor in human primary cells or its ortholog, namely SKN-1, in *C. elegans* [66, 67]. Finally, in the same study 18 α -GA reduced A β toxicity in SH-SY5Y cells while parallel proteasome inhibition abolished this effect.

Ganoderic acid and **polysaccharide 5** isolated from *Ganoderma* mushrooms and the plant *Rubia cordifolia* L., respectively, were shown to induce A β clearance through the proteasome in T-REx293 embryonic kidney cell line expressing A β 42-EGFP [68].

Finally, there are two natural compounds that were shown to possess anti-aggregation properties and have also been shown to modulate the UPS, but the association, if there is any, between their potency to act as proteasome activators and their contribution in protection against aggregate accumulation has not been studied yet. **3H-1,2dithiole-3-thione** (D3T) can be found in cruciferous vegetables. In a recent study, treatment of a mouse model of AD (Tg2576) with D3T markedly decreased the levels of insoluble A β 40-42 and enhanced the expression of Nrf2 [105]. Interestingly, D3T has been previously revealed to elevate the 26S proteasome activation and increase the expression of multiple proteasomal subunits in an Nrf2-dependent manner [69]. Whether the Nrf2-mediated proteasome activation is responsible for the protection against A β -toxicity remains to be elucidated. Last but not least, **betulinic acid** is a triterpenoid present in a plethora of plants and has been studied for its neuroprotective effects [106]. Betulinic acid has been reported as stimulator that enhances 20S proteasome activity [70]; the link between betulinic acid action as proteasome stimulator and the neuroprotection that it exerts is still not investigated.

15.5.2 Aging

Oleuropein is a phenolic compound found in high amounts in green olives, olive leaves, and EVOO. Oleuropein effectively exerted antiaging activity and enhanced proteasome function suggesting for the first time that proteasome

activators are interesting targets for the development of antiaging agents. More specifically oleuropein extended the life span of IMR90 and W138 human primary embryonic fibroblasts and increased CT-L, C-L, and T-L activities. Potential conformational changes of the proteasome structure by oleuropein were suggested to be responsible for the observed proteasome enhancement [71].

Quercetin is not only efficient against age-related disorders, but it positively affects the process of aging. Quercetin has been shown to prolong the life span of *S. cerevisiae* and *C. elegans* [107]. Constant treatment of HFL-1 cells with quercetin increased CT-L proteasome activity and proteasome quantity and delayed the senescence phenotype [58].

Lipoic acid is an organosulfur compound that is naturally synthesized by animals and is an essential cofactor in oxidative metabolism [108]. Nevertheless, lipoic acid can also be found in common ingredients of our diet like broccoli, spinach, tomatoes, and brussels sprouts. Lipoic acid is a strong antioxidant acting as a radical scavenger. With regard to its antiaging properties, α -lipoic acid has been shown to increase life span in *C. elegans* and *D. melanogaster* [109–111]. In normal human dermal fibroblasts (NHDF), treatment with lipoic acid positively affected the 20S proteasome activity and upregulated the protein levels of PSMB5 subunit leading to attenuation of oxidative damage and enhanced cell proliferation [72].

Sulforaphane is an isothiocyanate and its protective effects against neurodegeneration and aging have attracted the interest of many researchers [112]. Sulforaphane exerts its protective effects through interaction with the Nrf2 pathway [113–115]. Sulforaphane treatment maintained self-renewal and polypotency and delayed differentiation of human embryonic stem cells through Nrf2 activation and elevated proteasome activity [62].

Bee pollen is widely used and consumed by humans since ancient times [116]. Due to its composition (mixture of polyphenolic compounds) bee pollen has been shown to protect cells through antioxidant and anti-inflammatory

mechanisms [117, 118]. Treatment of HFL-1 cells with bee pollen was shown to trigger the proteasome activity and to elevate protein expression levels of $\beta 2$ and $\beta 5$ subunits [73].

18 α -GA has been shown to extend the life span of treated human fibroblasts and to positively affect proteasome activity in an Nrf2-dependent process [67]. Furthermore, increased life span and enhanced CT-L and T-L activities were also observed in wild-type *C. elegans* upon 18 α -GA administration [66].

Finally, it is known that **zinc** is an essential trace element involved in the maintenance of many homeostatic mechanisms and its deficiency has been associated with aging [119, 120]. In a population study, zinc administration to the elderly increased CT-L proteasome activity and reduced proteotoxicity [74].

15.6 Conclusions

Aging is a natural, unavoidable process that affects almost all organisms. UPS dysfunction is considered as one of the hallmarks of aging and is reported in many age-related pathologies [121]. An important number of investigations reveals the contribution of diet on aging. Diets that are high in fish, fresh fruit and vegetable consumption, like the Mediterranean-type Diet, have been suggested to favor healthy aging and to lower the risk of age-related pathologies. The abovementioned dietary products are rich in phytochemicals which are known for their antioxidant properties and their positive effects on aging and many pathologies including neurodegeneration [122]. Nevertheless, clinical trials and populational studies are missing for most of these compounds. Another pitfall is the fact that all experimental procedures are performed using isolated compounds usually in the μM range. Nevertheless, these concentrations are often unreachable through diet. On top of that, other constituents of dietary extracts may also have adverse effects that can dampen the beneficial properties of a single compound. Therefore, more detailed studies are needed. Given that the life span and the population of older adults have been ele-

vated, along with the incidence of age-related disorders, consumption of dietary products with potent UPS activation properties may represent a promising strategy for health span extension and improvement.

Acknowledgments We would like to thank Mrs. Nikoletta Papaevgeniou and Mary A. Vasilopoulou for comments on the manuscript. Part of the research presented here from our lab has been cofinanced by the European Union and Greek national funds through the Operational Program Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation under the call RESEARCH—CREATE—INNOVATE (project codes: T1EDK-00353 and T1EDK-01610). NC lab is also cofinanced under the Action “Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sector” (project STHENOS-b, MIS 5002398).

References

1. Ciechanover A (2017) Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Best Pract Res Clin Haematol* 30(4):341–355
2. Dikic I (2017) Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annu Rev Biochem* 86:193–224
3. Karademir B, Bozaykut P, Kartal Ozer N (2014) Heat shock proteins and proteasomal degradation in normal and tumor cells. *Free Radic Biol Med* 75(Suppl 1):S35
4. Shiber A, Ravid T (2014) Chaperoning proteins for destruction: diverse roles of Hsp70 chaperones and their co-chaperones in targeting misfolded proteins to the proteasome. *Biomolecules* 4(3):704–724
5. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153(6):1194–1217
6. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(7):421–435
7. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78:959–991
8. Wedel S, Manola M, Cavinato M, Trougakos IP, Jansen-Durr P (2018) Targeting protein quality control mechanisms by natural products to promote healthy ageing. *Molecules* 23(5)
9. Papaevgeniou N, Chondrogianni N (2018) Anti-aging and anti-aggregation properties of polyphenolic compounds in *C. elegans*. *Curr Pharm Des* 24(19):2107–2120

10. Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5 (3):218–223
11. Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, Delitsikou V, Papaevgeniou N, Sakellari M et al (2015) Proteasome activation: an innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Res Rev* 23(Pt A):37–55
12. Lefaki M, Papaevgeniou N, Chondrogianni N (2017) Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol* 13:452–458
13. Papaevgeniou N, Chondrogianni N (2016) UPS activation in the battle against aging and aggregation-related diseases: an extended review. *Methods Mol Biol* 1449:1–70
14. Njomen E, Tepe JJ (2019) Proteasome activation as a new therapeutic approach to target proteotoxic disorders. *J Med Chem* 62(14):6469–6481
15. Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015–1068
16. Davies KJ (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83(3-4):301–310
17. Ciechanover A, Stanhill A (2014) The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta* 1843(1):86–96
18. Goldberg AL (2007) Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 1):12–17
19. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR III, Koonin EV et al (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298(5593):611–615
20. Groll M, Bochtler M, Brandstetter H, Clausen T, Huber R (2005) Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem* 6(2):222–256
21. Lee MJ, Lee BH, Hanna J, King RW, Finley D (2011) Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Mol Cell Proteomics* 10(5):R110.003871
22. Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425–479
23. Nguyen T, Yang CS, Pickett CB (2004) The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 37(4):433–441
24. Chapple SJ, Siow RC, Mann GE (2012) Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol* 44(8):1315–1320
25. Kwak MK, Cho JM, Huang B, Shin S, Kensler TW (2007) Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 43(5):809–817
26. Chondrogianni N, Tzavelas C, Pemberton AJ, Nezis IP, Rivett AJ, Gonos ES (2005) Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J Biol Chem* 280(12):11840–11850
27. Chondrogianni N, Gonos ES (2007) Overexpression of hUmp1/POMP proteasome accessory protein enhances proteasome-mediated antioxidant defence. *Exp Gerontol* 42(9):899–903
28. VerPlank JJS, Lokireddy S, Zhao J, Goldberg AL (2019) 26S Proteasomes are rapidly activated by diverse hormones and physiological states that raise cAMP and cause Rpn6 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(10):4228–4237
29. Lokireddy S, Kukushkin NV, Goldberg AL (2015) cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(52):E7176–E7185
30. Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC et al (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467(7312):179–184
31. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM (2011) Protein homeostasis and aging: the importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev* 10(2):205–215
32. Chondrogianni N, Sakellari M, Lefaki M, Papaevgeniou N, Gonos ES (2014) Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 71:303–320
33. Small DH, McLean CA (1999) Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? *J Neurochem* 73(2):443–449
34. Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, LaFerla FM (2008) Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging* 29(11):1607–1618
35. Kaneko M, Koike H, Saito R, Kitamura Y, Okuma Y, Nomura Y (2010) Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30(11):3924–3932
36. Tramutola A, Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA (2016) It is all about (U)biqutin: role of altered ubiquitin-proteasome system and UCHL1 in Alzheimer disease. *Oxidative Med Cell Longev* 2016:2756068
37. Myers RH (2004) Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1(2):255–262
38. Ortega Z, Lucas JJ (2014) Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Front Mol Neurosci* 7:77
39. Diaz-Hernandez M, Valera AG, Moran MA, Gomez-Ramos P, Alvarez-Castelao B, Castano JG et al (2006) Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. *J Neurochem* 98(5):1585–1596

40. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645):839–840
41. Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE et al (2001) Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10(9):919–926
42. Um JW, Im E, Lee HJ, Min B, Yoo L, Yoo J et al (2010) Parkin directly modulates 26S proteasome activity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30(35):11805–11814
43. Giasson BI, Lee VM (2001) Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* 31(6):885–888
44. Dawson TM, Dawson VL (2010) The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 25(Suppl 1):S32–S39
45. Stewart CL, Kozlov S, Fong LG, Young SG (2007) Mouse models of the laminopathies. *Exp Cell Res* 313(10):2144–2156
46. Boasquavis PF, Silva GMM, Paiva FA, Cavalcanti RM, Nunez CV, de Paula Oliveira R (2018) Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxidative Med Cell Longev* 2018:9241308
47. Giusti L, Angeloni C, Barbalace MC, Lacerenza S, Ciregia F, Ronci M et al (2018) A proteomic approach to uncover neuroprotective mechanisms of oleocanthal against oxidative stress. *Int J Mol Sci* 19(8)
48. Carmona V, Martin-Aragon S, Goldberg J, Schubert D, Bermejo-Bescos P (2018) Several targets involved in Alzheimer's disease amyloidogenesis are affected by morin and isoquercitrin. *Nutr Neurosci*:1–16 (Epub ahead of print)
49. Marambaud P, Zhao H, Davies P (2005) Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 280(45):37377–37382
50. Regitz C, Fitzenberger E, Mahn FL, Dussling LM, Wenzel U (2016) Resveratrol reduces amyloid-beta (Aβ₁(-)(4)(2))-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Nutr* 55(2):741–747
51. Corpas R, Grinan-Ferre C, Rodriguez-Ferre E, Pallas M, Sanfeliu C (2019) Resveratrol induces brain resilience against Alzheimer neurodegeneration through proteostasis enhancement. *Mol Neurobiol* 56(2):1502–1516
52. Perucho J, Gomez A, Munoz MP, de Yebenes JG, Mena MA, Casarejos MJ (2016) Trehalose rescues glial cell dysfunction in striatal cultures from HD R6/1 mice at early postnatal development. *Mol Cell Neurosci* 74:128–145
53. Fernandez-Estevez MA, Casarejos MJ, Lopez Sendon J, Garcia Caldentey J, Ruiz C, Gomez A et al (2014) Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PLoS One* 9(2):e90202
54. Yuan NN, Cai CZ, Wu MY, Zhu Q, Su H, Li M et al (2019) Canthin-6-one accelerates alpha-synuclein degradation by enhancing ups activity: drug target identification by CRISPR-Cas9 whole genome-wide screening technology. *Front Pharmacol* 10:16
55. Li T, Feng Y, Yang R, Wu L, Li R, Huang L et al (2018) Salidroside promotes the pathological alpha-synuclein clearance through ubiquitin-proteasome system in SH-SY5Y cells. *Front Pharmacol* 9:377
56. Regitz C, Dussling LM, Wenzel U (2014) Amyloid-beta (Aβ₁(-)(4)(2))-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Mol Nutr Food Res* 58(10):1931–1940
57. Martin-Aragon S, Jimenez-Aliaga KL, Benedi J, Bermejo-Bescos P (2016) Neurohormetic responses of quercetin and rutin in a cell line over-expressing the amyloid precursor protein (APP^{swe} cells). *Phytomedicine* 23(12):1285–1294
58. Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES (2010) Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Exp Gerontol* 45(10):763–771
59. Chakraborty J, Rajamma U, Jana N, Mohanakumar KP (2015) Quercetin improves the activity of the ubiquitin-proteasomal system in 150Q mutated huntingtin-expressing cells but exerts detrimental effects on neuronal survivability. *J Neurosci Res* 93(10):1581–1591
60. Liu Y, Hettinger CL, Zhang D, Rezvani K, Wang X, Wang H (2014) Sulforaphane enhances proteasomal and autophagic activities in mice and is a potential therapeutic reagent for Huntington's disease. *J Neurochem* 129(3):539–547
61. Gabriel D, Roedel D, Gordon LB, Djabali K (2015) Sulforaphane enhances progerin clearance in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts. *Aging Cell* 14(1):78–91
62. Jang J, Wang Y, Kim HS, Lalli MA, Kosik KS (2014) Nrf2, a regulator of the proteasome, controls self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 32(10):2616–2625
63. Macedo D, Jardim C, Figueira I, Almeida AF, McDougall GJ, Stewart D et al (2018) (Poly)phenol-digested metabolites modulate alpha-synuclein toxicity by regulating proteostasis. *Sci Rep* 8(1):6965
64. Stark M, Behl C (2014) The Ginkgo biloba Extract EGB 761 Modulates Proteasome Activity and Polyglutamine Protein Aggregation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014:940186
65. Cheng YF, Zhu GQ, Wang M, Cheng H, Zhou A, Wang N et al (2009) Involvement of ubiquitin proteasome system in protective mechanisms of Puerarin to MPP (+)-elicited apoptosis. *Neurosci Res* 63(1):52–58
66. Papaevgeniou N, Sakellari M, Jha S, Tavernarakis N, Holmberg CI, Gonos ES et al (2016) 18alpha-glycyrrhetic acid proteasome activator decelerates aging and Alzheimer's disease progression in

- Caenorhabditis elegans* and neuronal cultures. *Antioxid Redox Signal* 25(16):855–869
67. Kapeta S, Chondrogianni N, Gonos ES (2010) Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* 285(11):8171–8184
 68. Chakrabortee S, Liu Y, Zhang L, Matthews HR, Zhang H, Pan N et al (2012) Macromolecular and small-molecule modulation of intracellular Abeta42 aggregation and associated toxicity. *Biochem J* 442(3):507–515
 69. Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW (2003) Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 23(23):8786–8794
 70. Coleman RA, Trader DJ (2018) Development and application of a sensitive peptide reporter to discover 20S proteasome stimulators. *ACS Comb Sci* 20(5):269–276
 71. Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES (2007) The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res* 10(2):157–172
 72. Sikdar S, Papadopoulou M, Dubois J (2017) Effect of -lipoic acid on proteasomal induction: protection against oxidative damage in human skin fibroblasts cell line NHDF. *Pharmacol Pharm* 08(09):292–305
 73. Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiropoulos G, Chondrogianni N, Gonos E et al (2011) Chemical analysis of Greek pollen – antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J* 5(1):33
 74. Cabreiro F, Perichon M, Jatje J, Malavolta M, Mocchegiani E, Friguet B et al (2008) Zinc supplementation in the elderly subjects: effect on oxidized protein degradation and repair systems in peripheral blood lymphocytes. *Exp Gerontol* 43(5):483–487
 75. Leite RP, Wada RS, Monteiro JC, Predes FS, Dolder H (2011) Protective effect of Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. *Biol Trace Elem Res* 141(1-3):262–274
 76. Bittencourt Lda S, Zeidan-Chulia F, Yatsu FK, Schnorr CE, Moresco KS, Kolling EA et al (2014) Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents beta-amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. *Phytother Res* 28(11):1615–1624
 77. Peixoto H, Roxo M, Rohrig T, Richling E, Wang X, Wink M (2017) Anti-aging and antioxidant potential of *Paullinia cupana* var. *sorbilis*: findings in *Caenorhabditis elegans* indicate a new utilization for roasted seeds of guarana. *Medicines* 4(3)
 78. Korre M, Tsoukas MA, Frantzeskou E, Yang J, Kales SN (2014) Mediterranean diet and workplace health promotion. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 8(12):416
 79. Sabatini N, Perri E, Rongai D (2018) Olive oil antioxidants and aging. Food quality: balancing health and disease. *Handb Food Bioeng* (13):145–157
 80. Rigacci S (2015) Olive oil phenols as promising multi-targeting agents against Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol* 863:1–20
 81. Li W, Sperry JB, Crowe A, Trojanowski JQ, Smith AB III, Lee VM (2009) Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *J Neurochem* 110(4):1339–1351
 82. Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A (2013) Olive-oil-derived oleocanthal enhances beta-amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. *ACS Chem Neurosci* 4(6):973–982
 83. Batarese YS, Mohamed LA, Al Rihani SB, Mousa YM, Siddique AB, El Sayed KA et al (2017) Oleocanthal ameliorates amyloid-beta oligomers' toxicity on astrocytes and neuronal cells: in vitro studies. *Neuroscience* 352:204–215
 84. Theodoraki MA, Caplan AJ (2012) Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823(3):683–688
 85. Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K (2003) The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* 22(14):3557–3567
 86. Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Ruiz A, Cavaliere F, Ortiz-Sanz C, Quintela-Lopez T et al (2018) Mangiferin and morin attenuate oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neurocytotoxicity, induced by amyloid beta oligomers. *Oxidative Med Cell Longev* 2018:2856063
 87. Kataria R, Sobarzo-Sanchez E, Khatkar A (2018) Role of morin in neurodegenerative diseases: a review. *Curr Top Med Chem* 18(11):901–907
 88. Malhotra A, Bath S, Elbarbry F (2015) An organ system approach to explore the antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective actions of resveratrol. *Oxidative Med Cell Longev* 2015:803971
 89. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 41(2-3):375–383
 90. Tellone E, Galtieri A, Russo A, Giardina B, Ficarra S (2015) Resveratrol: a focus on several neurodegenerative diseases. *Oxidative Med Cell Longev* 2015:392169
 91. Link CD (1995) Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9368–9372
 92. Mohar DS, Malik S (2012) The sirtuin system: the holy grail of resveratrol? *J Clin Exp Cardiol* 3(11)
 93. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 50(11):3337–3340

94. Lee HJ, Yoon YS, Lee SJ (2018) Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death Dis* 9(7):712
95. Seo Y, Kingsley S, Walker G, Mondoux MA, Tissenbaum HA (2018) Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(12):E2791–EE800
96. Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H et al (2004) Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10(2):148–154
97. Jimenez-Aliaga K, Bermejo-Bescos P, Benedi J, Martin-Aragon S (2011) Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPsw cells. *Life Sci* 89(25–26):939–945
98. Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antunez K, Jones DP et al (2010) After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med* 49(5):738–747
99. Morroni F, Tarozzi A, Sita G, Bolondi C, Zolezzi Moraga JM, Cantelli-Forti G et al (2013) Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 36:63–71
100. Kim HV, Kim HY, Ehrlich HY, Choi SY, Kim DJ, Kim Y (2013) Amelioration of Alzheimer's disease by neuroprotective effect of sulforaphane in animal model. *Amyloid* 20(1):7–12
101. Gan N, Wu YC, Brunet M, Garrido C, Chung FL, Dai C et al (2010) Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through up-regulation of Hsp27. *J Biol Chem* 285(46):35528–35536
102. Horakova L, Licht A, Sandig G, Jakstadt M, Durackova Z, Grune T (2003) Standardized extracts of flavonoids increase the viability of PC12 cells treated with hydrogen peroxide: effects on oxidative injury. *Arch Toxicol* 77(1):22–29
103. Shiyong L, Xinhui Q, Guanghua J, Feng N, Feng L, Shumei C et al (2018) Puerarin promoted proliferation and differentiation of dopamine-producing cells in Parkinson's animal models. *Biomed Pharmacother* 106:1236–1242
104. Zhang X, Xiong J, Liu S, Wang L, Huang J, Liu L et al (2014) Puerarin protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Neuroscience* 280:88–98
105. Cui Y, Ma S, Zhang C, Li D, Yang B, Lv P et al (2018) Pharmacological activation of the Nrf2 pathway by 3H-1, 2-dithiole-3-thione is neuroprotective in a mouse model of Alzheimer disease. *Behav Brain Res* 336:219–226
106. Navabi SP, Sarkaki A, Mansouri E, Badavi M, Ghadiri A, Farbood Y (2018) The effects of betulinic acid on neurobehavioral activity, electrophysiology and histological changes in an animal model of the Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 337:99–106
107. Belinha I, Amorim MA, Rodrigues P, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N et al (2007) Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 55(6):2446–2451
108. Reed LJ, De BB, Gunsalus IC, Hornberger CS Jr (1951) Crystalline alpha-lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 114(2952):93–94
109. Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2(2):219–236
110. Brown MK, Evans JL, Luo Y (2006) Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Biochem Behav* 85(3):620–628
111. Bauer JH, Goupil S, Garber GB, Helfand SL (2004) An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(35):12980–12985
112. Santin-Marquez R, Alarcon-Aguilar A, Lopez-Diazguerrero NE, Chondrogianni N, Konigsberg M (2019) Sulfoaphane – role in aging and neurodegeneration. *GeroScience* 41(5):655–670
113. Hu C, Egger AL, Mesecar AD, van Breemen RB (2011) Modification of Keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol* 24(4):515–521
114. Pu D, Zhao Y, Chen J, Sun Y, Lv A, Zhu S et al (2018) Protective effects of sulforaphane on cognitive impairments and AD-like lesions in diabetic mice are associated with the upregulation of Nrf2 transcription activity. *Neuroscience* 381:35–45
115. Bai Y, Cui W, Xin Y, Miao X, Barati MT, Zhang C et al (2013) Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *J Mol Cell Cardiol* 57:82–95
116. Xi X, Li J, Guo S, Li Y, Xu F, Zheng M et al (2018) The potential of using bee pollen in cosmetics: a review. *J Oleo Sci* 67(9):1071–1082
117. Atsalakis E, Chinou I, Makropoulou M, Karabourmioti S, Graikou K (2017) Evaluation of phenolic compounds in *Cistus creticus* bee pollen from Greece. Antioxidant and antimicrobial properties. *Nat Prod Commun* 12(11):1813–1816
118. Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, Da Cunha AP (2003) Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J Agric Food Chem* 51(3):742–745
119. Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz LE et al (2013) Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *Age* 35(3):839–860
120. Cabrera AJ (2015) Zinc, aging, and immunosenescence: an overview. *Pathobiol Aging Age Relat Dis* 5:25592

121. Labbadia J, Morimoto RI (2015) The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 84:435–464
122. Kumar GP, Khanum F (2012) Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacogn Rev* 6(12):81–90
123. Vilchez D, Boyer L, Morante I, Lutz M, Merkwirth C, Joyce D, Spencer B, Page L, Masliah E, Berggren WT, Gage FH, Dillin A (2012) Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature* 489(7415):304–308
124. Vilchez D, Morante I, Liu Z, Douglas PM, Merkwirth C, Rodrigues APC, Manning G, Dillin A (2012) RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature* 489(7415):263–268

Antioxidants as modulators of the ubiquitin–proteasome system against aging and proteinopathies

Eleni Panagiotidou^{1,2,a}, Anna Gioran^{1,a} and Niki Chondrogianni¹

¹*Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece;* ²*Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece*

Introduction

Aging can be defined as the gradual, time-dependent decline of cell function and integrity that eventually mirrors the loss of the organismal function and integrity. Many theories have attempted to explain why organisms age, and although they may differ, there is some unanimity regarding the hallmarks of aging. These include genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, deregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, altered intercellular communication, and loss of proteostasis [1]. According to the World Health Organization (WHO), the number of people aged 60 years or older will more than double between 2015 and 2050, moving from 12% to 22% of the global population [2]. Although longer lifespans mean more opportunities to contribute to one's families and communities while pursuing further activities, the extent of these opportunities relies almost entirely on one factor: a person's health. In order to prolong the healthy and active years in human lives (the so-called healthspan), much research has focused on the identification of (mainly) preventive interventions, particularly through the identification/characterization of bioactive compounds that may facilitate this health extension. In fact, several human clinical trials testing bioactive compounds that affect aging-related pathways are underway [3]. Notably, the most recent development in the antiaging interventions is a group of compounds/drugs called senolytics. These compounds selectively target and eliminate senescent cells (lysis of senescent cells), thus alleviating the adverse effects that senescent cells have on their neighboring young cells. Although no results are yet

available as these agents have just begun being tested for safety in humans, they currently represent one of the most promising antiaging interventions [4].

Proteinopathies entail the aggregation or amyloid fibril formation of proteins abundant in various tissues. Depending on the defective protein, proteinopathies may cause a wide range of pathologies involving individual diverse organs such as the brain, skeletal muscle, kidney, heart, lung, or multiple organs at the same time like in the case of multisystem proteinopathies [5]. Alzheimer's disease (AD) is one of the most common and largely studied age-related proteinopathy. AD is a form of dementia associated with changes in the cleavage of the amyloid precursor protein (APP) leading to the formation of the APP fragment beta-amyloid (A β) with aggregation-prone properties, as well as, enhanced levels of hyperphosphorylated tau protein that also forms aggregates. AD entails reduction in synaptic strength, synaptic loss, and neurodegeneration accompanied by metabolic, vascular, and inflammatory changes of the brain [6]. The very high incidence of AD in the population explains the intensive studies of AD in the past few decades. According to the WHO, 55 million people suffer from dementia at the moment, 60%–70% of which are attributed to AD [7]. Currently, AD and other dementias are the seventh leading cause of death globally [8]. The number of people affected by dementia is expected to rise to 78 million in 2030 and 139 million in 2050 [7].

Parkinson's disease (PD) is another age-related proteinopathy with high prevalence that represents the second most frequent neurodegenerative disorder after AD [9]. PD involves the progressive degeneration of dopaminergic neurons while the surviving neurons accumulate the

^a These two authors contributed equally.

defining neuropathological characteristics of the disease, namely Lewy bodies and Lewy neurites that are composed by abnormal protein inclusions mainly comprising aggregated alpha-synuclein [9]. The disease causes both motor symptoms including bradykinesia and resting tremor as well as non-motor symptoms like cognitive dysfunction and gastrointestinal symptoms [10]. Disability and death incidents due to PD are increasing faster than for any other neurological disorder. More specifically, the prevalence of PD has doubled in the past 25 years, while global estimates from 2019 showed that over 8.5 million individuals are afflicted by the disease [11].

Another group of neurodegenerative diseases that also belong to the family of proteinopathies are the so-called repeat expansion disorders. These are characterized by unstable repetitive simple sequence tracts dispersed throughout the human genome. Among the repeat expansion disorders with trinucleotide repeats in coding sequences, those with a repetition of a CAG triplet are the most common. The presence of repeated CAG triplets results into an elongated polyglutamine (polyQ) tract in the respective protein. Although polyQ diseases are not as prevalent as AD and PD, they represent a vast group of diseases, and they include widely studied diseases like Huntington's disease (HD) and spinocerebellar ataxias (SCAs) [12]. In the case of HD, the polyQ tract is located in the HTT gene while depending on the type of SCA the affected genes are ATXN1, ATXN2, ATXN3, etc. PolyQ diseases share some clinical features such as progressive motor disability and cognitive defects [13].

There are several common characteristics regarding the potential therapeutic or preventive schemes between age-related diseases and aging. For example, at the moment, there are no disease-modifying therapies for proteinopathies and all interventions remain palliative. Similarly, no one-size-fits all antiaging strategy is available. Most frequently, age-related diseases such as heart disease, stroke, and chronic lung disease [2] are treated upon onset and mostly symptomatically. A second common feature between many proteinopathies, and aging is the increased load of oxidative damage. In fact, there have been extensive studies on the potential merit of antioxidants as worthy antiaging strategies [14] or their benefits against the progression of proteinopathies like AD, PD [15], or polyQ diseases [16]. Thirdly, strong evidence suggests that activation of the proteasome, the main cellular proteolytic mechanism, may comprise an antiaging intervention as well as a therapeutic avenue against proteinopathies. Considering these three common features between therapeutic or preventive avenues regarding aging and proteinopathies, this chapter discusses the role of the proteasome in aging and proteinopathies with a special focus on proteasome modulation by antioxidant agents.

Proteasome in aging and proteinopathies

Ubiquitin–proteasome system structure and function

The proteasome is one of the main proteolytic mechanisms of the cell mediating the degradation of ~80% of the cellular proteins. It is a large multisubunit enzymatic complex that catalyzes the degradation of short-lived, misfolded, and damaged proteins in an ATP-dependent or independent manner [17,18]. It is found in the cytosol and nucleus, while it is also associated with the endoplasmic reticulum [19]. The main proteasome forms in eukaryotes are the so-called 20S core and the 26S and 30S complexes. The latter ones consist of the 20S core particle capped by one or two 19S regulatory particles, respectively (Fig. 1.1A). The 20S core particle is composed of 28 subunits 14 of which are α -type and 14 β -type. Of the latter, β 1, β 2, and β 5 are the subunits carrying the catalytic activities of the proteasome; caspase-like (C-L), trypsin-like (T-L), and chymotrypsin-like (CT-L), respectively. The 20S core is responsible for the degradation of the substrates. The 20S proteasome can exist in an unbound form, and it is the main protease responsible for the degradation of oxidized proteins in an ATP- and ubiquitin-independent manner [20]. The 19S particle on the other hand is organized into two sub-complexes, the lid and the base, and it is responsible among others for the opening of the 20S gate. The base binds directly to the 20S particle, is composed of hexameric AAA-ATPases (Rpt1-6) and tetrameric non-ATPases Rpn1, Rpn2, Rpn10, and Rpn13, and is responsible for the unfolding of the substrates and their translocation to the 20S chamber [21]. The lid is composed of nine subunits (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12, and Rpn15) and is necessary for the poly-ubiquitin chain binding and the deubiquitination of the substrate [22]. Proteasome-mediated protein degradation produces shorter peptides, mostly varying between 2 and 10 residues in size that can then be broken down into amino acids through amino- and carboxypeptidases [20].

Ubiquitin is a 76-amino acid protein that can be attached to protein substrates through a sophisticated three-step enzymatic process (Fig. 1.1B). In the first step, a ubiquitin-activating enzyme (E1) activates ubiquitin. In the second step, the ubiquitin is transferred from E1 onto the active site of a ubiquitin-conjugating enzyme (E2). In the third and final step, the E3 ubiquitin ligase transfers the ubiquitin for the E2 to a lysine residue of the substrate protein. Eukaryotes have only one or two types of E1 enzyme, 10–35 E2 enzymes, and even more E3 enzymes although their number is not yet defined. The combination of E2 and E3 enzymes dictates if the ubiquitin modification will include the addition of one

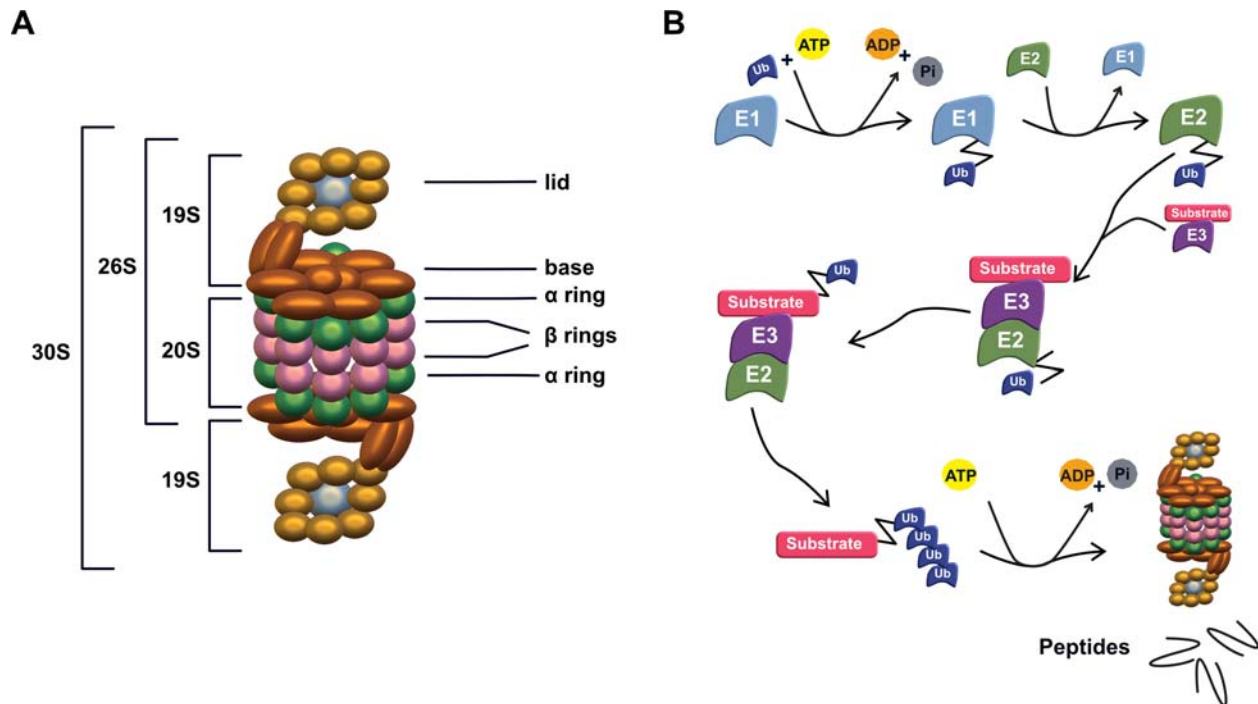


FIGURE 1.1 The main components of the UPS. (A) The 30S/26S proteasome consists of the 20S catalytic core and the 19S regulatory cap(s). Multiple α - and β -type subunits give rise to the α - and β -rings that are then organized in the 20S complex (see text for details). (B) Protein ubiquitination is an ATP-dependent process and occurs in distinct steps with the consecutive participation of E1, E2, and E3 ligases, resulting in the tagging of the protein substrate as a proteasome client.

ubiquitin (mono-ubiquitination) or of multiple ubiquitins (forming polyubiquitin chains). The standard form of ubiquitination is represented by the tetra-ubiquitination (at least four ubiquitin moieties on the substrate to be degraded) that is needed for protein recognition by the UPS system and subsequent degradation. Nevertheless, more recently, other forms of proteasomal targeting signals were also revealed such as mono-ubiquitination and multiple mono-ubiquitinations [23].

Briefly, once a protein has been appropriately ubiquitinated, it can be recognized by ubiquitin receptors and get shuttled to the 26S/30S proteasome for degradation. Ubiquitin receptors are known to be constituent proteasome subunits like the 19S subunits Rpn1, Rpn10, and Rpn13 or non-proteasomal ubiquitin-associated proteins. Before degradation, at least part of the ubiquitin chain is removed and rescued from degradation, while the released chain is further degraded into single ubiquitin molecules that can be reused. Then, the 19S cap translocates the substrate into the catalytic chamber of the 20S catalytic core while unfolding it. This process requires the opening of the gate formed by the N-terminal tails of the α -subunits, so that the substrate can further proceed into the proteolytic chamber. To complete the lifecycle of the proteasome, and although not entirely described, it has been shown that individual proteasome subunits can be degraded by the proteasome itself, while the entire 30S/26S proteasome is subjected to lysosomal degradation [24].

Proteasome involvement in aging

As already mentioned, the deterioration of the proteostatic mechanisms is one of the hallmarks of aging. Proteostatic mechanisms are responsible for the accurate synthesis and folding of proteins as well as their timely degradation. An interesting point that tethers aging with proteostasis is that several major pathways that determine lifespan also regulate parts of the proteostatic network [3]. In fact, several human clinical trials are testing compounds that affect aging-related pathways that, at the same time, are part of the proteostasis network. Among them, one can find rapamycin, a lifespan-extending compound that blocks the negative regulator of autophagy mTOR thereby enhancing autophagy, as well as compounds that activate sirtuins, proteins heavily involved in aging and metabolism [3]. The function and structure of the proteasome also undergo changes with aging, and it has long been considered a very interesting target to delay or reverse the consequences of aging.

Evidence from human and animal tissues indicates that the proteasome undergoes certain age-related alterations. Overall, in cells undergoing senescence as well as in aged rodents, nematodes, and flies, the activity of the proteasome declines without any strong evidence that the expression of the proteasome subunits is reduced (at least not in all

models). This suggests that the proteasome may undergo posttranslational modifications that alter its activity. It is also likely that aggregated material that accumulates over time may inhibit the proteasome thus leading to further accumulation of damaged proteins [25].

Reinforcement of the proteasome with either chemical or genetic means has been shown to bestow organismal and cellular longevity and, in many cases, to delay age-related phenotypes [26]. For example, restoration of the levels of proteasomal catalytic subunits in fibroblasts from elderly donors decreased the severity of aging markers [27]. At the organismal level, overexpression of specific proteasome subunits in *C. elegans* has been shown to prolong its lifespan [28,29], while similar findings have been reported in *Drosophila* [30]. Proteasomal activities can also be modulated by various compounds in a direct or indirect manner. Indirect activation can occur through cAMP-dependent Protein kinase A (PKA), cGMP-dependent protein kinase G (PKG), and inhibition of deubiquitinases [31]. Some direct 20S proteasome activators (defined as structural proteasome activators since they promote stereochemical alterations in the 20S proteasome structure thus opening its α -gated channel) are chlorpromazines and dihydroquinazoles, among others, and several natural product-based activators such as betulinic acid and oleuropein [31], while we have recently identified a marine-derived compound, namely, 1R,3E,6R,7Z,11S,12S-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (DBTO), as the first structural proteasome activator derived from the marine ecosystem [32]. Oleuropein was also shown to prolong the cellular lifespan of primary human fibroblasts [33], while DBTO was shown to promote cellular healthspan. The list of compounds that increase proteasome activity is long. However, the effects of these compounds may not always be restricted to the proteasome, and they may frequently have antioxidant or other beneficial effects independently of their effects on the proteasome. For example, quercetin, a plant-derived polyphenol, and its derivative quercetin caprylate have been shown to exert antioxidant effects but also to activate the proteasome and to prolong the cellular lifespan of primary human fibroblasts [34]. Nevertheless, seeking for compounds that activate the proteasome, with or without off-target beneficial effects, is considered a worthwhile approach in the antiaging field.

The proteasome in proteinopathies

Many lines of evidence suggest that aberrations in the proteasome may occur early enough in AD and PD to play a primary and direct role in the disease pathogenesis [35]. In support of this, the proteasome was found to have decreased activities in the hippocampi, the related limbic structures, and the inferior parietal lobes of AD patients [36]. Moreover, an inhibitory effect of tau-based paired

helical filaments (PHFs) on the proteasome itself has been suggested [37]. Similarly, α - and β -type subunits of the proteasome as well as its enzymatic activities have been found reduced in affected brain regions of patients with PD [38–40]. As opposed to AD and PD, inhibition of the proteasome by mutant HTT or other aggregated polyQ proteins may be related to secondary neuronal damage [35,41].

Overall, promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative diseases by bolstering either autophagy or the UPS is considered a promising potential therapeutic approach [42]. It has been proposed that proteasome reinforcement specifically may be an ideal approach as it will facilitate the degradation of monomeric precursors of neurotoxic proteins, of oxidatively damaged proteins, as well as of “intrinsically disordered proteins” (IDPs) that are naturally degraded by the proteasome [43]. In support of this, mounting evidence from preclinical models implies that proteasome activation ameliorates several proteotoxic effects in various animal models of proteinopathies. Genetic activation of the proteasome in *C. elegans* has shown to counteract A β - and polyQ-mediated proteotoxicity [28,29]. Similar findings were recently reported for APP toxicity in mice [44]. Moreover, activation of the proteasome with natural compounds like quercetin, 18 α -GA, or DBTO have been shown to delay A β -mediated toxicity in *C. elegans* [32,45,46].

Despite all the evidence favoring the concept of proteasome activation as a therapeutic strategy against proteinopathies, one should also consider the potential adverse effects of the possibly enhanced clearance of proteins unrelated to neurodegenerative pathways [47]. Nevertheless, this limitation could be circumvented with the use of PROTACs. PROTACs (proteolysis targeting chimeras) are chimeric molecules that can shuttle specific proteins to a ubiquitin ligase complex for targeted ubiquitination and degradation. Theoretically, PROTACs developed to target tau or A β for degradation could be used as a treatment in AD [48]. However, a limitation may also occur in this case; since both tau and A β have been shown to inhibit the proteasome, PROTACs may not be able to display their full potential [36]. Therefore, a combination of PROTACs with structural proteasome activators could theoretically be the ultimate solution. Structural proteasome activators can activate the 20S complex, which can recognize only oxidized proteins or IDPs, thus, few of the culprits of the various proteinopathies. However, if combined with PROTACs, specific proteins that need ubiquitination to be recognized would reach the 20S complex, which would be further activated due to the action of the structural activators.

Although the role of the proteasome in proteinopathies is at this point undisputable and strong preclinical evidence supports its activation as an attractive therapeutic target,

there are still many gaps and controversies that need to be covered before proceeding to a complete therapeutic strategy.

Effects of cellular redox status on proteasome function

Several pathological conditions like AD, PD, and polyQ diseases as well as aging have been associated with elevated oxidative damage. Similarly, in these conditions, changes in the proteasome structure and function have been also observed [49]. This has led to the notion that oxidants or oxidative damage can affect the activity and/or conformation of the proteasome. This hypothesis has been validated by several studies showing that the proteasome structure and function can be affected by oxidative stress in both indirect and direct manner (Fig. 1.2).

With regard to the indirect regulation of the proteasome by oxidative stress, the nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2 (Nrf2)-dependent proteasome regulation has been revealed. Nrf2 is the main transcription factor that orchestrates the cellular response against oxidative stress. Under normal conditions, Nrf2 is bound to Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1), an intrinsic inhibitor of Nrf2. The Nrf2-Keap1 complex normally resides in the

cytoplasm; it is ubiquitinated by an E3 ligase complex and degraded by the proteasome. However, under oxidative stress conditions, oxidative modifications on the cysteine residues of Keap1 and the inactivation of the E3 ligase complex allow the dissociation of Nrf2 from Keap1 and its translocation and accumulation into the nucleus. Once in the nucleus and upon heterodimerization with other specific proteins, Nrf2 promotes the expression of several protective genes among which most of the proteasome subunits [50].

The proteasome has been found to be directly modified by oxidants with significant effects on its conformation and function. For example, under acute oxidative stress due to exposure to oxidants or mitochondrial defects, rapid disassembly of 30S/26S proteasomes into intact 20S and 19S particles occurs to allow the immediate ATP- and ubiquitin-independent degradation of oxidized proteins by the 20S particle [20,51]. It is suggested that oxidation of cysteine residues lies behind the observed proteasome disassembly, while reassembly *in vivo* and *in vitro* is possible upon reduction (i.e., treatment with antioxidants). Antioxidant treatment is also sufficient to restore the ubiquitin-dependent substrate degradation [51]. These findings were further supported by a study in yeast where S-glutathionylation of specific cysteine residues of the unbound 20S particle was shown to increase its effectiveness

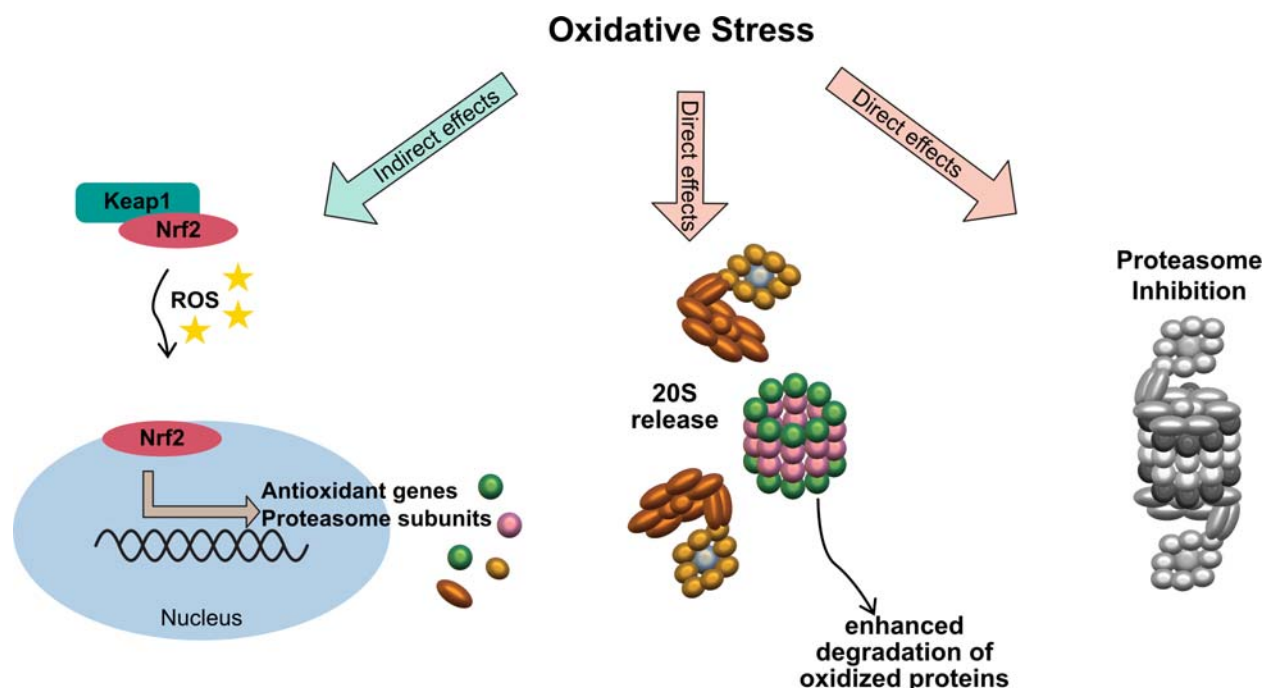


FIGURE 1.2 The cellular redox status can affect the proteasome function. Increased levels of oxidative stress can have two distinct outcomes on the function of the proteasome; activation or inhibition. Activation can occur in an indirect manner through the Nrf2-mediated enhanced expression of various proteasome subunits. Activation can also occur in a direct manner via posttranslational modifications of the proteasome that lead to the dissociation of the 19S regulatory particles from the 20S core, allowing the latter to degrade oxidized proteins or partially unfolded proteins (including IDPs) in an ATP- and ubiquitin-independent manner. Elevated oxidative stress may also lead to proteasome inactivation known to occur as a consequence of posttranslational modifications.

in the degradation of oxidized and partially unfolded proteins [52]. Several posttranslational modifications have been reported to occur in specific proteasome subunits upon oxidative stress like carbonylation, glycoxidation, and lipoxidation, but the exact effects of each one are not fully described yet [53]. It is likely that some have an activating effect, at least on the 20S proteasome, while some exhibit an inhibitory effect. For example, treatment with H_2O_2 or the oxidized form of glutathione (GSSG) of human lens epithelial cells inhibited all three proteasome activities [54]. Similarly in human neuroblastoma cells, the presence of an electrophile oxidant modified an ATPase of the 19S particle, resulting in significant reduction of the 26S proteasome activity [55].

Accumulation of oxidatively modified proteins is a characteristic of cellular aging while age-related or neurodegeneration-related cognitive impairment has been extensively linked with increased oxidative damage [56]. Examination of the AD brain has revealed several pathological hallmarks associated with oxidative damage. Although the source of free radicals is unclear (could be mitochondrial dysfunction, $A\beta$ -mediated processes or even genetic factors), there is definitely a redox imbalance [57]. Importantly, the proteasome has been found to be affected by oxidative damage resulting in its inactivation in the brain of AD patients [58]. Similarly, in PD, it is suggested that the local and systemic oxidative damage by various free radicals may underlie the degeneration of dopaminergic neurons. The concomitant proteasome inhibition leads to a vicious cycle of constant accumulation of oxidized or otherwise damaged proteins thus further exacerbating the pathology [59].

Conclusively, the altered cellular redox status both in aging and neurodegenerative proteinopathies may explain, at least partially, the alterations of the proteasome behavior. Nevertheless, one should keep in mind that this could be only one side of the coin as in both conditions, dysregulation of several signaling pathways and/or proteostatic regulators also contribute to the respective phenotypes.

Antioxidants that affect proteasome function

A number of environmental factors including UV-radiation, air pollution, pesticides, or toxic metals negatively influence the cellular redox system with harmful consequences for the integral function of the organism. Thus, nature has developed defense mechanisms to battle against these harmful triggers. Antioxidants are definitely among the most precious allies against the redox imbalance and can be either naturally occurring, synthetic compounds or mineral elements from endogenous (metabolism) or exogenous (diet) sources. Given that the redox imbalance perturbs the proteome, the study of the relationship between

antioxidants and proteostasis mechanisms attracts increased research interest. Here, we review antioxidant compounds that have been shown to affect the proteasome function during the progression of aging and aggregation-related disorders. We mainly refer to phenolic compounds that represent a large group of antioxidants. Phenolic compounds are subcategorized to phenols, phenolic acids, flavonoids, xanthenes, stilbenes, and lignans. The rest of the groups include terpenoids, organosulfur compounds, carbohydrates, various extracts, and elements. Finally, we also report some antioxidants that have been shown to influence the proteasome function and thus to exhibit antiaging and antiaggregation properties, but nevertheless, their antioxidant effects have not been examined in the same studies. [Table 1.1](#) summarizes the compounds mentioned in the chapter.

Phenolic compounds

Oleuropein, oleocanthal, and oleacein are phenolic compounds found in *Olea europaea* (olive tree). These compounds are well characterized for their antioxidant properties, including their ability to activate ROS-detoxifying enzymes [80]. Oleuropein treatment of human fibroblasts led to elongated cellular lifespan, lower levels of intracellular ROS, and reduced levels of oxidized proteins. These results have been suggested to be directly linked to the positive effects of oleuropein on proteasome function. Specifically, oleuropein was able to upregulate the expression of proteasome subunits and to enhance the three catalytic activities of the proteasome *in cellulo* in human fibroblast lysates. Interestingly, oleuropein was also able to induce proteasome activities *in vitro*, following its incubation with highly purified proteasome, indicating that proteasome activation may also be mediated by conformational changes [33]. Oleocanthal treatment of human BJ skin fibroblasts, protected cells against H_2O_2 toxicity, upregulated the gene expression of several proteasome subunits ($\alpha 7$, $\beta 4$, $\beta 5$, and Rpn11), and triggered an antioxidant response. Moreover, oleocanthal and oleacein dietary administration was able to promote healthy aging in *Drosophila* flies. Both compounds offered cytoprotection in the fruit fly, leading to decreased ROS levels, enhanced CT-L proteasome activity, and increased expression of $\beta 5$ and Rpn7 proteasome subunits [60]. Finally, oleocanthal has been also studied for its potent neuroprotective and antiaggregation effects. In differentiated human neuroblastoma cell line, oleocanthal supplementation upon oxidative stress, upregulated the expression of $\beta 1$ and $\beta 4$ proteasome subunits [61].

Curcumin is a flavonoid polyphenol that belongs to the group of curcuminoids. Curcumin has been extensively examined for its beneficial effects in health, which in many cases are attributed to its antioxidant activities [81]. More

TABLE 1.1 Summary of the reported antioxidant compounds that have been shown to induce proteasome activation and have been tested in cellular or organismal models of aging and/or proteinopathies.

Antioxidant compound	Model ^a	Aging/ cellular senescence ^b	Proteinopathies	Antioxidant response ^c	UPS		References
					Proteasome activity	Subunit regulation ^d	
Oleuropein	Human primary fibroblasts (IMR90, W138)	✓		↓ROS, ↓oxidized proteins	CT-L, C-L, and T-L	α7, β2, and Rpt4 (protein expression)	[33]
Oleocanthal	Human primary fibroblasts (BJ)					α7, β4, β5, and Rpn11 (gene expression)	[60]
	<i>D. melanogaster</i>	✓		↓ROS	CT-L	β5 and Rpn7 (Prosβ5 and Rpn7) (protein expression)	
	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)					β1 and β4 (protein expression)	[61]
Oleacein	<i>D. melanogaster</i>	✓		↓ROS	CT-L	β5 and Rpn7 (Prosβ5 and Rpn7) (protein expression)	[60]
Curcumin	Rat dopaminergic cells (PC12)		PD	↓oxidized proteins	CT-L		[62]
Quercetin	Human primary fibroblasts (HFL1)	✓			CT-L	α7 and β5 (protein expression)	[34]
Isoquercitrin	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)		AD	↓ROS	CT-L		[63]
Morin	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)		AD	↓ROS	CT-L		[63]
Polyphenol digested metabolites	Yeast		PD	↑SOD1, ↑SOD2, ↑HAP4 ↓GSSG/GSH	Restored proteasome impairment		[64]
Puerarin	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)		SCA	↓ROS, ↑SOD2	CT-L and C-L		[65]
Daidzein	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)		SCA	↓ROS, ↑SOD2	CT-L and C-L		[65]

Continued

TABLE 1.1 Summary of the reported antioxidant compounds that have been shown to induce proteasome activation and have been tested in cellular or organismal models of aging and/or proteinopathies.—cont'd

Antioxidant compound	Model ^a	Aging/ cellular senescence ^b	Proteinopathies	Antioxidant response ^c	UPS		References
					Proteasome activity	Subunit regulation ^d	
Tilidroside	<i>D. melanogaster</i>	✓		↓ROS, ↑ <i>Trxr1</i>	CT-L	α7 and β5 (<i>Prosa7</i> and <i>Prosb5</i>) (gene expression)	[66]
	Human primary fibroblasts (IMR90)				CT-L		
Chrysin	<i>C. elegans</i>		PD	↓ROS, ↑SOD	Proteasome activation		[67]
18α-GA	Human primary fibroblasts (HFL1)	✓		Nrf2	CT-L and T-L	α4, β1, β2 and β5	[68]
	<i>C. elegans</i>	✓		Nrf2	CT-L and T-L	α1-7, β5 and rpt6 (PAS1-7, PBS-5, RPT6) (protein expression)	
	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), murine primary neurons and <i>C. elegans</i>		AD	Nrf2			
Diosgenin	<i>N. guentheri</i>	✓		↓ROS, ↓protein oxidation, ↓lipid per- oxidation, ↑CAT, ↑SOD, ↑GPX	CT-L		[69]
Sulforaphane	Murine neuroblastoma cells (Neuro2A)			↑NQO1, ↑γGGLr, ↑CAT	CT-L and C-L	β1, β2 and β5 (<i>Psmb6</i> , <i>Psmb6</i> , <i>Psmb5</i>) (gene and pro- tein expression)	[70]
	Cells from HGPS patients	HGPS			CT-L		[71]
α-Lipoic acid	Normal human dermal fi- broblasts (NHDF)	✓		↓ROS	CT-L		[72]
Ginkgo biloba extract	Human embryonic kidney cells (HEK293)		HD		CT-L	β1, β2, and β5 (gene expression)	[73]

Myricetin	Fibroblast-like cell lines derived from monkey kidney tissue (Cos-7)		HD and SCA		Proteasome inhibition attenuated the antiaggregation effects		[74]
Guarana hydroalcoholic extract	<i>C. elegans</i>		AD	↓ROS, ↑SOD-3	CT-L		[75]
Carqueja hydroalcoholic extract	<i>C. elegans</i>		AD	↓ROS	CT-L		[76]
Trehalose	Human skin fibroblasts from HD patients		HD	↓ROS	CT-L		[77]
Fucoidan	<i>C. elegans</i>		AD	↓ROS	CT-L	β2 and β5 (<i>pbs-2</i> and <i>pbs-5</i>) (gene expression)	[78]
DBTO	Human primary fibroblasts (HFL1)				CT-L		[32]
	Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), <i>C. elegans</i>						
Zinc	Peripheral blood lymphocytes (elderly)	✓		↓oxidized proteins, ↑MSR	CT-L		[79]

^aCellular or organismal models. If a model for a specific proteinopathy was used, the name of the pathology is presented in the “proteinopathies” column.

^bStudies performed in aged cells or organisms or throughout the cellular or organismal lifespan and have shown extension of lifespan and/or healthspan.

^cAntioxidant response (on top of the UPS induction) following treatment with oxidants or upon aging-associated oxidative stress or proteotoxicity-associated oxidative stress in models of proteinopathies.

^dName of the proteasome subunit. The approved names of the proteasome genes appear in all cases for consistency reasons while the nomenclature of the gene in the specific organismal model appears in parenthesis.

specifically, it has been shown to exhibit anti-inflammatory, antioxidant, free radical scavenging, mitochondrial protecting, and iron-chelating effects. Studies have demonstrated the role of curcumin in proteinopathies such as AD and PD, and it has been proposed as a promising nutraceutical agent [82,83]. In the context of the proteasome, a recent study supported that curcumin and its synthetic polyphenolic compound, didemethylcurcumin, can either promote or suppress the proteasome activity in human neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner [84]. In dopaminergic PC12 cells treated with the mitochondrial complex I inhibitor rotenone, a cell model of Parkinsonism, it has been observed that most of the identified carbonylated proteins are UPS components. Interestingly, curcumin treatment reduced the levels of oxidized proteins in rotenone-treated PC12 cells and promoted proteasome activation [62].

Quercetin is a flavonoid found in many products of a regular diet. Quercetin offers neuroprotection due to its ability to scavenge ROS, activate the Nrf2 signaling pathway, and improve mitochondria quality control [85]. Treatment of human HFL1 embryonic fibroblasts with quercetin resulted in antiaging and rejuvenating effects, increased resistance to H₂O₂ treatment, enhanced CT-L proteasome activity, and upregulated expression of $\beta 5$ and $\alpha 7$ proteasome subunits [34]. Proteasome activation can also occur through isoquercitrin, one of the naturally occurring glucosides of quercetin. More specifically, isoquercitrin positively affected the CT-L proteasome activity and inhibited the ROS generation upon H₂O₂ treatment in human neuroblastoma cells expressing a mutated amyloid precursor protein. Similar results were reported for morin, a polyphenol with structural similarities with quercetin [63].

Regarding the group of polyphenols, (poly)phenol-digested metabolites (PDMs) have been reported to exert protective effects on PD through proteostasis regulation. PDMs can be obtained after in vitro gastrointestinal digestion of edible fruits (FPDMs) and leaves (LPDMs). PDMs from *Arbutus unedo* leaves were able to suppress the toxicity induced by alpha-synuclein expression in yeast and human cells, and this positive effect was attributed to the ability of PDMs to restore the proteasome activity. Furthermore, PDMs elevated *SOD1*, *SOD2*, and *HAP4* (a global regulator of mitochondrial electron transport) mRNA levels and reduced the oxidized to reduced glutathione ratio (GSSG/GSH), suggesting a reduction of oxidative stress. Similar results were obtained in human cells expressing alpha-synuclein where treatment with PDMs also protected the cells from oxidative stress and promoted their mitochondrial function [64].

Puerarin and daidzein belong to a class of compounds known as isoflavones. Both of them are active constituents of *Pueraria lobata* root and possess antioxidant activities [86]. Puerarin has been shown to promote cytoprotection

in organismal and cellular PD models. In human neuroblastoma cells treated with MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium, a neurotoxin that inhibits mitochondrial complex I), puerarin administration attenuated the deregulation of the proteasome activity, and lowered the amount of alpha-synuclein and ubiquitin-conjugated proteins [87]. In cellular models of SCAs, puerarin and daidzein treatment reduced the ROS burden and enhanced the SOD2 protein levels. In the same cell line these isoflavones enhanced CT-L and C-L proteasome activities and promoted antiaggregation effects [65]. Similar results were obtained upon daidzein treatment of induced pluripotent stem cell lines from SCA3 patients [88].

Tilidroside is a glycosidic flavonoid found in several dietary plants. Tilidroside treatment of *Drosophila* flies reduced somatic tissue ROS burden, upregulated the mRNA levels of *Trxr1* (gene involved in the antioxidant response), and boosted proteasome function through elevation of the CT-L activity and upregulation of $\alpha 7$ and $\beta 5$ subunits. These effects were accompanied by increased lifespan and healthspan. Enhanced proteasome activation and delayed progression of cellular senescence by tilidroside were also reported in normal human IMR90 fibroblasts [66].

Chrysin that belongs to the flavonoid family can be found in honey, propolis and in some passion flowers species like *Passiflora caerulea* and *Passiflora incarnata*. Chrysin was studied for its neuroprotective properties in *C. elegans* PD models. This study revealed that chrysin ameliorated the proteasome and superoxide dismutase activities and exerted antioxidative effects by reducing the ROS levels in 6-OHDA-(6-hydroxydopamine; a neurotoxin used to destroy dopaminergic and noradrenergic neurons and trigger PD-like symptoms in animal models)-treated nematodes [67].

Terpenoids

18 α -Glycyrrhetic acid (18 α -GA) is a triterpenoid that has been shown to delay the replicative senescence of human primary fibroblasts and to extend the lifespan of *C. elegans*. In both cases, 18 α -GA acted through the induction of Nrf2 (SKN-1; the ortholog in *C. elegans*) and promoted the proteasome assembly and activity. More specifically, in cells, 18 α -GA enhanced the three proteolytic proteasome activities and upregulated the expression of $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, and $\alpha 4$ subunits, while in the nematode, 18 α -GA enhanced the CT-L and T-L proteasome activities and elevated the protein expression levels of PBS-5, PAS-1-7, and RPT6 subunits that are orthologs of $\beta 5$, $\alpha 1$ -7 subunits, and Rpt6, respectively. Nrf2 and proteasome activation by 18 α -GA resulted in cytoprotection, improvement of the phenotype of *C. elegans* AD models, and reduced A β toxicity in human neuroblastoma cells as well as in murine primary neurons [46,68].

Diosgenin is a phytosteroid sapogenin. It has been proposed to possess antioxidant and neuroprotective properties [89]. Recently, the antiaging effects of diosgenin were tested in the male killifish, *Nothobranchius guentheri*. Specifically, diosgenin extended the lifespan of the killifish, reduced ROS, protein oxidation and lipid peroxidation levels, and enhanced the activity of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase antioxidant enzymes. Regarding the UPS, diosgenin enhanced and maintained higher CT-L activity levels over the lifetime of *N. guentheri* [69].

Organosulfurs

Nrf2 transcription factor can also be induced by the natural product sulforaphane, an isothiocyanate originally isolated from broccoli. The strong antioxidant activities of sulforaphane have beneficial impact on various models of aging and neurodegenerative disorders [90]. Many studies have attempted to reveal the mechanisms underlying the neuroprotective effects of sulforaphane [91]. In murine neuroblastoma Neuro2A cells, sulforaphane elevated the expression levels of *Psmb5*, *Psmb6*, and *Psmb7* subunits and the CT-L and C-L proteasome activities. In addition, sulforaphane enhanced the expression of antioxidant genes like *Nqo1*, regulatory chain of γ GCL (*γ GCLr*) and catalase, and protected Neuro2A cells against H₂O₂ cytotoxicity, while the cytoprotection was abolished upon proteasome inhibition [70]. Proteasome activation by sulforaphane has been reported to be mediated through the upregulation of Hsp27 [92]. In fibroblasts derived from patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome, a rare childhood premature aging disorder, treatment with sulforaphane enhanced progerin clearance, elevated the CT-L activity and increased the levels of Hsp27 [71]. Finally, sulforaphane-mediated Nrf2 activation was able to control self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cells through the regulation of proteasome expression and activity [93].

α -Lipoic acid (ALA) is an organosulfur compound derived from caprylic acid, a naturally occurring medium-chain fatty acid. It is an Nrf2 inducer with antioxidant effects in various cell lines and organisms. ALA exerts its antioxidant activity through direct radical scavenging and interaction with other antioxidants and has been shown to positively affect lifespan in *C. elegans* and *Drosophila* [94,95]. Many studies report the beneficial effects of ALA on the progression of aging and neurodegeneration [96,97]. In normal human dermal fibroblasts, ALA decreased the percentage of ROS positive cells and carbonylated proteins following H₂O₂ treatment and promoted the CT-L proteasome activity leading to enhanced cell proliferation [72].

Crude extracts

The tree *Ginkgo biloba* is one of the oldest living plant species. The extract of *Ginkgo biloba* is commonly used in experimental and clinical studies related to neurodegenerative disorders. The neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract are attributed to the strong antioxidant properties and its ability to trigger the Nrf2/ARE pathway [98,99]. *Ginkgo biloba* extract treatment of HEK293 cells expressing mHtt decreased the levels of polyQ aggregates, promoted CT-L activity, and elevated the transcript levels of β 1, β 2, and β 5 subunits [73]. The *Ginkgo biloba* extract is composed of many phenolic acids and flavonoid compounds, including myricetin. Myricetin has been shown to exert neuroprotective and antioxidant properties [100]. The neuroprotective role of myricetin is mainly due to its antioxidant activities. Nevertheless, it was recently shown that the neuroprotective effects are also attributed to the capacity of myricetin to enhance protein quality control mechanisms. Specifically, treatment of Cos-7 cells with myricetin induced the levels of Hsp70 chaperone and E3 ubiquitin ligase E6-AP and decreased the aggregation of neurodegeneration-related proteins. The reduction in the protein aggregates was suggested to be proteasome-dependent since addition of MG132 proteasome inhibitor attenuated the observed antiaggregation effects [74].

Guarana (*Paullina cupana*) is widely used in the Brazilian beverage industry, and it is known for the stimulatory effects on the central nervous system. Compounds such as polyphenols, caffeine, and other methylxanthines are responsible for the antioxidant properties of guarana [101]. In *C. elegans* models of AD and PD, guarana hydroalcoholic extract (GHE) treatment alleviated the toxic phenotypes associated with protein misfolding and accumulation. In the case of the AD model, silencing of the *skn-1* (Nrf2) gene abolished the positive effects of GHE. In the same study, it was proposed that these positive effects may be attributed to both antioxidant effects and modulation of proteostasis. Specifically, GHE reduced ROS levels in wild type and AD *C. elegans* model, promoted the expression of the superoxide dismutase SOD-3 and the heat shock protein HSP-16.2, and elevated the CT-L proteasome activity [75].

Carqueja (*Baccharis trimera*) is a plant found in South America. Carqueja hydroalcoholic extract (CHE) has been shown to increase oxidative stress resistance in wild type *C. elegans* by reducing ROS levels. In the same study, CHE exhibited protective effects in an AD nematode model. More specifically, CHE enhanced the CT-L proteasome activity and upregulated *hsp-4* and *hsp-16.2* (heat shock genes that respond to protein misfolding and heat shock, respectively) gene expression [76].

Carbohydrates and zinc

Trehalose is a natural disaccharide able to affect the Nrf2 pathway [102]. In HD human skin fibroblasts, trehalose attenuated the ROS formation and huntingtin accumulation that resulted following proteasome inhibition. It was shown that trehalose was able to increase the CT-L activity even in the presence of the proteasome inhibitor epoxomicin [77]. Similar results were obtained by trehalose treatment of glial cultures from the striatum of HD mouse models [103].

Compounds derived from marine plants have been also proposed to be potent UPS modulators [104]. Fucoidan is a polysaccharide found in various species of brown algae. In a *C. elegans* AD model, fucoidan alleviated the paralysis phenotype mediated by A β and decreased A β deposition. Furthermore, fucoidan enhanced the CT-L activity, elevated the *pbs-2* and *pbs-5* gene expression, and exerted its antioxidant effects by reducing ROS and increasing hsp-16.2 expression in transgenic animals [78]. More recently, we have identified a compound derived from the brown alga *Dictyota mediterranea*, namely DBTO, as a structural proteasome activator. Continuous treatment of HFL1 human primary fibroblasts with DBTO throughout their cellular lifespan was shown to result in ameliorated healthspan. Ameliorated health status was also shown in wild type *C. elegans* under continuous exposure to DBTO.

More importantly, treatment of various AD nematode models with DBTO resulted in enhanced protection against A β -induced proteotoxicity. This protective effect was also verified in human cells of neuronal origin challenged with exogenously added A β peptide. Although we did not observe differences in ROS levels, Nrf2 induction or SOD activity, one cannot rule out the possibility of induction of other antioxidant mechanisms [32].

Zinc is a chemical element implicated in many cellular pathways, and its deficiency has been associated with aging [105], while serum zinc levels have been shown to decrease with age [106]. In a population study in the elderly, it was revealed that zinc supplementation enhanced the CT-L and methionine sulfoxide reductase activities and eliminated the oxidized protein accumulation in peripheral blood lymphocytes [79].

Concluding remarks

As outlined in this chapter, in aging and neurodegenerative proteinopathies, the accompanying redox imbalance may inhibit proteasome function. Due to this inhibition, damaged proteins may escape degradation and accumulate thus further contributing to the oxidative damage (Fig. 1.3A). Some antioxidants may directly or indirectly

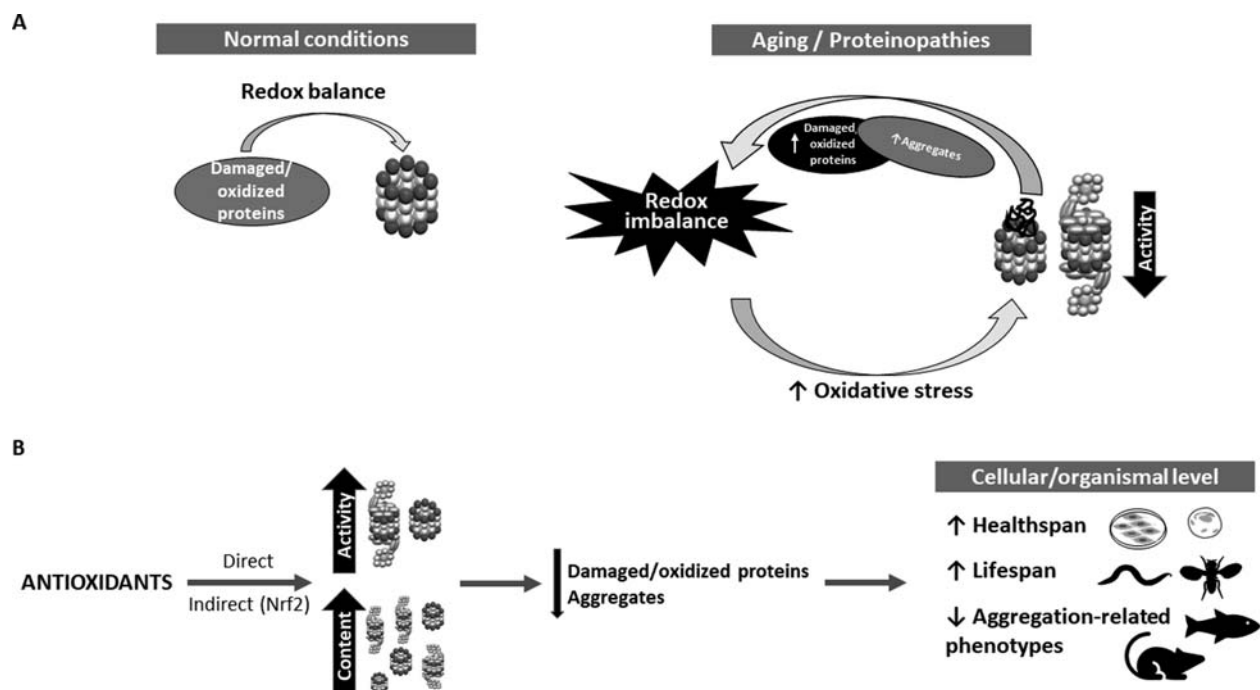


FIGURE 1.3 The proteasome deregulation upon oxidative stress in aging and proteinopathies and the protective effects of antioxidants. (A) Under normal conditions, oxidized proteins are removed in a 20S proteasome-dependent manner. Upon the progression of aging or proteinopathies, redox imbalance and decreased proteasome activity occur that establish a vicious cycle; the redox imbalance leads to enhanced ROS levels that negatively affect the activity and function of the proteasome. Moreover, enhanced levels of oxidized protein and aggregates further inhibit the 20S proteasome through allosteric impairment of the substrate gate. In turn, impairment of the 20S and 30S/26S proteasomes leads to elevated levels of oxidized proteins and aggregates, which negatively affect the redox balance. (B) Antioxidants can promote proteasome activation (in terms of activity and/or expression) in a direct or indirect manner (through the induction of the Nrf2 pathway) favoring the clearance of oxidized and aggregated proteins. The alliance between antioxidants and the proteasome has been shown to enhance the lifespan, promote healthspan and protect against proteotoxicity in several cellular and organismal models.

improve proteasomal function under these conditions leading to healthspan and lifespan extension as well as ameliorated phenotypes in models of various proteinopathies (Fig. 1.3B).

Numerous compounds have been tested for their antioxidant properties and their concomitant ability to promote proteasome activation in various contexts of both aging and proteinopathies. Despite this substantial effort, there is still an enormous need to decelerate the rate of aging that is an important risk factor for age-associated diseases and to develop disease-modifying therapies for proteinopathies.

Understanding the intricacies of proteostatic mechanisms and the effects of the cellular redox status on them is pivotal for the efficient design of new therapeutic compounds/strategies. Moreover, designing appropriate pre-clinical studies to identify bioactive compounds is highly important, although often neglected. For example, proteasome activators are frequently identified based on their capacity to enhance the proteasome-mediated degradation of small fluorogenic peptides *in vitro*. However, it has been suggested that this readout may lead to the discovery of activators that do not open the 20S gate widely enough for larger protein substrates like the ones associated with proteinopathies [107]. Similarly, the current general notion regarding antioxidants and their benefits is not what it used to be in the past. It is becoming clearer that the oxidative stress has specific signaling roles in the cell, and it is not only associated with adverse effects. Although increased oxidative stress may be part of several pathologies, the endogenous antioxidant defenses of the human body are carefully regulated. Consequently, large quantities of exogenous antioxidants may be ineffective or even harmful [108].

In conclusion, the reinforcement of the proteasome through the regulation of the cellular redox status is achievable. Although it presents particular interest as it opens a new avenue for proteasome manipulation through antioxidants that can be found in our diet, there is still much that needs to be understood before we can harness the full potential of this knowledge.

Acknowledgments

Research from N.C. lab is currently co-financed by the European Union and Greek national funds through the Operational Program Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation, under the call “Research – Create – Innovate” (project code: T1EDK-00353 and T1EDK-01610), as well as under the call Special actions “Aquaculture – Industrial Materials – Open Innovation in Culture” (project code: T6UBII-00474, project acronym: ALGOSMETIC). EP received an HFRI PhD Fellowship grant (Fellowship Number: 1540) by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI).

References

- [1] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013.
- [2] WHO. 10 facts on ageing and health. 2017.
- [3] Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature* July 2019;571(7764):183–92.
- [4] Kirkland JL, Tchkonian T, Zhu Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. The clinical potential of senolytic drugs. *J Am Geriatr Soc* 2017;65(10):2297–301.
- [5] Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem* June 2017;86:27–68.
- [6] Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer’s disease. *Handb Clin Neurol* 2019;167:231–55.
- [7] WHO. Dementia. 2021.
- [8] WHO. The top 10 causes of death. 2020.
- [9] Lesage S, Brice A. Parkinson’s disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* April 2009;18(R1):R48–59.
- [10] Costa HN, Esteves AR, Empadinhas N, Cardoso SM. Parkinson’s disease: a multisystem disorder. *Neurosci Bull* August 2022.
- [11] WHO. Parkinson disease. 2022.
- [12] Fourier A, Quadrio I. Proteinopathies associated to repeat expansion disorders. *J Neural Transm* February 2022;129(2):173–85.
- [13] Bunting EL, Hamilton J, Tabrizi SJ. Polyglutamine diseases. *Curr Opin Neurobiol* February 2022;72:39–47.
- [14] Dhanjal DS, Bhardwaj S, Sharma R, Bhardwaj K, Kumar D, Chopra C, et al. Plant fortification of the diet for anti-ageing effects: a review. *Nutrients* September 2020;12(10).
- [15] Aborode AT, Pustake M, Awuah WA, Alwerdani M, Shah P, Yarlagadda R, et al. Targeting oxidative stress mechanisms to treat Alzheimer’s and Parkinson’s disease: a critical review. *Oxid Med Cell Longev* 2022;2022:7934442.
- [16] Gkekas I, Gioran A, Boziki MK, Grigoriadis N, Chondrogianni N, Petrakis S. Oxidative stress and neurodegeneration: interconnected processes in PolyQ diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* September 2021;10(9).
- [17] Ciechanover A, Stanhill A. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2014.
- [18] Davies KJA. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. In: *Biochimie*; 2001.
- [19] Enenkel C. Proteasome dynamics. *Biochim Biophys Acta* January 2014;1843(1):39–46.
- [20] Raynes R, Pomatto LCD, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med* August 2016;50:41–55.
- [21] Tomko RJJ, Hochstrasser M. Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly. *Cell Biochem Biophys* June 2011;60(1–2):13–20.
- [22] Glickman MH, Rubin DM, Fu H, Larsen CN, Coux O, Wefes I, et al. Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* April 1999;26(1–2):21–8.

- [23] Livneh I, Kravtsova-Ivantsiv Y, Braten O, Kwon YT, Ciechanover A. Monoubiquitination joins polyubiquitination as an esteemed proteasomal targeting signal. *Bioessays* June 2017;39(6).
- [24] Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res* August 2016;26(8):869–85.
- [25] Stolzing A, Grune T. The proteasome and its function in the ageing process. *Clin Exp Dermatol* October 2001;26(7):566–72.
- [26] Chondrogianni N, Sakellari M, Lefaki M, Papaevgeniou N, Gonos ES. Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2014.
- [27] Hwang JS, Hwang JS, Chang I, Kim S. Age-associated decrease in proteasome content and activities in human dermal fibroblasts: restoration of normal level of proteasome subunits reduces aging markers in fibroblasts from elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* May 2007;62(5):490–9.
- [28] Chondrogianni N, Georgila K, Kourtis N, Tavernarakis N, Gonos ES. 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 2015.
- [29] Vilchez D, Morante I, Liu Z, Douglas PM, Merkwirth C, Rodrigues APC, et al. RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature* 2012.
- [30] Nguyen NN, Rana A, Goldman C, Moore R, Tai J, Hong Y, et al. Proteasome $\beta 5$ subunit overexpression improves proteostasis during aging and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep* 2019.
- [31] George DE, Tepe JJ. Advances in proteasome enhancement by small molecules. *Biomolecules* November 2021;11(12).
- [32] Vasilopoulou MA, Gioran A, Theodoropoulou M, Koutsaviti A, Roussis V, Ioannou E, et al. Healthspan improvement and anti-aggregation effects induced by a marine-derived structural proteasome activator. *Redox Biol* October 2022;56:102462.
- [33] Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res* 2007.
- [34] Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Exp Gerontol* 2010.
- [35] Ciechanover A, Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* October 2003;40(2):427–46.
- [36] Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* July 2000;75(1):436–9.
- [37] Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2003.
- [38] McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* January 2001;297(3):191–4.
- [39] McNaught KSP, Belizaire R, Jenner P, Olanow CW, Isacson O. Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* July 2002;326(3):155–8.
- [40] Opatova A, Cente M, Novak M, Filipcik P. The ubiquitin proteasome system as a potential therapeutic target for treatment of neurodegenerative diseases. *Gen Physiol Biophys* October 2015;34(4):337–52.
- [41] Fernández-Cruz I, Reynaud E. Proteasome subunits involved in neurodegenerative diseases. *Arch Med Res* January 2021;52(1):1–14.
- [42] Boland B, Yu WH, Corti O, Mollereau B, Henriques A, Bezard E, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov* September 2018;17(9):660–88.
- [43] Jones CL, Tepe JJ. Proteasome activation to combat proteotoxicity. *Molecules* August 2019;24(15).
- [44] Chocron SE, Munkácsy E, Harper SK, Karpowicz P, Jiang N, Van Skike C, et al. Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models. *Sci Adv* June 2022;8(23):eabk2252.
- [45] Panagiotidou E, Chondrogianni N. We are what we eat: ubiquitin-proteasome system (UPS) modulation through dietary products. *Adv Exp Med Biol* 2020.
- [46] Papaevgeniou N, Sakellari M, Jha S, Tavernarakis N, Holmberg CI, Gonos ES, et al. 18 α -Glycyrrhetic acid proteasome activator decelerates aging and Alzheimer's disease progression in *Caenorhabditis elegans* and neuronal cultures. *Antioxid Redox Signal* 2016.
- [47] Engelen S, Stefanis L, Oddo S, Bellucci A. Can we treat neurodegenerative proteinopathies by enhancing protein degradation? *Mov Disord* July 2022;37(7):1346–59.
- [48] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, Mercurio F, Crews CM, Deshaies RJ. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* July 2001;98(15):8554–9.
- [49] Lefaki M, Papaevgeniou N, Chondrogianni N. Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol* 2017;13:452–8. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.005>.
- [50] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* January 1999;13(1):76–86.
- [51] Livnat-Levanon N, Kevei É, Kleifeld O, Krutauz D, Segref A, Rinaldi T, et al. Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. *Cell Rep* June 2014;7(5):1371–80.
- [52] Silva GM, Netto LES, Simões V, Santos LFA, Gozzo FC, Demasi MAA, et al. Redox control of 20S proteasome gating. *Antioxid Redox Signal* June 2012;16(11):1183–94.
- [53] Höhn TJA, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: part III-redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol* 2014;2:388–94.
- [54] Petersen A, Carlsson T, Karlsson J-O, Zetterberg M. The proteasome and intracellular redox status: implications for apoptotic regulation in lens epithelial cells. *Curr Eye Res* October 2007;32(10):871–82.
- [55] Ishii T, Sakurai T, Usami H, Uchida K. Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry* October 2005;44(42):13893–901.
- [56] Singh P, Barman B, Thakur MK. Oxidative stress-mediated memory impairment during aging and its therapeutic intervention by

- natural bioactive compounds. *Front Aging Neurosci* 2022;14:944697.
- [57] Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* July 2000;1502(1):139–44.
- [58] Cecarini V, Ding Q, Keller JN. Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease. *Free Radic Res* June 2007;41(6):673–80.
- [59] Dorszewska J, Kowalska M, Prendecki M, Piekut T, Kozłowska J, Kozubski W. Oxidative stress factors in Parkinson's disease. *Neural Regen Res* July 2021;16(7):1383–91.
- [60] Nikou T, Liaki V, Stathopoulos P, Sklirou AD, Tsakiri EN, Jakschitz T, et al. Comparison survey of EVOO polyphenols and exploration of healthy aging-promoting properties of oleocanthal and oleacein. *Food Chem Toxicol* March 2019;125:403–12.
- [61] Giusti L, Angeloni C, Barbalace MC, Lacerenza S, Ciregia F, Ronci M, et al. A proteomic approach to uncover neuroprotective mechanisms of oleocanthal against oxidative stress. *Int J Mol Sci* 2018.
- [62] Buratta S, Chiaradia E, Tognoloni A, Gambelunghe A, Meschini C, Palmieri L, et al. Effect of curcumin on protein damage induced by rotenone in dopaminergic PC12 cells. *Int J Mol Sci* April 2020;21(8).
- [63] Carmona V, Martín-Aragón S, Goldberg J, Schubert D, Bermejo-Bescós P. Several targets involved in Alzheimer's disease amyloidogenesis are affected by morin and isoquercitrin. *Nutr Neurosci* August 2020;23(8):575–90.
- [64] Macedo D, Jardim C, Figueira I, Almeida AF, McDougall GJ, Stewart D, et al. (Poly)phenol-digested metabolites modulate alpha-synuclein toxicity by regulating proteostasis. *Sci Rep* 2018.
- [65] Chen I-C, Chang C-N, Chen W-L, Lin T-H, Chao C-Y, Lin C-H, et al. Targeting ubiquitin proteasome pathway with traditional Chinese medicine for treatment of spinocerebellar ataxia type 3. *Am J Chin Med* 2019;47(1):63–95.
- [66] Chatzigeorgiou S, Thai QD, Tchoumtchoua J, Tallas K, Tsakiri EN, Papassideri I, et al. Isolation of natural products with anti-ageing activity from the fruits of *Platanus orientalis*. *Phytomedicine* 2017.
- [67] Muhammad F, Liu Y, Wang N, Zhao L, Zhou Y, Yang H, et al. Anti- α -synuclein toxicity and anti-neurodegenerative role of chrysin in transgenic *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci* February 2022;13(4):442–53.
- [68] Kapeta S, Chondrogianni N, Gonos ES. Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* 2010.
- [69] Som S, Antony J, Dhanabal SP, Ponnusankar S. Neuroprotective role of Diosgenin, a NGF stimulator, against A β (1–42) induced neurotoxicity in animal model of Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* February 2022;37(2):359–72.
- [70] Kwak MK, Cho JM, Huang B, Shin S, Kensler TW. Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 2007.
- [71] Gabriel D, Roedl D, Gordon LB, Djabali K. Sulforaphane enhances progerin clearance in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts. *Ageing Cell* 2015.
- [72] Sikdar S, Papadopoulou M, Dubois J. Effect of lipoic acid on proteasomal induction: protection against oxidative damage in human skin fibroblasts cell line NHDF. *Pharmacol Pharm* 2017;08(09):292–305.
- [73] Stark M, Behl C. The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 modulates proteasome activity and polyglutamine protein aggregation. *Evid Based Complement Altern Med* 2014.
- [74] Joshi V, Mishra R, Upadhyay A, Amanullah A, Poluri KM, Singh S, et al. Polyphenolic flavonoid (Myricetin) upregulated proteasomal degradation mechanisms: eliminates neurodegenerative proteins aggregation. *J Cell Physiol* November 2019;234(11):20900–14.
- [75] Boasquíviz PF, Silva GMM, Paiva FA, Cavalcanti RM, Nunez CV, De Paula Oliveira R, Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2018.
- [76] Paiva FA, Bonomo L de F, Boasquíviz PF, de Paula ITBR, Guerra JF da C, Leal WM, et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) protects against oxidative stress and β -amyloid-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:740162.
- [77] Fernandez-Estevéz MA, Casarejos MJ, Sendon JL, Caldentey JG, Ruiz C, Gomez A, et al. Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PLoS One* 2014.
- [78] Wang X, Yi K, Zhao Y. Fucoidan inhibits amyloid- β -induced toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans* by reducing the accumulation of amyloid- β and decreasing the production of reactive oxygen species. *Food Funct* January 2018;9(1):552–60.
- [79] Cabreiro F, Perichon M, Jatje J, Malavolta M, Mocchegiani E, Friguet B, et al. Zinc supplementation in the elderly subjects: effect on oxidized protein degradation and repair systems in peripheral blood lymphocytes. *Exp Gerontol* 2008.
- [80] Castejón ML, Montoya T, Alarcón-de-la-Lastra C, Sánchez-Hidalgo M. Potential protective role exerted by secoiridoids from *Olea europaea* L. in cancer, cardiovascular, neurodegenerative, aging-related, and immunoinflammatory diseases. *Antioxidants* February 2020;9(2).
- [81] Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and health. *Molecules* February 2016;21(3):264.
- [82] Chen M, Du Z-Y, Zheng X, Li D-L, Zhou R-P, Zhang K. Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* April 2018;13(4):742–52.
- [83] Nebrisi EE. Neuroprotective activities of curcumin in Parkinson's disease: a review of the literature. *Int J Mol Sci* October 2021;22(20).
- [84] Khan TK, You Y, Nelson TJ, Kundu S, Pramanik SK, Das J. Modulation of proteasome activity by curcumin and didemethylcurcumin. *J Biomol Struct Dyn* April 2021:1–8.
- [85] Islam MS, Quispe C, Hossain R, Islam MT, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, et al. Neuropharmacological effects of quercetin: a literature-based review. *Front Pharmacol* 2021;12:665031.
- [86] Jin SE, Son YK, Min B-S, Jung HA, Choi JS. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Arch Pharm Res (Seoul)* May 2012;35(5):823–37.
- [87] Cheng Y-F, Zhu G-Q, Wang M, Cheng H, Zhou A, Wang N, et al. Involvement of ubiquitin proteasome system in protective

- mechanisms of Puerarin to MPP(+)-elicited apoptosis. *Neurosci Res* January 2009;63(1):52–8.
- [88] Chen I-C, Chang K-H, Chen Y-J, Chen Y-C, Lee-Chen G-J, Chen C-M. Pueraria lobata and daidzein reduce cytotoxicity by enhancing ubiquitin-proteasome system function in SCA3-iPSC-derived neurons. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:8130481.
- [89] Gupta DD, Mishra S, Verma SS, Shekher A, Rai V, Awasthee N, et al. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of diosgenin enriched *Paris polyphylla* rhizome extract of Indian Himalayan landraces. *J Ethnopharmacol* April 2021;270:113842.
- [90] Santín-Márquez R, Alarcón-Aguilar A, López-Diazguerrero NE, Chondrogianni N, Königsberg M. Sulforaphane—role in aging and neurodegeneration. *GeroScience* October 2019;41(5):655–70.
- [91] Klomprens EA, Ding Y. The neuroprotective mechanisms and effects of sulforaphane. *Brain Circ* 2019;5(2):74–83.
- [92] Gan N, Wu YC, Brunet M, Garrido C, Chung FL, Dai C, et al. Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through up-regulation of Hsp27. *J Biol Chem* 2010.
- [93] Jang J, Wang Y, Kim HS, Lalli MA, Kosik KS. Nrf2, a regulator of the proteasome, controls self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cell* 2014.
- [94] Brown MK, Evans JL, Luo Y. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and alpha-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol Biochem Behav* November 2006;85(3):620–8.
- [95] Du G, Qiao Y, Zhuo Z, Zhou J, Li X, Liu Z, et al. Lipoic acid rejuvenates aged intestinal stem cells by preventing age-associated endosome reduction. *EMBO Rep* August 2020;21(8):e49583.
- [96] Molz P, Schröder N. Potential therapeutic effects of lipoic acid on memory deficits related to aging and neurodegeneration. *Front Pharmacol* 2017;8:849.
- [97] Kaur D, Behl T, Sehgal A, Singh S, Sharma N, Chigurupati S, et al. Decrypting the potential role of α -lipoic acid in Alzheimer's disease. *Life Sci* November 2021;284:119899.
- [98] Liu H, Ye M, Guo H. An updated review of randomized clinical trials testing the improvement of cognitive function of *Ginkgo biloba* extract in healthy people and Alzheimer's patients. *Front Pharmacol* 2019;10:1688.
- [99] Singh SK, Srivastav S, Castellani RJ, Plascencia-Villa G, Perry G. Neuroprotective and antioxidant effect of *Ginkgo biloba* extract against AD and other neurological disorders. *Neurotherapeutics* July 2019;16(3):666–74.
- [100] Li J, Xiang H, Huang C, Lu J. Pharmacological actions of myricetin in the nervous system: a comprehensive review of preclinical studies in animals and cell models. *Front Pharmacol* 2021;12:797298.
- [101] Torres EAFS, Pinaffi-Langley ACDC, Figueira MDS, Cordeiro KS, Negrão LD, Soares MJ, et al. Effects of the consumption of guarana on human health: a narrative review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* January 2022;21(1):272–95.
- [102] Mizunoe Y, Kobayashi M, Sudo Y, Watanabe S, Yasukawa H, Natori D, et al. Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. *Redox Biol* May 2018;15:115–24.
- [103] Peruchio J, Gómez A, Muñoz MP, de Yébenes JG, Mena MÁ, Casarejos MJ. Trehalose rescues glial cell dysfunction in striatal cultures from HD R6/1 mice at early postnatal development. *Mol Cell Neurosci* July 2016;74:128–45.
- [104] Vasilopoulou MA, Ioannou E, Roussis V, Chondrogianni N. Modulation of the ubiquitin-proteasome system by marine natural products. *Redox Biol* May 2021;41:101897.
- [105] Cabrera ÁJR. Zinc, aging, and immunosenescence: an overview. *Pathobiol Aging Age-Relat Dis* 2015.
- [106] Wong CP, Magnusson KR, Sharpton TJ, Ho E. Effects of zinc status on age-related T cell dysfunction and chronic inflammation. *Biomaterials* April 2021;34(2):291–301.
- [107] Trader DJ, Simanski S, Dickson P, Kodadek T. Establishment of a suite of assays that support the discovery of proteasome stimulators. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* April 2017;1861(4):892–9.
- [108] Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* March 2013;75(3):637–44.