



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη φυσικών και συνθετικών ενώσεων με  
αντιγηραντική δράση και δράση εναντίον της  
πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε οργανισμικά και  
κυτταρικά μοντέλα γήρανσης

Μαρία Α. Βασιλοπούλου  
Βιολόγος, MSc

Λάρισα 2025

«Μελέτη φυσικών και συνθετικών ενώσεων με αντιγηραντική δράση και  
δράση εναντίον της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε οργανισμικά και  
κυτταρικά μοντέλα γήρανσης»

«Study of natural and synthetic compounds with anti-ageing and anti-  
aggregation properties in organismal and cellular ageing models»

## ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Μέρος της διατριβής υλοποιήθηκε στο πλαίσιο του έργου «*Βιο-εμπνευσμένες αντιγηραντικές ενώσεις με στοχευμένη δράση στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος*», ακρωνύμιο: *RESET* (Τ1ΕΔΚ-01610) που εντάσσεται στη Δράση Εθνικής Εμβέλειας «Ερευνώ – Δημιουργώ - Καινοτομώ» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία» (ΕΠΑνΕΚ) στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



Η διατριβή αυτή συγχρηματοδοτήθηκε στο πλαίσιο του έργου «*Πρωτεασωματική Ενεργοποίηση: Κατανόηση της συστημικής ρύθμισης της πρωτεόστασης κατά τη γήρανση και ταυτοποίηση αντιγηραντικών δομικών πρωτεασωματικών ενεργοποιητών από τη Μεσόγειο Θάλασσα*», ακρωνύμιο: *PROTEOSTASIS* (MIS 5050341), της πράξης «Υποστήριξη Ερευνητών με έμφαση στους Νέους Ερευνητές-κύκλος Β΄» που εντάσσεται στο επιχειρησιακό πρόγραμμα «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο).



### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Δημοσθένης Σαρηγιάννης**, Καθηγητής τμήματος Χημικών Μηχανικών Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και Διευθυντής και Πρόεδρος Διοικητικού Συμβουλίου Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, επιβλέπων

**Βασίλειος Ζουμπουρλής**, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, μέλος

**Δημήτριος Κουρέτας**, Καθηγητής τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Δημοσθένης Σαρηγιάννης**, Καθηγητής τμήματος Χημικών Μηχανικών Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και Διευθυντής και Πρόεδρος Διοικητικού Συμβουλίου Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, επιβλέπων

**Βασίλειος Ζουμπουρλής**, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

**Δημήτριος Κουρέτας**, Καθηγητής τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ευστάθιος Γκόνος**, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

**Ρένα Κωστή**, Καθηγήτρια τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ευτυχία Ασπροδίνη**, Καθηγήτρια τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Στάγκος**, Επίκουρος Καθηγητής τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρία Α. Βασιλοπούλου

«Μελέτη φυσικών και συνθετικών ενώσεων με αντιγηραντική δράση και δράση εναντίον της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε οργανισμικά και κυτταρικά μοντέλα γήρανσης»

«Study of natural and synthetic compounds with anti-ageing and anti-aggregation properties in organismal and cellular ageing models»

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδρομής, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους στάθηκαν δίπλα μου.

Πρώτα από όλα, ευχαριστώ από καρδιάς τον Δρ. Δημοσθένη Σαρηγιάννη, Καθηγητή του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Διευθυντή και Πρόεδρο του Διοικητικού Συμβουλίου του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη στήριξή του ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η διδακτορική διατριβή. Η συνεισφορά του υπήρξε καθοριστική και τίποτα δεν θα είχε προχωρήσει χωρίς εκείνον. Τον ευχαριστώ θερμά για το χρόνο και την εμπειρία που μου προσέφερε απλόχερα.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στον Δρ. Βασίλη Ζουμπουρλή, Διευθυντή Ερευνών του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την καθοδήγησή του. Οι συζητήσεις μας και η ανιδιοτελής στήριξή του με βοήθησαν όχι μόνο να προχωρήσω την εργασία αυτή, αλλά και να ανακαλύψω δυνατότητες μέσα μου που δεν ήξερα πως υπήρχαν.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Στάθηκε αρωγός στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής με την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε στηρίζοντας ουσιαστικά την προσπάθειά μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Ευστάθιο Γκόνο, Διευθυντή Ερευνών του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, τη Δρ. Ρένα Κωστή, Καθηγήτρια του τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, τη Δρ. Ευτυχία Ασπροδίνη, Καθηγήτρια του τμήματος Ιατρικής, καθώς και τον Δρ. Δημήτρη Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συμβολή τους ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Νικολέττα Παπαευγενίου, που στάθηκε δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Με καθοδηγούσε ουσιαστικά με τις πολύτιμες συμβουλές, τις γνώσεις και την εμπειρία της. Χωρίς τις καίριες παρεμβάσεις της, η εργασία αυτή δεν θα είχε πάρει την τελική της μορφή.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης για τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο και την πολύτιμη υποστήριξή τους όχι μόνο σε πρακτικό αλλά και σε ψυχολογικό επίπεδο. Ευχαριστώ ξεχωριστά τη Σοφία Λαγουμιτζή, το Γιώργο Παϊκόπουλο, τη Δήμητρα Ράντη, τη Δρ. Ελένη Παναγιωτίδου, τη Δρ. Μαριάννα Καπετάνου και τη Σοφία Αθανασοπούλου αλλά και τα μέλη του εργαστηρίου Ανακάλυψης Βιοδεικτών και Μεταφραστικής Έρευνας, Δρ. Παρασκευή Μπαφίτη και Δρ. Σωτήρη Ουζούνη. Οι

ατελείωτες ώρες στο εργαστήριο ήταν πολύ πιο ευχάριστες χάρη σε εσάς. Σας ευχαριστώ πολύ!

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη, Διευθύντρια Ερευνών του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την καθοριστική παρουσία της κατά τη διάρκεια της διατριβής. Η συνεργασία μας αποτέλεσε σταθμό στην εξέλιξή μου, προσφέροντας σημαντικές εμπειρίες και πολύτιμα μαθήματα που συνέβαλαν στη διαμόρφωση της ερευνητικής και προσωπικής μου ανθεκτικότητας. Η παρουσία της με ώθησε να καλλιεργήσω επιμονή, υπομονή και εστίαση στο στόχο. Ευχαριστώ επίσης τη Δρ. Άννα Γιοράν για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθειά της.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου, την αδελφή μου Φωτεινή, το Χρήστο, τη Δήμητρα και τις αγαπημένες μου φίλες Μαρία, Γεωργιάνα και Ιωάννα. Στέκονται πάντα στο πλευρό μου, στηρίζουν τις επιλογές μου και με γεμίζουν απεριόριστη αγάπη και δύναμη. Χωρίς αυτούς, δεν θα είχα βρει τη δύναμη και το κουράγιο που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Βιόπολις, Λάρισα

Διδακτορική Διατριβή

«Μελέτη φυσικών και συνθετικών ενώσεων με αντιγηραντική δράση και  
δράση εναντίον της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε οργανισμικά και  
κυτταρικά μοντέλα γήρανσης»

«Study of natural and synthetic compounds with anti-ageing and anti-  
aggregation properties in organismal and cellular ageing models»

Μαρία Α. Βασιλοπούλου  
Βιολόγος, MSc

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 27

Συνολικός αριθμός σελίδων: 282

Αριθμός πινάκων: 8

Αριθμός εικόνων: 90

Αριθμός παραρτημάτων: 1

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 380

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν δύο ενώσεις που ενεργοποιούν δομικά το 20S πρωτεάσωμα, πιθανά μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης. Οι ενώσεις αυτές παρουσίασαν αντιγηραντικές ιδιότητες και δράση κατά της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε κυτταρικά και οργανισμικά μοντέλα γήρανσης. Στο πρώτο μέρος της διατριβής, ταυτοποιήσαμε για πρώτη φορά μια φυσική ένωση που απομονώθηκε από το καφέ άλγος *Dictyota mediterranea* ως δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος, με την ονομασία (1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (DBTO). Το DBTO ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα τόσο *in vitro*, απουσία κυτταρικών λυμάτων, όσο και *in cellulose*. Η συνεχής χορήγηση του μεταβολίτη DBTO σε νεαρούς, πρωτογενείς, εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου (HFL-1) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους βελτιώνει την κυτταρική διάρκεια υγείας (healthspan), ενώ αντίστοιχη βελτίωση της κατάστασης υγείας παρατηρείται και σε αγρίου τύπου νηματώδεις σκώληκες *Caenorhabditis elegans* που λαμβάνουν DBTO. Επίσης, η χορήγηση DBTO σε διαγονιδιακά μοντέλα της νόσου Αλτσχάιμερ στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, καθώς και σε νευροβλαστικά κύτταρα του ανθρώπου (SH-SY5Y) που έχουν εκτεθεί στο Αβ πεπτίδιο, οδηγεί σε ενισχυμένη προστασία έναντι της Αβ-προκαλούμενης πρωτεοτοξικότητας. Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, η υβριδική ένωση MK151, συνδυάζοντας τα δομικά χαρακτηριστικά της υδροξυτυροσόλης και του χρωμανίου (της φαρμακοφόρου ομάδας της βιταμίνης E), ταυτοποιήθηκε ως δομικός ενεργοποιητής του 20S πρωτεασώματος *in vitro*, απουσία κυτταρικών λυμάτων, *in cellulose* και *in vivo* έπειτα από τη χορήγηση σε αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans*. Η συνεχής χορήγηση της υβριδικής ένωσης MK151 σε νεαρούς, πρωτογενείς, εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου (HFL-1) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των κυττάρων και βελτιώνει την κυτταρική διάρκεια υγείας (healthspan), ενώ αντίστοιχη βελτίωση της κατάστασης υγείας παρατηρείται και σε αγρίου τύπου νηματώδεις σκώληκες *C. elegans* που λαμβάνουν MK151. Επιπλέον, η χορήγηση MK151 σε διαγονιδιακά μοντέλα της νόσου Αλτσχάιμερ στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* ενίσχυσε την προστασία έναντι της Αβ-προκαλούμενης πρωτεοτοξικότητας. Ακόμη, η σύνθεση βελτιστοποιημένων ενώσεων της MK151 οδήγησε στη δημιουργία ενώσεων που ενεργοποιούν δομικά το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικών λυμάτων εμφανίζοντας παράλληλα παρόμοιες ή και καλύτερες αντιγηραντικές και/ή νευροπροστατευτικές δράσεις στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* αλλά και σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου (HFL-1). Συνολικά, τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν δύο δομικούς ενεργοποιητές του πρωτεασώματος, το μεταβολίτη DBTO που προέρχεται από θαλάσσιο οργανισμό της Μεσογείου Θάλασσας και τη βιο-εμπνευσμένη συνθετική ένωση MK151, αναδεικνύοντας τις δυνατότητές τους ως ενώσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση ή/και διατήρηση της διάρκειας υγείας και την προληπτική προστασία έναντι ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών που χαρακτηρίζονται από συσσώρευση πρωτεϊνών, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ.

## ABSTRACT

In this doctoral thesis, we studied two compounds that structurally activate the 20S proteasome, likely through direct stereochemical interactions. These compounds demonstrated anti-aging properties and reduced protein aggregation in cellular and organismal aging models. In the first part of the thesis, we identified for the first time a natural compound isolated from the brown alga *Dictyota mediterranea* as a structural proteasome activator, named (1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (DBTO). DBTO activates the 20S proteasome both *in vitro* (in the absence of cell lysates) and *in cellulo*. Continuous administration of DBTO to young, human primary fibroblasts (HFL-1) throughout their replicative lifespan improves cellular healthspan. Similarly, DBTO administration improves the health status of wild-type *Caenorhabditis elegans* nematodes. Furthermore, DBTO administration in transgenic Alzheimer's disease models of *C. elegans* and human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) exposed to A $\beta$  peptide enhances protection against A $\beta$ -induced proteotoxicity.

In the second part of the thesis, the hybrid compound MK151, combining the structural features of hydroxytyrosol and chroman (the pharmacophore of vitamin E) in one scaffold, was identified as a structural 20S proteasome activator *in vitro* (in the absence of cell lysates), *in cellulo*, and *in vivo* following administration in wild-type *C. elegans*. Continuous MK151 administration to young, human primary fibroblasts (HFL-1) throughout their replicative lifespan extends lifespan and improves cellular healthspan. Likewise, improvement of organismal healthspan is also observed in wild-type *C. elegans* nematodes treated with MK151. Additionally, MK151 administration in transgenic Alzheimer's disease models of *C. elegans* provides enhanced protection against A $\beta$ -induced proteotoxicity. Moreover, the synthesis of optimized MK151 analogs yielded compounds that structurally activate the 20S proteasome *in vitro* (in the absence of cell lysates) and exhibit similar or even superior anti-aging and/or neuroprotective effects in *C. elegans* and human primary fibroblasts (HFL-1). In total, our results reveal two structural proteasome activators: DBTO, a metabolite derived from a Mediterranean marine organism and the bio-inspired synthetic compound MK151, highlighting their potential as agents to improve or preserve healthspan and provide preventive protection against age-related diseases characterized by protein aggregation, such as Alzheimer's disease.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

### Δημοσιεύσεις διδακτορικής διατριβής

**M. A. Vasilopoulou**, A. Gioran, M. Theodoropoulou, A. Koutsaviti, V. Roussis, E. Ioannou, N. Chondrogianni (2022): Healthspan improvement and anti-aggregation effects induced by a marine-derived structural proteasome activator, *Redox Biology*, 2022 Oct;56:102462. doi: 10.1016/j.redox.2022.102462

**M. A. Vasilopoulou**, E. Ioannou, V. Roussis, N. Chondrogianni (2021): Modulation of the ubiquitin-proteasome system by marine natural products, *Redox Biology*, 2021 Feb 17;41:101897. doi: 10.1016/j.redox.2021.101897

### Δημοσιεύσεις συναφών αντικειμένων

**M. A. Vasilopoulou**, N. Papaevgeniou, N. Chondrogianni (2021): Proteasome fate in aging and proteinopathies, In: *Proteostasis and Proteolysis*, CRC Press, eBook ISBN: 9781003048138, doi: 10.1201/9781003048138-12

N. Chondrogianni, **M. A. Vasilopoulou**, M. Kapetanou, E. S. Gonos (2020): Proteasome modulation: A way to delay aging? In: Rattan, S.I.S. (Ed.), *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*. Elsevier. vol. 3, Academic Press, pp. 92–104, ISBN: 9780128160756, doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11461-8

### Πρακτικά διεθνών συνεδρίων

**M. A. Vasilopoulou**, T. Fotopoulou, N. Papaevgeniou, A. Gioran, D. Papahatjis, T. Calogeropoulou, M. Koufaki, N. Chondrogianni (2021): A novel bioinspired proteasome activator against aging, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 177, Supplement 1, December 2021, Pages S122-S123, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.200

Papaevgeniou N., Fotopoulou T., **Vasilopoulou M. A.**, Panat N., Pick E., Golan A., Gonos E.S., Papahatjis D., Calogeropoulou T., Koufaki M., Chondrogianni N. (2019) A novel bioinspired proteasome activator: potential anti-ageing strategies offered by mother nature (but not only). *Free Radic Biol Med.* 139 Suppl 1: S78-S79

### Ανακοινώσεις σε συνέδρια

T. Fotopoulou, E. Chazapi, **M. A. Vasilopoulou**, A. Gioran, D. Papahatjis, K. C. Prousis, M. Koufaki, N. Chondrogianni, T. Calogeropoulou: Novel benzoxathiine-based proteasome activators with anti-ageing and neuroprotective activity, *Chemical Biology Workshop: Drug and Biomarker Discovery*, Αθήνα, Νοέμβριος 2023 (αναρτημένη ανακοίνωση)

T. Fotopoulou, E. Chazapi, **M. A. Vasilopoulou**, A. Gioran, D. Papahatjis, K. C. Prousis, M. Koufaki, N. Chondrogianni, T. Calogeropoulou: Novel benzoxathiine-based proteasome activators with anti-ageing and neuroprotective activity, 19<sup>th</sup> Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Πάτρα, Μάρτιος 2023 (αναρτημένη ανακοίνωση)

**M. A. Vasilopoulou**, M. C. Theodoropoulou, E. Ioannou, V. Roussis, N. Chondrogianni: A proteasome activator from the Mediterranean Sea in the battle against Alzheimer's disease, 9<sup>th</sup> International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Άνδρος, Σεπτέμβριος 2021 (*προφορική ανακοίνωση*)

**M. A. Vasilopoulou**, T. Fotopoulou, N. Papaevgeniou, A. Gioran, D. Papahatjis, T. Calogeropoulou, M. Koufaki and N. Chondrogianni: A novel bioinspired proteasome activator against aging, Annual Meeting SFRR-E "Redox Biology in the 21<sup>st</sup> Century: A New Scientific Discipline", Σεβρία, Ιούνιος 2021 (*αναρτημένη ανακοίνωση*)

**M. A. Vasilopoulou**, M. C. Theodoropoulou, E. Ioannou, V. Roussis, N. Chondrogianni: A proteasome activator from the Mediterranean Sea, Virtual Congress of Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB) "Mechanisms of ageing", Αθήνα, Απρίλιος 2021 (*προφορική ανακοίνωση*)

**M. A. Vasilopoulou**, M. C. Theodoropoulou, V. Roussis, N. Chondrogianni: Marine Compounds as Proteasome Activators, 14<sup>th</sup> International Scientific Conference "The Vital Nature Sign 2020", Λιθουανία, Οκτώβριος 2020 (*προφορική ανακοίνωση*)

N. Papaevgeniou, T. Fotopoulou, **M. A. Vasilopoulou**, N. Panat, E. Pick, A. Golan, E. S. Gonos, D. Papahatjis, T. Calogeropoulou, M. Koufaki and N. Chondrogianni: A novel bioinspired proteasome activator: potential anti-ageing strategies offered by mother nature (but not only), 70<sup>o</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Αθήνα, Νοέμβριος 2019 (*αναρτημένη ανακοίνωση*)

E. Chazapi, K. C. Prousis, S. Katsamakas, T. Fotopoulou, N. Papaevgeniou, **M. A. Vasilopoulou**, D. Papahatjis, M. Koufaki, N. Chondrogianni, T. Calogeropoulou: Design and synthesis of 4-thiatocopherol/hydroxytyrosol hybrids as proteasome activators, EFMC-SMC'19, International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019 (*αναρτημένη ανακοίνωση*)

T. Fotopoulou, N. Papaevgeniou, S. Katsamakas, **M. A. Vasilopoulou**, N. Panat, E. Pick, A. Golan, K. Prousis, E. S. Gonos, D. Papahatjis, T. Calogeropoulou, N. Chondrogianni, M. Koufaki: Design and synthesis of novel bioinspired hybrid compounds as proteasome activators with anti-ageing activity, EFMC-ASMC'19, International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019 (*αναρτημένη ανακοίνωση*)

N. Papaevgeniou, T. Fotopoulou, **M. A. Vasilopoulou**, N. Panat, E. Pick, A. Golan, E. S. Gonos, D. Papahatjis, T. Calogeropoulou, M. Koufaki and N. Chondrogianni: A novel bioinspired proteasome activator: Potential anti-ageing strategies offered by Mother Nature (but not only), ProMoAge Protein Modification: A Key Mechanism for Ageing, Γερμανία, Μάιος 2019 (*αναρτημένη ανακοίνωση*)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|       |                                                                                 |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....                                                                   | 29 |
| 1.1   | Γήρανση .....                                                                   | 29 |
| 1.1.1 | Η γήρανση ως μια φυσιολογική διαδικασία .....                                   | 29 |
| 1.1.2 | Πειραματική προσέγγιση της γήρανσης .....                                       | 40 |
| 1.1.3 | Γήρανση και ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες.....                                   | 48 |
| 1.2   | Πρωτεάσωμα.....                                                                 | 54 |
| 1.2.1 | Το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος.....                                      | 54 |
| 1.2.2 | Ενναλακτικές μορφές πρωτεασώματος .....                                         | 63 |
| 1.2.3 | Ρύθμιση της πρωτεασωματικής έκφρασης.....                                       | 64 |
| 1.2.4 | Πρωτεάσωμα και γήρανση .....                                                    | 66 |
| 1.2.5 | Πρωτεάσωμα και ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες.....                                | 68 |
| 1.3   | Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος.....                                             | 70 |
| 1.4   | Σκοπός διδακτορικής διατριβής .....                                             | 77 |
| 2     | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....                                                          | 79 |
| 2.1   | Υλικά.....                                                                      | 79 |
| 2.1.1 | Χημικά αντιδραστήρια.....                                                       | 79 |
| 2.1.2 | Αντισώματα .....                                                                | 80 |
| 2.1.3 | Κυτταροκαλλιέργειες.....                                                        | 81 |
| 2.1.4 | Νηματώδης σκόληκας <i>C. elegans</i> .....                                      | 83 |
| 2.1.5 | Διαλύματα.....                                                                  | 86 |
| 2.1.6 | Διάλυση και αποθήκευση ενώσεων .....                                            | 89 |
| 2.2   | Μέθοδοι.....                                                                    | 90 |
| 2.2.1 | Χορήγηση εν δυνάμει ενεργοποιητών του πρωτεασώματος σε κύτταρα<br>90            |    |
| 2.2.2 | Απομόνωση πρωτεϊνών για μέτρηση πρωτεολυτικής ενεργότητας<br>πρωτεασώματος..... | 90 |

|        |                                                                                                |     |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.3  | Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford                           | 91  |
| 2.2.4  | Μέτρηση της πρωτεολυτικής ενεργότητας του πρωτεασώματος                                        | 92  |
| 2.2.5  | Συνεχής καλλιέργεια κυττάρων παρουσία ενώσεων                                                  | 93  |
| 2.2.6  | Χρώση β-γαλακτοσιδάσης                                                                         | 93  |
| 2.2.7  | Scratch assay                                                                                  | 94  |
| 2.2.8  | Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών                                                                     | 94  |
| 2.2.9  | Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο DC                                 | 95  |
| 2.2.10 | SDS PAGE-Ανοσοαποτύπωση (Western blot)                                                         | 96  |
| 2.2.11 | Μέτρηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Oxyblot)                                                        | 99  |
| 2.2.12 | Μέτρηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS assay)                                               | 100 |
| 2.2.13 | Δοκιμές οξειδωτικού στρες                                                                      | 101 |
| 2.2.14 | Μέτρηση της ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD                                      | 102 |
| 2.2.15 | Δοκιμασία κηλίδωσης με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet assay)                                | 103 |
| 2.2.16 | Χορήγηση των ενώσεων στο νηματώδη σκώληκα <i>C. elegans</i>                                    | 104 |
| 2.2.17 | Δοκιμασία παράλυσης των σκωλήκων (Paralysis assay)                                             | 105 |
| 2.2.18 | Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης για την εκτίμηση των Αβ συσσωματωμάτων <i>in vivo</i>   | 106 |
| 2.2.19 | Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης για την εκτίμηση της Αβ νευροτοξικότητας <i>in vivo</i> | 106 |
| 2.2.20 | Απόκριση των σκωλήκων σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα (Mechanosensation)                             | 107 |
| 2.2.21 | Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής των σκωλήκων (Lifespan assay)                           | 108 |
| 2.2.22 | Φαινοτυπική ανάλυση των σκωλήκων                                                               | 109 |
| 2.2.23 | Στατιστική ανάλυση                                                                             | 110 |
| 3      | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ                                                                                   | 111 |

|       |                                                                                                                                                                                   |     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1   | Φυσικές ενώσεις.....                                                                                                                                                              | 111 |
| 3.1.1 | Ταυτοποίηση ενός φυσικού μεταβολίτη προερχόμενο από θαλάσσιο οργανισμό της Μεσογείου Θάλασσας με ενεργοποιητική δράση έναντι του πρωτεασώματος.....                               | 111 |
| 3.1.2 | Ο μεταβολίτης DBTO ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα <i>in vitro</i> απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος .....                                                                           | 118 |
| 3.1.3 | Ο μεταβολίτης DBTO ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου.....                                                                    | 120 |
| 3.1.4 | Ο μεταβολίτης DBTO βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου.....                                                                        | 122 |
| 3.1.5 | Ο μεταβολίτης DBTO δεν επηρεάζει βασικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου .....                                                                                         | 127 |
| 3.1.6 | Ο μεταβολίτης DBTO αυξάνει την ανθεκτικότητα στην πρωτοετοξικότητα που προκαλείται από το Αβ πεπτίδιο σε ανθρώπινα κύτταρα SH-SY5Y, μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος..... | 129 |
| 3.1.7 | Ο μεταβολίτης DBTO προστατεύει έναντι της Αβ-τοξικότητας σε οργανισμικό επίπεδο.....                                                                                              | 132 |
| 3.1.8 | Ο μεταβολίτης DBTO βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε οργανισμικό επίπεδο χωρίς παρουσία τοξικότητας .....                                                                              | 138 |
| 3.2   | Συνθετικές ενώσεις.....                                                                                                                                                           | 142 |
| 3.2.1 | Η υβριδική ένωση MK151 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα <i>in vitro</i> απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος.....                                                                        | 143 |
| 3.2.2 | Η ένωση MK151 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου.....                                                                         | 146 |
| 3.2.3 | Η ένωση MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου.....                                 | 149 |
| 3.2.4 | Η ένωση MK151 δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση <i>in vitro</i> .....                                                                                                          | 156 |
| 3.2.5 | Η ένωση MK151 βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε οργανισμικό επίπεδο χωρίς παρουσία τοξικότητας .....                                                                                   | 159 |

|        |                                                                                                                               |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.6  | Η ένωση MK151 δε βελτιώνει την επιβίωση των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου που εκτίθενται στο Αβ πεπτίδιο ..... | 168 |
| 3.2.7  | Η ένωση MK151 προστατεύει έναντι της Αβ-τοξικότητας σε οργανισμικό επίπεδο.....                                               | 171 |
| 3.2.8  | Μελέτη της επίδρασης του μήκους του συνδέτη (spacer) στη δράση των υβριδικών ενώσεων .....                                    | 174 |
| 3.2.9  | Μελέτη παράγωγων ενώσεων της ένωσης MK151 .....                                                                               | 192 |
| 3.2.10 | Μελέτη οξαθειϊνικών αναλόγων της ένωσης MK151 .....                                                                           | 195 |
| 4      | ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....                                                                                                                | 217 |
| 4.1    | Φυσικές ενώσεις.....                                                                                                          | 218 |
| 4.2    | Συνθετικές ενώσεις.....                                                                                                       | 224 |
| 5      | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....                                                                                                            | 234 |
| 6      | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....                                                                                                               | 281 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Πίνακας 2-1: Χημικά αντιδραστήρια.....                                                                                                                                                                    | 79  |
| Πίνακας 2-2: Αντισώματα. ....                                                                                                                                                                             | 80  |
| Πίνακας 2-3: Στελέχη νηματώδους σκώληκα <i>C. elegans</i> . ....                                                                                                                                          | 83  |
| Πίνακας 2-4: Διαλύματα. ....                                                                                                                                                                              | 86  |
| Πίνακας 3-1: Ομαδοποίηση των 26 μεταβολιτών που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς της ανατολικής Μεσογείου Θάλασσας και ελέγχθηκαν για την ενεργοποιητική τους δράση έναντι του πρωτεασώματος. .... | 112 |
| Πίνακας 3-2: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> που εκτέθηκαν σε 5 µg/ml DBTO ή σε DMSO. ....                                                                            | 141 |
| Πίνακας 3-3: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> που εκτέθηκαν σε 2 µg/ml MK151 ή σε DMSO. ....                                                                           | 162 |
| Πίνακας 3-4: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> που εκτέθηκαν σε 2 µg/ml TC369 ή σε DMSO.....                                                                            | 207 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 1.1: Τα δώδεκα ορόσημα της γήρανσης (hallmarks of aging) .....                                                                                                                                                                                                                           | 31  |
| Εικόνα 1.2: Αίτια και επιπτώσεις της κυτταρικής γήρανσης.....                                                                                                                                                                                                                                   | 36  |
| Εικόνα 1.3: Ο ρόλος του γενετικού τόπου CDKN2A στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.....                                                                                                                                                                                                           | 38  |
| Εικόνα 1.4: Οι μορφολογικές, μοριακές και βιοχημικές αλλαγές που αποκτούν τα γηρασμένα κύτταρα. ....                                                                                                                                                                                            | 41  |
| Εικόνα 1.5: Χρώσης β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) που έχει πραγματοποιηθεί σε κυτταρικές σειρές πρόδρομων λιποκυττάρων του ανθρώπου. ....                                                                                                                                                          | 43  |
| Εικόνα 1.6: Ο κύκλος ζωής του νηματώδη σκώληκα <i>C. elegans</i> .....                                                                                                                                                                                                                          | 46  |
| Εικόνα 1.7: Παρατηρώντας το <i>C. elegans</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                            | 47  |
| Εικόνα 1.8: Το αμυλοειδογενές και το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι μέσω των οποίων πραγματοποιείται η μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του β αμυλοειδούς, APP.....                                                                                               | 51  |
| Εικόνα 1.9: Συσσωμάτωση του Αβ πεπτιδίου και της πρωτεΐνης tau. ....                                                                                                                                                                                                                            | 52  |
| Εικόνα 1.10: Η δομή του ανθρώπινου 26S πρωτεασώματος.....                                                                                                                                                                                                                                       | 55  |
| Εικόνα 1.11: Το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος.....                                                                                                                                                                                                                                         | 57  |
| Εικόνα 1.12: Το μοντέλο συναρμολόγησης του 20S καταλυτικού κέντρου του πρωτεασώματος .....                                                                                                                                                                                                      | 60  |
| Εικόνα 1.13: Το μοντέλο συναρμολόγησης της 19S ρυθμιστικής υπομονάδας του πρωτεασώματος .....                                                                                                                                                                                                   | 62  |
| Εικόνα 1.14: Τρόποι πρωτεασωμικής ενεργοποίησης.....                                                                                                                                                                                                                                            | 76  |
| Εικόνα 3.1: Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης των 26 μεταβολιτών απομονωμένων από θαλάσσιους οργανισμούς της Μεσογείου Θάλασσας με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. .... | 113 |
| Εικόνα 3.2: Χημική σύσταση των μεταβολιτών που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς της ανατολικής Μεσογείου Θάλασσας και ελέγχθηκαν για την ενεργοποιητική τους δράση έναντι του πρωτεασώματος. ....                                                                                        | 114 |
| Εικόνα 3.3: Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης του μεταβολίτη MAR185 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος.....                                                                | 115 |

|                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.4: Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, ανθρώπινους, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες μετά από δίωρη και εικοσιτετράωρη έκθεση στο μεταβολίτη MAR185. ....                                                | 116 |
| Εικόνα 3.5: Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στους μεταβολίτες MAR169, MAR173, MAR176, MAR191 και MAR211. ....                    | 117 |
| Εικόνα 3.6: Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω του μεταβολίτη MAR176 in vitro και in cellulo. ....                                                                                                                             | 118 |
| Εικόνα 3.7: Η χημική δομή του μεταβολίτη (1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (DBTO) ....                                                                                                                                     | 119 |
| Εικόνα 3.8: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L), κασπάσης (C-L) και τρυψίνης (T-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης του μεταβολίτη DBTO με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος..... | 119 |
| Εικόνα 3.10: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω του μεταβολίτη DBTO in cellulo.....                                                                                                                                                             | 121 |
| Εικόνα 3.11: Η χορήγηση του μεταβολίτη DBTO δε μεταβάλλει την πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος in cellulo. ....                                                                                                               | 122 |
| Εικόνα 3.12: Αποτίμηση της αντιγηραντικής δράσης του μεταβολίτη DBTO στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.....                                                                                                                             | 124 |
| Εικόνα 3.13: Η ένωση DBTO βελτιώνει την ευζωία (healthspan) στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. ....                                                                                                                                     | 127 |
| Εικόνα 3.14: Απουσία ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μηχανισμών παρουσία του μεταβολίτη DBTO. ....                                                                                                                                                 | 129 |
| Εικόνα 3.15: Η χορήγηση του μεταβολίτη DBTO βελτιώνει την επιβίωση των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου που επιβαρύνονται από την έκθεση στο Αβ πεπτίδιο μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος. ....                              | 132 |
| Εικόνα 3.16: Η έκθεση του στελέχους CL4176 στο μεταβολίτη DBTO επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου. ....                                                               | 133 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.17: Ο μεταβολίτης DBTO επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγώμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου μειώνοντας τα συνολικά επίπεδα του Αβ πεπτιδίου στο διαγονιδιακό στέλεχος CL4176. ....                                                   | 134 |
| Εικόνα 3.18: Ο μεταβολίτης DBTO μειώνει την εναπόθεση των συσσωματωμάτων του Αβ <sub>3-42</sub> πεπτιδίου στους μυς του διαγονιδιακού στελέχους CL2331. ....                                                                                                                           | 135 |
| Εικόνα 3.19: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία νηματώδη σκώληκα του διαγονιδιακού στελέχους UA198 που εκφράζει το ανθρώπινο Αβ <sub>1-42</sub> πεπτίδιο συζευγμένο με GFP στους γλουταματεργικούς νευρώνες.....                                                                              | 136 |
| Εικόνα 3.20: Ο μεταβολίτης DBTO προστατεύει από το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το Αβ <sub>1-42</sub> πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198.....                                                                                           | 138 |
| Εικόνα 3.21: Ο μεταβολίτης DBTO δεν αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> .....                                                                                                                                                                  | 139 |
| Εικόνα 3.22: Χημική δομή των νέων υβριδικών ενώσεων.....                                                                                                                                                                                                                               | 143 |
| Εικόνα 3.23: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK151 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. ....                                                                           | 144 |
| Εικόνα 3.24: Η ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK151 με το απομονωμένο, καθαρό ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος οφείλεται στο συνδυασμό των R- και S-ισομερών. .... | 145 |
| Εικόνα 3.25: Η χημική δομή της ένωσης MK151 και των ισομερών της, MK213 (R-ισομερές) και MK216 (S-ισομερές).....                                                                                                                                                                       | 146 |
| Εικόνα 3.26: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση MK151.....                                                                                                                      | 147 |
| Εικόνα 3.27: Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση MK151 οφείλεται στο συνδυασμό των R- και S-ισομερών. ....                                                                     | 148 |
| Εικόνα 3.28: Η χορήγηση της ένωσης MK151 δε μεταβάλλει την πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος in cellulose. ....                                                                                                                                                      | 149 |
| Εικόνα 3.29: Η ένωση MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                                                                                                                                           | 151 |

|                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.30: Η ένωση MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                    | 155 |
| Εικόνα 3.31: Η χορήγηση της ένωσης MK151 δεν επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση των πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου έπειτα από την επίδραση με H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .... | 157 |
| Εικόνα 3.32: Η χορήγηση της ένωσης MK151 δεν προστατεύει τους πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου έπειτα από την επίδραση με παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες. ....        | 158 |
| Εικόνα 3.33: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) C. elegans μετά από έκθεση στην ένωση MK151. ....                                                                           | 159 |
| Εικόνα 3.34: Η ένωση MK151 δεν αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) C. elegans. ....                                                                                             | 161 |
| Πίνακας 3-3: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) C. elegans που εκτέθηκαν σε 2 µg/ml MK151 ή σε DMSO. ....                                                                              | 162 |
| Εικόνα 3.35: Η ένωση MK151 αυξάνει το φαρυγγικό παλμό των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) C. elegans κατά τη γήρανση. ....                                                                                 | 163 |
| Εικόνα 3.36: Η ένωση MK151 μειώνει το χρόνο μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) C. elegans την έκτη (6 <sup>η</sup> ) ημέρα της ενήλικης ζωής τους. ....                    | 165 |
| Εικόνα 3.37: Η ένωση MK151 αυξάνει την κινητικότητα των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) C. elegans την τρίτη (3 <sup>η</sup> ) και έκτη (6 <sup>η</sup> ) ημέρα της ενήλικης ζωής τους. ....               | 167 |
| Εικόνα 3.38: Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη και δώωρη έκθεση στην ένωση MK151. ....                            | 168 |
| Εικόνα 3.39: Η χορήγηση της ένωσης MK151 δε βελτιώνει στατιστικά σημαντικά την επιβίωση των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y που επιβαρύνονται από την έκθεση στο Αβ πεπτίδιο. ....                    | 170 |
| Εικόνα 3.40: Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ουσία MK151 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου. ....                       | 171 |

|                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.41: Η ένωση MK151 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης από τη<br>θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου στο διαγονιδιακό στέλεχος CL4176.<br>.....                                                                                   | 172 |
| Εικόνα 3.42: Η ένωση MK151 μειώνει την εναπόθεση των συσσωματωμάτων του<br>Αβ <sub>3-42</sub> πεπτιδίου στους μυς του διαγονιδιακού στελέχους CL2331.....                                                                                                | 173 |
| Εικόνα 3.43: Η ένωση MK151 δε προστατεύει στατιστικά σημαντικά από το<br>νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το Αβ <sub>1-42</sub> πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς<br>νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198.....                                    | 174 |
| Εικόνα 3.44: Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας<br>χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης<br>MK218, MK220 και MK210 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού<br>περιβάλλοντος..... | 175 |
| Εικόνα 3.45: Χημική δομή της ένωσης MK151 και των συνθετικών αναλόγων<br>MK218, MK220 και MK210. ....                                                                                                                                                    | 176 |
| Εικόνα 3.46: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L)<br>μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK218 με το καθαρό<br>πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. ....                                       | 177 |
| Εικόνα 3.47: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς,<br>εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην<br>ένωση MK218.....                                                                                  | 177 |
| Εικόνα 3.48: Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.1 µg/ml επιμηκύνει το κυτταρικό<br>προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών<br>HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                                       | 181 |
| Εικόνα 3.49: Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.25 µg/ml επιμηκύνει το κυτταρικό<br>προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών<br>HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                                      | 185 |
| Εικόνα 3.50: Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml επιμηκύνει το κυτταρικό<br>προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου.....                                                                                                 | 189 |
| Εικόνα 3.51: Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 5 µg/ml παρουσιάζει κυτταροτοξική<br>δράση στο προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του<br>ανθρώπου. ....                                                                                   | 190 |
| Εικόνα 3.52: Η ένωση MK218 αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου<br>τύπου (N2) C. elegans.....                                                                                                                                                  | 191 |

|                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.53: Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ένωση MK218 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου. ....                                                           | 192 |
| Εικόνα 3.54: Χημική δομή των ενώσεων MK212 και MK215. ....                                                                                                                                                                                | 193 |
| Εικόνα 3.55: Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK212 και MK215 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. .... | 193 |
| Εικόνα 3.56: Η έκθεση του στελέχους CL4176 στις ενώσεις MK212 και MK215 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου. ....                                               | 194 |
| Εικόνα 3.57: Χημική δομή της ένωσης TC369. ....                                                                                                                                                                                           | 195 |
| Εικόνα 3.58: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης TC369 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. ....                              | 196 |
| Εικόνα 3.59: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης των ενώσεων MK151 και TC369 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. ....                   | 197 |
| Εικόνα 3.60: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση TC369. ....                                                                        | 198 |
| Εικόνα 3.61: Η ένωση TC369 στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 µg/ml δεν επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                                                       | 199 |
| Εικόνα 3.62: Η ένωση TC369 στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                              | 201 |
| Εικόνα 3.63: Η ένωση TC369 στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml δεν επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής, αλλά βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. ....                                        | 204 |
| Εικόνα 3.64: Η ένωση TC369 αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) C. elegans. ....                                                                                                                                     | 206 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.65: Η ένωση TC369 αυξάνει το φαρυγγικό παλμό των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> κατά τη γήρανση. ....                                                                                                                                                                   | 208 |
| Εικόνα 3.66: Η ένωση TC369 μειώνει το χρόνο των διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> την έκτη (6 <sup>η</sup> ) ημέρα της ενήλικης ζωής τους .....                                                                                                             | 209 |
| Εικόνα 3.67: Η ένωση TC369 αυξάνει την κινητικότητα των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) <i>C. elegans</i> την τρίτη (3 <sup>η</sup> ) ημέρα της ενήλικης ζωής τους.....                                                                                                                             | 210 |
| Εικόνα 3.68: Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ουσία TC369 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου. ....                                                                                                                | 212 |
| Εικόνα 3.69: Σύγκριση των βέλτιστων συγκεντρώσεων των ενώσεων MK151 και TC369 στη δοκιμασία παράλυσης στο στέλεχος CL4176.....                                                                                                                                                                 | 213 |
| Εικόνα 3.70: Η ένωση TC369 δε μειώνει στατιστικά σημαντικά την εναπόθεση των συσσωματωμάτων του Αβ <sub>3-42</sub> πεπτιδίου στους μυς του διαγονιδιακού στελέχους CL2331 στο τέταρτο στάδιο της ανάπτυξής τους.....                                                                           | 213 |
| Εικόνα 3.71: Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης TC487 και TC394 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος.....                                                       | 214 |
| Εικόνα 3.72: Χημική δομή των ενώσεων TC369, TC487 και TC394.....                                                                                                                                                                                                                               | 215 |
| Εικόνα 3.73: Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ένωση TC487, αλλά όχι στην TC394, επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου. ....                                                                                          | 216 |
| Εικόνα 6.1: Η ζωτικότητα των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y που εκτίθενται σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει Αβ πεπτίδιο (CM <sub>Αβ</sub> ) μειώνεται στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτίθενται στο αντίστοιχο μέσο καλλιέργειας που δεν περιέχει Αβ πεπτίδια (CM). .... | 281 |
| Εικόνα 6.2: (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για 88 συνεχόμενες ημέρες. ....                                                | 281 |

|                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 6.3: Η ένωση MK151 προστατεύει από το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το Αβ <sub>1-42</sub> πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198. .... | 282 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

|                                   |                                                     |                                                               |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>18α-GA</b>                     | 18α-glycyrrhetic acid                               | 18α-γλυκυρρητινικό οξύ                                        |
| <b>Aβ</b>                         |                                                     | β-αμυλοειδές πεπτίδιο                                         |
| <b>AAA+</b>                       | ATPases associated with various cellular activities | ΑΤΡάσες που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες |
| <b>AD</b>                         | Alzheimer's disease                                 | Νόσος Αλτσχάιμερ                                              |
| <b>AICD</b>                       | APP intracellular C-terminal domain                 | Ενδοκυτταρική C-τελική περιοχή της APP                        |
| <b>ALS</b>                        | Amyotrophic Lateral Sclerosis                       | Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση                                |
| <b>APP</b>                        | β-amyloid precursor protein                         | Πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς                           |
| <b>AREs</b>                       | Antioxidant response elements                       | Στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης                            |
| <b>BSA</b>                        | Bovine serum albumin                                | Αλβουμίνη ορού βοός                                           |
| <b>CCFs</b>                       | Cytoplasmic chromatin fragments                     | Θραύσματα χρωματίνης στο κυτταρόπλασμα                        |
| <b>CP</b>                         | Core particle                                       | Καταλυτικό κέντρο                                             |
| <b>CPD</b>                        | Cumulative population doublings                     | Αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού   |
| <b>C-L proteasome activity</b>    | caspase-like proteasome activity                    | Ενεργότητα κασπάσης του πρωτεασώματος                         |
| <b>CT-L proteasome activity</b>   | Chymotrypsin-like proteasome activity               | Ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος                     |
| <b>DMSO</b>                       | dimethyl sulphoxide                                 | Διμεθυλοσουλφοξείδιο                                          |
| <b>GFP</b>                        | Green fluorescent protein                           | Πράσινη φθορίζουσα χρωστική                                   |
| <b>GSTs</b>                       | Glutathione S-transferases                          | S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης                               |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hydrogen peroxide                                   | Υπεροξείδιο του υδρογόνου                                     |
| <b>DMEM</b>                       | Dulbecco's modified Eagle's medium                  |                                                               |
| <b>DUBs</b>                       | Deubiquitinating enzymes                            | Ένζυμα απο-ουμπικιτινυλίωσης                                  |
| <b>FBS</b>                        | Fetal bovine serum                                  | Ορός εμβρύου βοός                                             |
| <b>FoxO</b>                       | Forkhead box O                                      |                                                               |
| <b>GAPDH</b>                      | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase            | Γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική αφυδρογονάση                        |
| <b>HD</b>                         | Huntington's disease                                | Νόσος Χάντινγκτον                                             |
| <b>HO-1</b>                       | Heme oxygenase-1                                    | Οξυγενάση της αίμης 1                                         |
| <b>HRP</b>                        | Horse peroxidase                                    | Υπεροξειδάση του χρένου                                       |

|                    |                                             |                                                      |
|--------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>IGF-1</b>       | Insulin-like growth factor 1                | Αυξητικός παράγοντας ομοιάζων στην ινσουλίνη-1       |
| <b>IDRs</b>        | Intrinsically disordered regions            | Εγγενώς αποδιοργανωμένες περιοχές                    |
| <b>IIS pathway</b> | Insulin and IGF-1 signaling pathway         | Μονοπάτι μεταγωγής σήματος ινσουλίνης/IGF-1          |
| <b>Keap1</b>       | Kelch-like ECH-associated protein 1         |                                                      |
| <b>Maf</b>         | Musculoaponeurotic fibrosarcoma             |                                                      |
| <b>NFTs</b>        | Neurofibrillary tangles                     | Νευροϊνιδιακά δεμάτια                                |
| <b>NGM</b>         | Nematode Growth Media                       | Μέσο ανάπτυξης νηματωδών                             |
| <b>NQO-1</b>       | NADPH quinone oxidoreductase-1              | Οξειδοαναγωγή της NAD(P)H κινάσης                    |
| <b>Nrf1</b>        | Nuclear factor erythroid 2-related factor 1 |                                                      |
| <b>Nrf2</b>        | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |                                                      |
| <b>PAC1</b>        | Proteasome assembly chaperone 1             |                                                      |
| <b>PACE</b>        | Proteasome-associated control element       |                                                      |
| <b>Pba1</b>        | Proteasome biogenesis-associated 1          |                                                      |
| <b>PBS</b>         | Phosphate-Buffered Saline                   | Διάλυμα φωσφορικών αλάτων                            |
| <b>PD</b>          | population doubling                         | πληθυσμιακός διπλασιασμός                            |
| <b>PD</b>          | Parkinson's disease                         | Νόσος Πάρκινσον                                      |
| <b>POMP</b>        | Proteasome maturation protein               |                                                      |
| <b>RACs</b>        | RP assembly chaperons                       |                                                      |
| <b>ROS</b>         | Reactive Oxygen Species                     | Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου                             |
| <b>RP</b>          | Regulatory particle                         | Ρυθμιστική υπομονάδα                                 |
| <b>rpm</b>         | Rounds/minute                               | Στροφές ανά λεπτό                                    |
| <b>RPMI</b>        | Roswell Park Memorial Institute             |                                                      |
| <b>Rpt</b>         | Regulatory particle triple A protein 1      |                                                      |
| <b>Rpn1</b>        | Regulatory particle non-ATPase 1            |                                                      |
| <b>SA-β-gal</b>    | Senescence-associated beta-galactosidase    | Ένζυμο σχετιζόμενο με τη γήρανση β γαλακτοσιδάση     |
| <b>SAHF</b>        | Senescence-associated heterochromatin foci  | Εστίες ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με τη γήρανση |

|                                |                                           |                                                |
|--------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>SASP</b>                    | Senescence-associated secretory phenotype | Φαινότυπος έκκρισης σχετιζόμενος με τη γήρανση |
| <b>SDS</b>                     | Sodium dodecyl sulfate                    | Δωδεκυλο-θειικό νατρίο                         |
| <b>SISP</b>                    | Stress-induced premature senescence       | Πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες            |
| <b>SOD</b>                     | Superoxide dismutase                      | Υπεροξειδική δισμουτάση                        |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tumor necrosis factor- $\alpha$           | Παράγοντας νέκρωσης όγκων- $\alpha$            |
| <b>T-L proteasome activity</b> | Trypsin-like proteasome activity          | Ενεργότητα θρυψίνης του πρωτεασώματος          |
| <b>Ub</b>                      | ubiquitin                                 | Ουμπικιτίνη                                    |
| <b>Ump1</b>                    | Underpinning maturation of proteasome 1   |                                                |
| <b>UPS</b>                     | Ubiquitin-proteasome system               | Σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος             |
| <b>Wt</b>                      | Wild-type                                 | Αγρίου τύπος                                   |
| <b><math>\gamma</math>-GCS</b> | $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase     | Συνθετάση $\gamma$ -γλουταμυλ-κυστεΐνης        |

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γήρανση

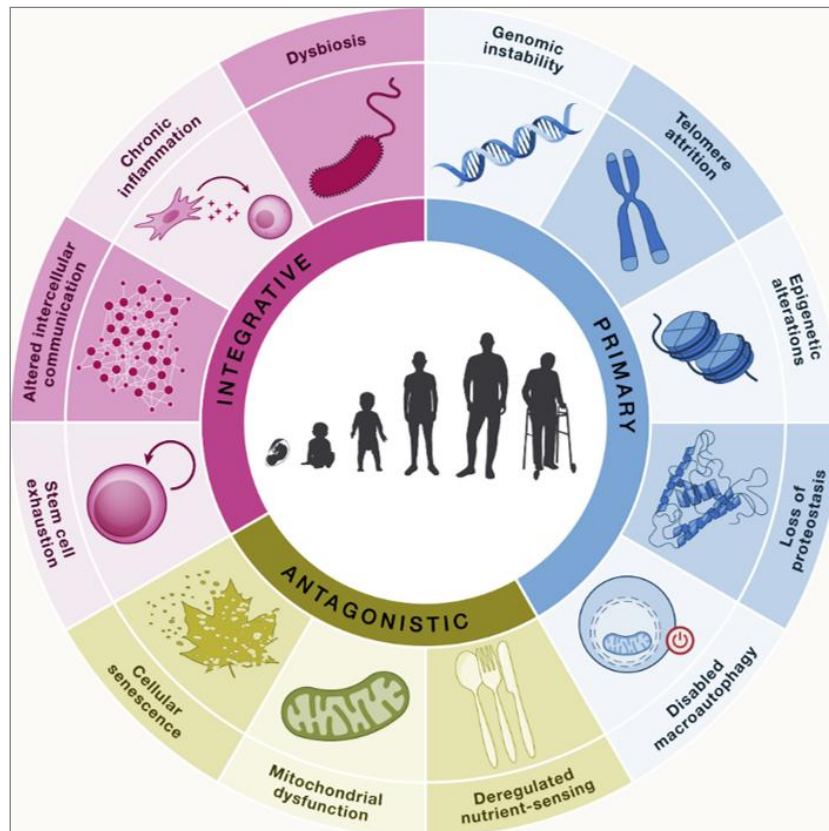
### 1.1.1 Η γήρανση ως μια φυσιολογική διαδικασία

Η γήρανση (aging) είναι μια φυσιολογική διαδικασία που χαρακτηρίζεται από τη χρονο-εξαρτώμενη φθίνουσα πορεία της φυσιολογικής ακεραιότητας του οργανισμού και είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Έχει συσχετιστεί με προοδευτική μείωση της λειτουργικότητας όλων των ιστών και των οργάνων, καθώς και με σταδιακή απώλεια της φυσικής και πνευματικής ικανότητας των οργανισμών. Ο συνδυασμός των παραπάνω καθιστά τους οργανισμούς ευάλωτους ενισχύοντας παράλληλα τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών, όπως καρκίνο, διαβήτη, καρδιαγγειακά νοσήματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μεταξύ άλλων (Campisi, 2013; Hernandez-Segura et al., 2018; López-Otín et al., 2013). Η γήρανση αποτελεί σύνθετη διαδικασία που εξαρτάται τόσο από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όσο και από τον τρόπο διαβίωσης των οργανισμών (Kirkwood, 2005), οδηγώντας αναπόφευκτα στο θάνατο.

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των γηρασμένων οργανισμών είναι η συσσώρευση κυτταρικής γήρανσης (cellular senescence), μιας κατάστασης που χαρακτηρίζεται από οριστική παύση του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε πληθώρα ερεθισμάτων που υποδηλώνουν κυτταρική βλάβη και διαταράσσουν την ομοιόσταση των κυττάρων (López-Otín et al., 2023; Rodier & Campisi, 2011). Τα γηρασμένα κύτταρα δε μπορούν να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο, καθιστώντας την κυτταρική γήρανση ως μια μη-αντιστρέψιμη κατάσταση (Sharpless & Sherr, 2015). Η έννοια της κυτταρικής γήρανσης εισήχθη πριν από περίπου 60 χρόνια έπειτα από την παρατήρηση των Leonard Hayflick και Paul Moorhead ότι οι φυσιολογικοί, εμβρυϊκοί ινοβλάστες του ανθρώπου υφίσταται συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων στην καλλιέργεια, παραμένοντας ζωντανοί και μεταβολικά ενεργοί (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961). Αργότερα, μελέτες έδειξαν ότι γηρασμένα κύτταρα εντοπίζονται και *in vivo*, με τον αριθμό τους να αυξάνεται καθώς οι οργανισμοί γηράσκουν (He & Sharpless, 2017; Rodier & Campisi, 2011). Η συσσώρευση των γηρασμένων κυττάρων στους ιστούς επηρεάζει αρνητικά την αναγεννητική ικανότητά τους, ενώ παράλληλα δημιουργεί ένα προ-φλεγμονώδες περιβάλλον που ευνοεί τόσο την έναρξη όσο και την εξέλιξη πολλών ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών. Εντούτοις, τα γηρασμένα κύτταρα συμπαρασύρουν και ωφέλιμες λειτουργίες για τον οργανισμό· διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση κατά την ανάπτυξη των οργανισμών, συμβάλλουν στην επούλωση των πληγών, παρεμποδίζουν τη δημιουργία νεοπλασιών, «στρατολογούν» κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για την καταπολέμηση ιών, μεταξύ άλλων (Campisi, 2013; He & Sharpless, 2017; W. Huang et al., 2022; López-Otín et al., 2023; Mohamad Kamal et al., 2020; Sharpless & Sherr, 2015).

## Τα ορόσημα της γήρανσης: μηχανισμοί και αιτίες

Λόγω της πολυπλοκότητας και της πολυπαραγοντικότητας της γήρανσης, έχουν καταγραφεί και περιγραφεί κοινά χαρακτηριστικά που διέπουν τη διαδικασία της γήρανσης μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών, με έμφαση στα θηλαστικά. Οι Lopez-Otín και συνεργάτες, κατέληξαν το 2013 σε εννέα ορόσημα (hallmarks) της γήρανσης (López-Otín et al., 2013), ενώ το 2023 προστέθηκαν ακόμη τρία οδηγώντας τελικά στο συνολικό αριθμό των δώδεκα (López-Otín et al., 2023). Κάθε παράγοντας που κατηγοριοποιείται σαν ορόσημο της γήρανσης πρέπει να χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα τρία κριτήρια: πρέπει να εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής διαδικασίας της γήρανσης, η επιδείνωση του παράγοντα να επιταχύνει τη γήρανση πειραματικά και τέλος, η βελτίωσή του μέσω θεραπευτικών παρεμβάσεων είτε να επιβραδύνει, είτε να σταματά, είτε ακόμη και να ανατρέπει τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης και ταυτοχρόνως να αυξάνει την ευζωία (healthspan) (López-Otín et al., 2023). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1, τα δώδεκα ορόσημα της γήρανσης, τα οποία περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω, είναι τα εξής: γενωμική αστάθεια, μείωση του μήκους των τελομερών, επιγενετικές τροποποιήσεις, απώλεια της πρωτεόστασης, δυσλειτουργία της μακρο-αυτοφαγίας, απορρύθμιση της ανίχνευσης θρεπτικών, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, κυτταρική γήρανση, εξάντληση των βλαστοκυττάρων, μεταβολή της διακυτταρικής επικοινωνίας, χρόνια φλεγμονή και δυσβίωση (López-Otín et al., 2023). Τα δώδεκα αυτά ορόσημα της γήρανσης συνδέονται στενά μεταξύ τους και ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ως εξής: στα πρωτογενή χαρακτηριστικά (primary hallmarks) τα οποία αντικατοπτρίζουν βλάβες που συμβαίνουν στο γονιδίωμα, στα τελομερή, στο επιγένομα, στο πρωτέωμα και σε κυτταρικά οργανίδια, συσσωρεύονται με το γήρας και συνεισφέρουν αδιαμφισβήτητα στη διαδικασία της γήρανσης, τα ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά (antagonistic hallmarks) που έχουν διττό ρόλο λειτουργώντας είτε ωφέλιμα είτε ως προ-γηραντικοί παράγοντες ανάλογα τις συνθήκες και το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο οργανισμός, και τέλος στα ολοστικά χαρακτηριστικά (integrative hallmarks) που αναδύονται λόγω της συσσώρευσης των άλλων δύο, τα οποία μη καταφέροντας να αντισταθμιστούν οδηγούν σε εξάντληση των βλαστικών κυττάρων, χρόνια φλεγμονή και δυσβίωση, καταλήγοντας τελικά στη γήρανση.



**Εικόνα 1.1:** Τα δώδεκα ορόσημα της γήρανσης (*hallmarks of aging*) (López-Otin C. et. al., 2023).

## Πρωτογενή χαρακτηριστικά

### Γενομική αστάθεια (Genomic instability)

Η γονιδιωματική σταθερότητα των οργανισμών απειλείται συνεχώς από πληθώρα εξωγενών χημικών, φυσικών και βιολογικών παραγόντων, καθώς και από ενδογενείς παράγοντες όπως σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA, συνέπειες του μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, οξειδωτικές διαδικασίες και υδρολυτικές αντιδράσεις. Ως αποτέλεσμα αυτών των επιδράσεων παρατηρούνται σημειακές μεταλλάξεις, απαλείψεις, μεταθέσεις, μείωση του μήκους των τελομερών, θραύσεις της διπλής έλικας του DNA, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και πολλά άλλα είδη χρωμοσωμικών ανωμαλιών που συμβάλλουν στη δημιουργία γενομικής αστάθειας. Αυτή η αστάθεια προκαλεί τη δημιουργία δυσλειτουργικών κυττάρων διαταράσσοντας την ομοιοστασία των οργανισμών (Vijg & Dong, 2020). Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται από το γεγονός ότι σύνδρομο πρόωρης γήρανσης, όπως το σύνδρομο Werner (MIM #277700), είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης βλαβών στο DNA (Hennekam, 2020).

Προς αποφυγή των παραπάνω συνεπειών και για τη διατήρηση της ακεραιότητάς τους, οι οργανισμοί διαθέτουν μια σειρά από μηχανισμούς επιδιόρθωσης με σκοπό την εξασφάλιση της σταθερότητας τόσο του πυρηνικού και μιτοχονδριακού τους DNA, όσο και της πυρηνικής αρχιτεκτονικής τους. Εντούτοις, μελέτες έχουν δείξει πως το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA χάνει την αποδοτικότητά του καθώς οι οργανισμοί

γηράσκουν, οδηγώντας σε συσσώρευση γενετικών βλαβών. Θετική συσχέτιση μεταξύ της προοδευτικής αύξησης των γενετικών ανωμαλιών και της γήρανσης έχει αναδειχθεί και μέσω μελετών τόσο σε ποντίκια, όσο και σε ανθρώπους, όπου ανεπάρκειες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA επιταχύνουν τη γήρανση και αποτελούν τη βάση για τα σύνδρομα προγηρίας στους ανθρώπους (Hennekam, 2020; López-Otín et al., 2023). Αντιθέτως, ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA σε ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα οδηγεί σε μακροζωία (North et al., 2014; Tian et al., 2019).

### Μείωση του μήκους των τελομερών (Telomere attrition)

Τα τελομερή εδράζονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων έχοντας δύο αρμοδιότητες: να προστατεύουν τα χρωμοσωμικά άκρα διότι αποτελούν στόχο για το σύστημα επιδιόρθωσης του κυττάρου και να τα επιμηκύνουν εξαιτίας της βράχυνσής τους σε κάθε κύκλο της αντιγραφής. Το μήκος των τελομερών ρυθμίζεται γενετικά και βασίζεται στο σύμπλεγμα των σελτερινών (shelterins), που ενώνεται μέσω ειδικής αλληλουχίας με τα τελομερή, και την τελομεράση, μια αντίστροφη μεταγραφάση που στρατολογείται από το σύμπλεγμα των σελτερινών με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της αλληλουχίας των χρωμοσωμάτων στο φυσικό τους όριο μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Στα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών παρατηρείται μειωμένη ενεργότητα τελομεράσης κατά το γήρας, οδηγώντας σε προγραμματισμένη τελομερική μείωση και σταδιακή βράχυνση των τελομερών, η οποία επακόλουθα ενεργοποιεί τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου καταστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλώντας γήρανση ή απόπτωση (Aubert & Lansdorf, 2008; Shay, 2016). Ανεπάρκεια του ενζύμου της τελομεράσης ή μεταλλάξεις απώλειας της λειτουργικότητας του συμπλέγματος των σελτερινών έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη φαινοτύπων πρόωρης γήρανσης και την εκδήλωση ασθενειών (Aubert & Lansdorf, 2008). Αντίθετα, η ενίσχυση της τελομεράσης καθυστερεί την εμφάνιση της γήρανσης και επιμηκύνει το προσδόκιμο ζωής σε ποντικούς (Jaskelioff et al., 2011; Shim et al., 2021; Tomás-Loba et al., 2008).

### Επιγενετικές τροποποιήσεις (Epigenetic alterations)

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τη σημασία των επιγενετικών τροποποιήσεων στην εξέλιξη της γήρανσης, καθώς αυτές επηρεάζουν σημαντικές κυτταρικές διεργασίες και μεταβάλλουν την έκφραση γονιδίων. Αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, απορρύθμιση της λειτουργίας μη-κωδικών RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs) που στοχεύουν σε αλλαγές στο μεταγράφημα των κυττάρων, καθώς και επανενεργοποίηση ρετροτρασπονζονίων έχουν παρατηρηθεί κατά το γήρας, ενώ παράλληλα έχει δείχθει ότι συνδέονται με την εμφάνιση συνδρόμων πρόωρης γήρανσης σε οργανισμούς-μοντέλα. Ένζυμα που εμπλέκονται στις παραπάνω διεργασίες, όπως οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες, οι ακετυλάσες ιστονών, οι αποακετυλάσες, οι μεθυλάσες και οι απομεθυλάσες, καθώς και πρωτεϊνικά σύμπλοκα που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ή στη σύνθεση και την ωρίμανση των ncRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και τη διατήρηση των επιγενετικών

προτύπων στα κύτταρα. Παρεμβάσεις που περιλαμβάνουν την αποσιώπηση στοιχείων του συμπλέγματος μεθυλίωσης ιστονών ή την υπερέκφραση των αποακετυλασών της οικογένειας SIRT σε οργανισμικά μοντέλα οδηγούν σε μακροζωία (Bordone et al., 2007; Feser et al., 2010; Mostoslavsky et al., 2006; Roichman et al., 2021; W. Zhang et al., 2020).

### Απώλεια της πρωτεόστασης (Loss of proteostasis)

Τόσο η γήρανση όσο και ορισμένες ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease, AD), η νόσος Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD), η νόσος Χάντινγκτον (Huntington's disease, HD) και η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της πρωτεϊνικής ομοιόστασης ή αλλιώς πρωτεόστασης. Όλα τα κύτταρα διαθέτουν μια σειρά μηχανισμών ελέγχου του πρωτεώματός τους με σκοπό τη διατήρηση της ομοιοστασίας τους (M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022). Οι μηχανισμοί αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη σωστή σύνθεση και αναδίπλωση των πρωτεϊνών (μέσω των chaperons και heat-shock factors), καθώς και για την αποικοδόμησή τους (μέσω του πρωτεασώματος ή του λυσοσώματος) στο χρόνο, την ποσότητα και την τοποθεσία που απαιτείται για την εκάστοτε διεργασία στην οποία συμμετέχουν (Balchin et al., 2016). Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί λειτουργούν αρμονικά ώστε να αποκαθιστούν τη δομή των μη σωστά αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων ή, όπου αυτό δεν είναι εφικτό, να προχωρούν στην αποικοδόμησή τους αποτρέποντας έτσι τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τη μειωμένη λειτουργικότητα των κυτταρικών πρωτεοστατικών μηχανισμών καθώς οι οργανισμοί γηράσκουν, η οποία προοδευτικά συνοδεύεται από την επιτάχυνση της πρωτεϊνικής συσσώματωσης. Παράλληλα, η χρόνια έκφραση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών επιτείνει αυτή την ανισορροπία ευνοώντας την εμφάνιση ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών (Hipp et al., 2019; Labbadia & Morimoto, 2015; Morimoto & Cuervo, 2014; Papaevgeniou & Chondrogianni, 2016; M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022).

### Δυσλειτουργία της μακροαυτοφαγίας (Disabled macroautophagy)

Η μακροαυτοφαγία (macroautophagy) περιλαμβάνει το σχηματισμό διπλομεμβρανικών κυστιδίων που απομονώνουν και εγκλωβίζουν στοιχεία που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Τα διπλομεμβρανικά αυτά κυστίδια στη συνέχεια συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα με σκοπό την ανακύκλωση μη-πρωτεϊνικών μακρομορίων (όπως λιπιδικών κυστιδίων, γλυκογόνου και έκτοπου κυτοσολικού DNA), ολόκληρων οργανιδίων (όπως μη λειτουργικών μιτοχονδρίων και λυσοσωμάτων), αλλά και παθογόνων μικροοργανισμών (Kaushik & Cuervo, 2018). Η ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση της λειτουργίας της μακροαυτοφαγίας επηρεάζει σημαντικά, εκτός της διατήρησης της κυτταρικής πρωτεόστασης, και την «ανακύκλωση» κυτταρικών συστατικών και οργανιδίων· γεγονός που υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι σχετίζεται με τη γήρανση.

## Ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά

### Απορρύθμιση ανίχνευσης θρεπτικών (Deregulated nutrient-sensing)

Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανίχνευση θρεπτικών είναι υψηλά διατηρημένα κατά την εξέλιξη των ειδών. Το πρώτο και πιο συντηρημένο εξελικτικά μονοπάτι που έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στον έλεγχο της γήρανσης, είναι εκείνο που πυροδοτείται από την ινσουλίνη και το μεταγραφικό παράγοντα insulin-like growth factor 1 (IGF-1), γνωστό ως «insulin and IGF-1 signaling (IIS) pathway» (C. Kenyon, 2011; C. J. Kenyon, 2010). Το IIS μεταγραφικό μονοπάτι εμπλέκεται στην αύξηση και την ανάπτυξη των οργανισμών μέσω της επακόλουθης ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του PI3K-AKT, του Ras-MEK-ERK και του MTORC1 καθώς και μεταγραφικών παραγόντων, όπως εκείνων που ανήκουν στην οικογένεια forkhead box O (FOXO). Τα μονοπάτια ανίχνευσης θρεπτικών εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η αυτοφαγία, η πρωτεϊνική σύνθεση, ο μεταβολισμός νουκλεοτιδίων και λιπιδίων και η πρωτεασωμική ενεργοποίηση, μεταξύ άλλων. Σε νεαρή ηλικία, η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών προωθεί την αύξηση και ανάπτυξη των οργανισμών, ενώ με το πέρας της ηλικίας, η ενεργοποίησή τους λειτουργεί ως προγηραντικός παράγοντας (López-Otín et al., 2013, 2023). Μελέτες έχουν δείξει ότι απενεργοποίηση των μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών αυξάνει το προσδόκιμο ζωής σε ζώα, ενώ στους ανθρώπους πολυμορφισμοί στο μεταγραφικό παράγοντα FOXO3 έχουν συσχετιστεί με μακροζωία (Bae et al., 2018; Flachsbart et al., 2009; Singh et al., 2019; Willcox et al., 2008).

Σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σηματοδότηση των μονοπατιών αυτών είναι η διατροφή. Η υπερπρόσληψη θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε ενεργοποίησή τους έχοντας ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση κυτταρικών αποκρίσεων στο στρες (όπως η αυτοφαγία, αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και η επιδιόρθωση του DNA), ενώ νηστεία (fasting) ή διατροφικός περιορισμός (dietary restriction) συμβάλλουν στη μακροζωία. Έτσι, μέθοδοι που μιμούνται καταστάσεις μειωμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών, όπως η χρήση ραπαμυκίνης (Harrison et al., 2009; Lattanzi et al., 2014), η διαλειμματική νηστεία (Mattson et al., 2017) ή η κετογονική δίαιτα (Fan et al., 2021) έχουνδειχθεί να αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής και την ευζωία των οργανισμών (López-Otín et al., 2013, 2023). Τέλος, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης AMPK είτε των σιρτουϊνών (sirtuins) ευνοεί καταστάσεις υγιούς γήρανσης μέσω της σηματοδότησης του καταβολισμού και της έλλειψης θρεπτικών (López-Otín et al., 2013).

### Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Mitochondrial dysfunction)

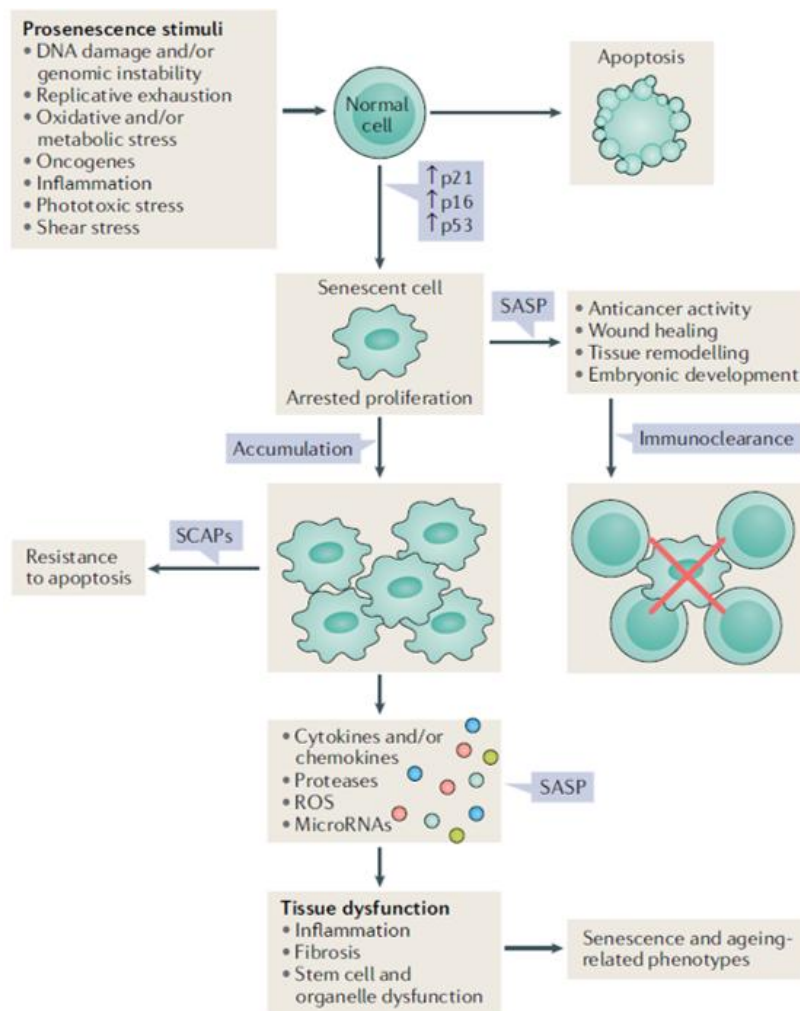
Τα μιτοχόνδρια εκτός από τα «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας των κυττάρων, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της φλεγμονής και στον κυτταρικό θάνατο. Με το γήρας, παρατηρείται μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας εξαιτίας διαφόρων μηχανισμών, όπως συσσώρευση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA, απώλεια της πρωτεόστασης που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, μείωση της ανακύκλωσης των μιτοχονδρίων, καθώς και αλλαγών που επηρεάζουν τη δυναμική τους. Όλα τα παραπάνω διακυβεύουν τη

συνεισφορά των μιτοχονδρίων στην παραγωγή κυτταρικής ενέργειας, ενισχύουν την παραγωγή των δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και πιθανά κάνουν τις μιτοχρονδιακές μεμβράνες ημιπερατές οδηγώντας στη πυροδότηση φλεγμονής και σε κυτταρικό θάνατο. Έτσι, καθώς η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι υψίστης σημασίας για την κυτταρική επιβίωση, η προοδευτική εκφύλισή τους φαίνεται να συνεισφέρει στη γήρανση (Amorim et al., 2022; Harman, 1956; Srivastava, 2017). Παρόλο που η συσσώρευση ROS λόγω των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων αποτελεί τη βάση της θεωρίας που πρότεινε ο Harman το 1956 για τη γήρανση (Harman, 1956), έκτοτε αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ήπια αύξηση του οξειδωτικού στρες δρα ευεργετικά ενεργοποιώντας κυτταρικούς μηχανισμούς απόκρισης στο στρες και αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής, ένα φαινόμενο που ονομάζεται όρμηση (hormesis) (López-Otín et al., 2013).

### Κυτταρική γήρανση (Cellular senescence)

Η κυτταρική γήρανση είναι αποτέλεσμα οξείας ή χρόνιας βλάβης που πυροδοτείται από ποικίλους παράγοντες, όπως την ογκογενετική σηματοδότηση, βλάβη στο γονιδίωμα, μείωση του μήκους των τελομερών, δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια, ιικές ή βακτηριακές λοιμώξεις, ανισορροπία θρεπτικών συστατικών και στρες. Στους ανθρώπους, γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται σε πολλούς ιστούς και με διαφορετικό ρυθμό, ενώ εκείνοι που κυρίως πλήττονται είναι οι ινοβλάστες, τα κύτταρα του ενδοθηλίου και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ρυθμός με τον οποίο συσσωρεύονται τα γηρασμένα κύτταρα αυξάνεται καθώς ο οργανισμός γηράσκει. Αυτό πιθανά συμβαίνει εξαιτίας της αυξημένης «παραγωγής» γηρασμένων κυττάρων και/ή της μειωμένης απομάκρυνσής τους μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος (Campisi, 2013; Lagoumtzi & Chondrogianni, 2021). Επιπρόσθετα, τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν μέσω παρακρινικής δράσης την περαιτέρω δημιουργία γηρασμένων κυττάρων. Αυτό συμβαίνει λόγω της δραματικής αλλαγής στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες (secretome) που παράγουν τα γηρασμένα κύτταρα, αποτελούμενες κυρίως από κυτταροκίνες και μεταλλοπρωτεΐνες, μια κατάσταση που ονομάζεται φαινότυπος έκκρισης σχετιζόμενος με τη γήρανση (senescence-associated secretory phenotype, SASP). Ο SASP παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια που εξαρτάται από το ποια ανοσιακά σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικοί παράγοντες θα ενεργοποιηθούν σε κάθε κυτταρικό τύπο, από το είδος του παράγοντα που προκάλεσε τη γήρανση, καθώς και από το στάδιο της γήρανσης. Ο ρόλος του SASP είναι να επικοινωνήσει στα γειτονικά κύτταρα την παρουσία κατεστραμμένων κυττάρων, με σκοπό να προάγει τον πολλαπλασιασμό τους, ώστε να διευκολύνει την επούλωση του ιστού που πλήττεται. Ταυτόχρονα, ο SASP πριμοδοτεί την απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος (Campisi, 2013; López-Otín et al., 2023). Εντούτοις, τόσο η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων, όσο και η μειωμένη λειτουργικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος που παρατηρείται κατά το γήρας λειτουργεί ως φαύλος κύκλος επηρεάζοντας αρνητικά την αναγεννητική ικανότητα των ιστών, προκαλώντας χρόνια φλεγμονή και κατάρρευση της ομοιόστασής τους. Δύο κατηγορίες ενώσεων που

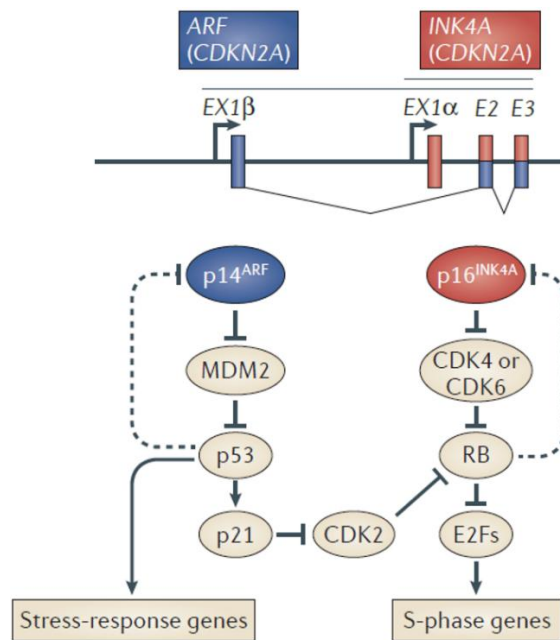
στοχεύουν στον περιορισμό ή στην καθυστέρηση των επιπτώσεων της κυτταρικής γήρανσης είναι τα senolytics, μικρά μόρια που «σκοτώνουν» επιλεκτικά τα γηρασμένα κύτταρα μέσω απόπτωσης, και τα senomorphics, μικρά μόρια που έχουν ως στόχο την παρεμπόδιση του SASP. Πολλά από αυτά τα μόρια, βρίσκονται ήδη σε κλινικές μελέτες (Khosla et al., 2020; Kirkland & Tchkonina, 2017; Lagoumtzi & Chondrogianni, 2021).



**Εικόνα 1.2: Αίτια και επιπτώσεις της κυτταρικής γήρανσης.** Διάφορα προ-γηραντικά ερεθίσματα μπορούν να καθορίσουν τη «μοίρα» ενός φυσιολογικού κυττάρου. Εάν το κύτταρο δεν απομακρυνθεί από τον οργανισμό μέσω της απόπτωσης, η αύξηση της πρωτεϊνικής έκφραση των p21, p16 και p53 επάγει την κυτταρική γήρανση και την επακόλουθη διακοπή της κυτταρικής πολλαπλασιαστικής του ικανότητας (*arrested proliferation*). Τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να αναπτύξουν ένα φαινότυπο έκκρισης σχετιζόμενο με τη γήρανση (*senescence-associated secretory phenotype, SASP*) με σκοπό την επούλωση του ιστού που πλήττεται, καθώς και να πριμοδοτήσει την απομάκρυνση τους μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος. Η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων που δεν μπορούν να απομακρυνθούν μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος και η αντοχή τους στην επαγωγή της απόπτωσης (*resistance to apoptosis*) μέσω αντι-αποπτωτικών οδών που σχετίζονται με τη γήρανση (*senescence-associated antiapoptotic pathways, SCAPs*) οδηγεί, μέσω του SASP, σε κατάρρευση της

ομοιόστασης και την εμφάνιση γήρανσης και φαινοτύπων που σχετίζονται με αυτήν [τροποποίηση από (Khosla et al., 2020)].

Τα πιο σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη γήρανση είναι εκείνα που μεσολαβούνται από την ενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* και του γενετικού τόπου *CDKN2A/p16*, καθώς και των δευτερογενών γονιδίων-τελεστών τους, *CDKN1A/p21* και *RB* (ρετινοβλάστωμα), αντίστοιχα (Campisi, 2013). Η εμπλοκή τους τόσο στη γήρανση όσο και σε ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες έχει αναδειχθεί από πληθώρα μελετών (Baker et al., 2016; X. Chen et al., 2002; LaPak & Burd, 2014; Noda et al., 1994). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης p16<sup>INK4a</sup> αυξάνονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς ποντικών και ανθρώπων με το γήρας, καθιστώντας την έκφρασή της ως τον πιο σημαντικό βιοδείκτη γήρανσης. Ο ρόλος της είναι να αποτρέπει τη φωσφορύλιωση της ογκοτατασταλτικής πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος RB μέσω της αναστολής της ενεργότητας των CDK4/6 κινασών. Έτσι, η RB παραμένει προδεδεμένη με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F στο κυτταρόπλασμα διατηρώντας τους τελευταίους αδρανικοποιημένους εμποδίζοντας τη μεταγραφική έκφραση των γονιδίων-στόχων τους, σημαντικών για την G1/S μετάβαση στον κυτταρικό κύκλο (Alcorta et al., 1996; Rayess et al., 2012; Rodier & Campisi, 2011). Όσον αφορά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, ο ρόλος της στη γήρανση έγκειται στη μεταγραφική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p21<sup>Cip1</sup>, ενός αναστολέας της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI) του κυτταρικού κύκλου που αποτρέπει την προώθηση στην G1 φάση. Ειδικότερα, η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 μέσω της p14<sup>ARF</sup> (η οποία καταστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης MDM2 που οδηγεί σε αποικοδόμηση την p53), επιτρέπει τη συσσώρευση της p53 στο κύτταρο και την επακόλουθη ενεργοποίηση της p21<sup>Cip1</sup> οδηγώντας σε παύση του κυτταρικού κύκλου στα γηρασμένα κύτταρα. Η ενεργοποίηση τόσο της p53, όσο και της p21<sup>Cip1</sup> είναι παροδική, καθώς τα επίπεδα και των δύο μειώνονται έπειτα από την εγκαθίδρυση της παύσης της ανάπτυξης. Μάλιστα, καθώς η πρωτεϊνική έκφραση της p21<sup>Cip1</sup> μειώνεται, η έκφραση της p16<sup>INK4a</sup> σταδιακά αυξάνεται ώστε να διατηρηθεί η αναστολή της ανάπτυξης στα γηρασμένα κύτταρα (X. Chen et al., 2002; Sharpless & Sherr, 2015; Shtutman et al., 2017).



**Εικόνα 1.3: Ο ρόλος του γενετικού τόπου CDKN2A στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.** Ο γενετικός τόπος CDKN2A (τα έγχρωμα κάθετα παραλληλόγραμμα υποδεικνύουν τα εξόνια) κωδικοποιεί τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p14<sup>ARF</sup> και p16<sup>INK4a</sup>. Η πρωτεΐνη p14<sup>ARF</sup> δεσμεύει τη λιγάση της ουμπικιτίνης E3 MDM2 ώστε να αποτρέψει την πολύ-ουμπικτινυλίωση της πρωτεΐνης p53 επάγοντας την επακόλουθη ενεργοποίησή της. Έτσι, ο μεταγραφικός παράγοντας p53 ρυθμίζει την έκφραση μιας εκτεταμένης ομάδας γονιδίων επαγόμενων από στρες, συμπεριλαμβανομένου και εκείνου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21<sup>Cip1</sup>, η οποία αναστέλλει τη CDK2-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RB κατά την πρόοδο της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη p16<sup>INK4a</sup> αναστέλλει τις CDK4/6 κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη RB. Η μη φωσφορυλιωμένη RB δεσμεύεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F αποτρέποντάς τους να ενεργοποιήσουν γονίδια που απαιτούνται για την S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η αδρανοποίηση της p53 οδηγεί στην επαγωγή του ARF, ενώ η αδρανοποίηση της RB επάγει την έκφραση του INK4A (διακεκομμένα βέλη) [τροποποίηση από (Sharpless and Sherr, 2015)].

## Ολιστικά χαρακτηριστικά

### Εξάντληση βλαστοκυττάρων (Stem cell exhaustion)

Η γήρανση οδηγεί σε μείωση της αναγεννητικής ικανότητας των ιστών με κάθε όργανο να παρουσιάζει διαφορετικές και μοναδικές στρατηγικές ανανέωσης και επιδιόρθωσης. Για παράδειγμα, όργανα όπως το δέρμα διαθέτουν υψηλό ποσοστό αναγεννητικής ικανότητας, ενώ άλλα όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες και το πάγκρεας έχουν περιορισμένο ρυθμό ανανέωσης υπό φυσιολογικές συνθήκες (López-Otín et al., 2023). Παρόλα αυτά, όλα τα βλαστικά κύτταρα των ενήλικων οργανισμών σταδιακά εξαντλούνται (López-Otín et al., 2013). Εάν και ο ελλιπής πολλαπλασιασμός των βλαστοκυττάρων και των αρχέγονων κυττάρων είναι φαινομενικά καταστροφικός για τη βραχυπρόθεσμη συντήρηση και επιβίωση του οργανισμού, υπέρμετρος πολλαπλασιασμός τους μπορεί να έχει τα αντίθετα αποτελέσματα επιταχύνοντας την εξάντληση των βλαστοκυττάρων. Έτσι, η αδράνεια (quiescence) των βλαστικών κυττάρων είναι υψίστης σημασίας για τη μακροπρόθεσμη λειτουργικότητάς τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν

εντερικά βλαστοκύτταρα από *Drosophila*, όπου υπερ-πολλαπλασιασμός τους οδήγησε σε εξάντλησή τους και τελικά σε εμφάνιση πρόωρης γήρανσης (Rera et al., 2011). Παρομοίως, έλλειψη της p21 σε ποντίκια οδήγησε σε πρόωμη εξάντληση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και των νευρικών βλαστοκυττάρων (Cheng et al., 2000; Kirpin et al., 2005). Παρεμβάσεις που περιλαμβάνουν μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από ιστούς νεαρών οργανισμών με στόχο την αναπλήρωσή τους, είναι πολλά υποσχόμενοι για την αντιμετώπιση ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών (Chhabra & Brayman, 2013; S. U. Kim & de Vellis, 2009).

### Τροποποιημένη διακυτταρική επικοινωνία (Altered intercellular communication)

Η γήρανση είναι συνδεδεμένη με προοδευτικές αλλαγές στη διακυτταρική επικοινωνία, οι οποίες θέτουν σε κίνδυνο τη ρύθμιση της ομοιόστασης. Οι αλλαγές αυτές αφορούν προβλήματα στη σηματοδότηση μονοπατιών που σχετίζονται με το νευρικό, νευροενδοκρινικό και ορμονικό σύστημα των οργανισμών. Ενώ αυτές οι αλλαγές πηγάζουν κυρίως από ενδοκυτταρικούς παράγοντες, όπως καταδεικνύεται στην περίπτωση του SASP, η τροποποιημένη διακυτταρική επικοινωνία αποτελεί τελικά ξεχωριστό ορόσημο για τη γήρναση. Και τούτο διότι συνδέει τα ενδοκυτταρικά με τα εξωκυτταρικά χαρακτηριστικά, περιλαμβάνοντας αποκρίσεις στη χρόνια φλεγμονή, υπολειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στην επιτήρηση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και προκαρκινικών κυττάρων, καθώς και τη διαταραγμένη αλληλεπίδραση μεταξύ του ανθρώπινου γονιδιώματος και του μικροβιώματος, οδηγώντας τελικά σε δυσβίωση (López-Otín et al., 2023; H. A. Miller et al., 2020).

### Χρόνια φλεγμονή (Chronic inflammation)

Η φλεγμονή αυξάνεται καθώς οι οργανισμοί γηράσκουν (inflammaging) οδηγώντας σε συστημικές εκδηλώσεις και παθολογικούς φαινοτύπους, όπως η φλεγμονή του νευρικού ιστού, η αρτηριοσκλήρυνση και η οστεοαρθρίτιδα. Οι συγκεντρώσεις των κυκλοφορούντων κυτταροκινών και διαφόρων βιοδεικτών φλεγμονής αυξάνονται με το γήρας, ενώ παράλληλα παρουσιάζεται μείωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Η χρόνια φλεγμονή που παρατηρείται κατά τη γήρανση είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα της αλληλεπίδρασης όλων των παραγόντων που συμβάλουν στη γήρανση, καθώς αποτελεί συνέπεια διαταραχών που συμβαίνουν στα υπόλοιπα έντεκα ορόσημα της γήρανσης. Εντούτοις, περιγράφεται ξεχωριστά αποτελώντας το ενδέκατο ορόσημο της γήρανσης, καθώς χειρισμοί στο ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν είτε να ενισχύσουν, είτε να επιβραδύνουν τη γήρανση (López-Otín et al., 2023). Παρεμβάσεις που παρεμποδίζουν τη δράση του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), αναστέλλουν τον υποδοχέα E2 της προσταγλανδίνης (EP2), την ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) ή το NLRP3 φλεγμονόσωμα (inflammasome) οδηγούν σε μείωση της φλεγμονής έχοντας θετικά αποτελέσματα τόσο στην ποιότητα (healthspan), όσο και στη διάρκεια ζωής (lifespan) των οργανισμών (González-Dominguez et al., 2021; Minhas et al., 2021; Ridker et al., 2017; Sciorati et al., 2020).

## Δυσβίωση (Dysbiosis)

Τα τελευταία χρόνια, το εντερικό μικροβίωμα των οργανισμών έχει αναδειχθεί ως ένας καθοριστικός παράγοντας που συνεισφέρει σε πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της πρόσληψης και απορρόφησης θρεπτικών συστατικών, της προστασίας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς και της παραγωγής σημαντικών μεταβολιτών, όπως βιταμινών. Συνάμα, συμμετέχει στη διατήρηση της συνολικής υγείας του οργανισμού μέσω της μετάδοσης σημάτων στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς και σε άλλα απομακρυσμένα όργανα. Η διατάραξη αυτής της αμφίδρομης επικοινωνίας μεταξύ του μικροβιώματος και του οργανισμού-ξενιστή οδηγεί σε δυσβίωση και κατ' επέκταση σε εκδήλωση πολλών παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, νευρολογικές διαταραχές και καρκίνο. Μελέτες στο συγκεκριμένο πεδίο έχουν αναδείξει τη συσχέτιση μεταξύ της ηλικιο-εξαρτώμενης μεταβολής τόσο της σύστασης (αύξηση επιβλαβών και μείωση ωφέλιμων μικροβίων), όσο και της δραστηριότητας του εντερικού μικροβιώματος κατά τη γήρανση (Ragonnaud & Biragyn, 2021; Wilmanski et al., 2021). Αντίθετα, παρεμβάσεις που έχουν ως στόχο την ενίσχυση/αποκατάσταση του εντερικού μικροβιώματος, μέσω χορήγησης προβιοτικών και/ή πρεβιοτικών, δίαιτας βασισμένης σε προϊόντα φυτικής προέλευσης και μείωση της πρόσληψης θερμίδων, βελτιώνουν την ευζωία των οργανισμών και επιμηκύνουν το προσδόκιμο ζωής (Ghosh et al., 2022; López-Otín et al., 2023).

### 1.1.2 Πειραματική προσέγγιση της γήρανσης

Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιούνται στον τομέα της έρευνας προκειμένου να μελετηθούν οι θεμελιώδεις μηχανισμοί που διέπουν την πολύπλοκη διαδικασία της γήρανσης. Τα κυτταρικά μοντέλα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης καθώς και των χαρακτηριστικών της σε επίπεδο κυττάρου, ενώ τα *in vivo* μοντέλα προσφέρουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για το πώς αυτές οι κυτταρικές διεργασίες επηρεάζουν τη λειτουργία του οργανισμού, την ομοιόστασή του και τελικά την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου. Η κατανόηση της γήρανσης και των μηχανισμών που την καθορίζουν είναι υψίστης σημασίας για την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων που στοχεύουν στην αντιμετώπιση των συνεπειών της και την προαγωγή της μακροζωίας και της ευζωίας.

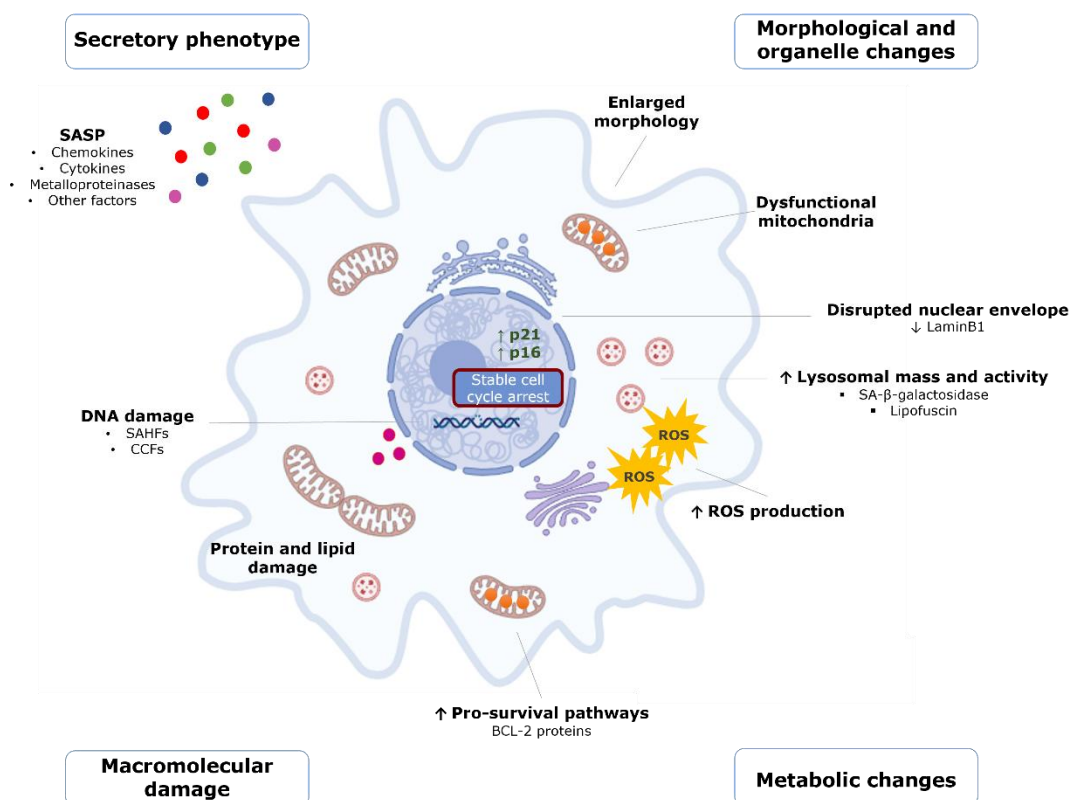
#### 1.1.2.1 Κυτταρικά μοντέλα γήρανσης

Δύο είναι οι κύριοι τύποι μοντέλων της κυτταρικής γήρανσης: το μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης (replicative senescence) και το μοντέλο της πρόωρα επαγόμενης γήρανσης λόγω στρες (stress-induced premature senescence, SIPS).

### Αναδιπλασιαστική γήρανση

Ο όρος αναδιπλασιαστική γήρανση αναφέρεται στη μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των φυσιολογικών σωματικών κυττάρων του ανθρώπου έπειτα από συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων που υφίστανται στην

κυτταροκαλλιέργεια, η οποία οδηγεί σε οριστική και μη αντιστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου. Η στιγμή κατά την οποία οι ανθρώπινες διπλοειδείς κυτταρικές σειρές σταματούν να διαιρούνται *in vitro* δεν εξαρτάται από τον αριθμό των υποκαλλιεργειών και κατ' επέκταση από τον ημερολογιακό χρόνο που διατηρούνται στην καλλιέργεια, αλλά από τον αριθμό των κυτταρικών διπλασιασμών που θα πραγματοποιήσουν (πληθυσμιακός διπλασιασμός, population doubling, PD) (Hayflick, 1965). Αυτό εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, την ηλικία του δότη και τη μακροβιότητα του είδους από το οποίο απομονώθηκαν τα κύτταρα (Mohamad Kamal et al., 2020; Smith et al., 2002). Η αναδιπλασιαστική γήρανση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη σταδιακή μείωση του μήκους των τελομερών, η οποία συμβαίνει καθώς αυξάνεται ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων *in vitro* (Harley et al., 1990). Έτσι, αφού τα κύτταρα ολοκληρώσουν ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και μη μπορώντας πλέον να προσθέσουν τις απαραίτητες τελομερικές ακολουθίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων τους, οδηγούνται σε μόνιμη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που ονομάζεται «όριο Hayflick» (Campisi, 2013; Hayflick, 1965).



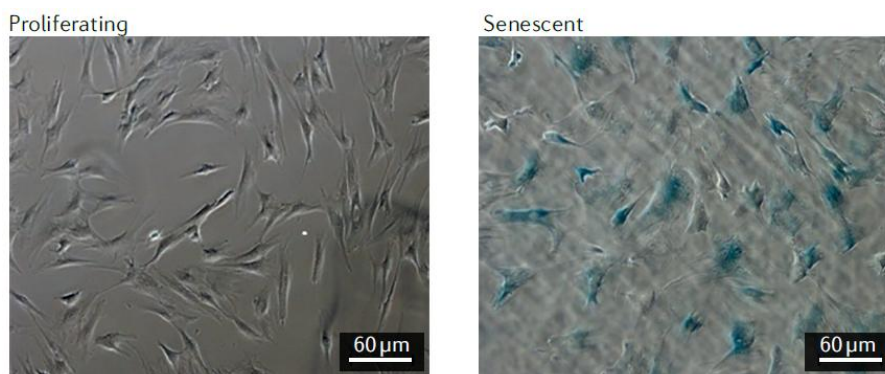
**Εικόνα 1.4:** Οι μορφολογικές, μοριακές και βιοχημικές αλλαγές που αποκτούν τα γηρασμένα κύτταρα. Φαινότυπος έκκρισης σχετιζόμενος με τη γήρανση SASP; Senescence-Associated Secretory Phenotype, Εστίες ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με τη γήρανση SAHFs; Senescence-Associated Heterochromatin Foci, Θραύσματα χρωματίνης στο κυτταρόπλασμα CCFs; Cytoplasmic Chromatin

*Fragments, Δραστικές ρίζες οξυγόνου ROS; Reactive Oxygen Species [Τροποποίηση από (Ou et al., 2021)]. Created in BioRender. Vasilopoulou, M. (2024) <https://BioRender.com/i28k392>.*

Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν ιδιαίτερα γνωρίσματα σε μορφολογικό, μοριακό και βιοχημικό επίπεδο (M. Dimri & Dimri, 2019). Αρχικά το σχήμα τους από ατρακτοειδές με οξύληκτα άκρα μεταβάλλεται σε πεπλατυσμένο και ακανόνιστο, ενώ παράλληλα αυξάνονται σε μέγεθος και παρουσιάζουν μεγαλύτερους πυρήνες (G. P. Dimri & Campisi, 1994; Hayflick, 1965; Mohamad Kamal et al., 2020). Η αλλαγή τόσο στο μέγεθος, όσο και στο σχήμα των γηρασμένων κυττάρων έχειδειχθεί ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση του mTOR μονοπατιού καθώς και σε αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, κυρίως μέσω των ινιδίων βιμεντίνης (Hernandez-Segura et al., 2018). Τα γηρασμένα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά και βρίσκονται μόνιμα σταματημένα στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, κατάσταση η οποία ελέγχεται από την ενεργοποίηση των p53/p21<sup>CIP1</sup> και p16<sup>INK4a</sup>/Rb μονοπατιών. Αυτό το χαρακτηριστικό διαφοροποιεί τα γηρασμένα κύτταρα από τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας (quiescent cells) στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου και έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν ξανά σε αυτόν (Mohamad Kamal et al., 2020; Sharpless & Sherr, 2015). Ακόμη, τα γηρασμένα κύτταρα παρουσιάζουν αντοχή στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου/απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 (BCL-W και BCL-XL) (Childs et al., 2014) και αλλαγή στην έκφραση αρκετών γονιδίων και ιδιαίτερα γονιδίων που σχετίζονται με αναστολή και ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου (π.χ. p21<sup>CIP1</sup> και p16<sup>INK4a</sup>) (Mohamad Kamal et al., 2020; Rodier & Campisi, 2011; Sharpless & Sherr, 2015). Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν επίσης χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν βλάβες στο DNA, όπως η θετική χρώση διακριτών πυρηνικών εστιών της γH2AX, μιας φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης H2AX (D'Adda Di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003), ενώ η εμφάνιση εστιών ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με τη γήρανση (senescence-associated heterochromatin foci, SAHF) λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός του γονιδιώματος για τη διατήρηση της καταστολής της ετεροχρωματίνης. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων είναι η απώλεια της πρωτεΐνης LaminB1, μιας δομικής πρωτεΐνης του πυρηνοπλάσματος. Αποσταθεροποίηση της πυρηνικής μεμβράνης λόγω μειωμένης έκφρασης της LaminB1 οδηγεί σε αλλαγές όπως απώλεια συμπύκνωσης της ετεροχρωματίνης και παρουσία θραυσμάτων χρωματίνης στο κυτταρόπλασμα (cytoplasmic chromatin fragments, CCFs) (Sadaie et al., 2013). Επιπρόσθετα, εξαιτίας της περιορισμένης μιτοφαγίας παρατηρείται αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων λόγω της συσσώρευσης παλιών και δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων. Το μεμβρανικό δυναμικό αυτών των μιτοχονδρίων είναι μειωμένο, οδηγώντας στην απελευθέρωση μιτοχονδριακών ενζύμων και στην αυξημένη παραγωγή ROS (Korolchuk et al., 2017).

Η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται από την αυξημένη περιεκτικότητα σε λυσοσώματα και από την αυξημένη έκφραση πολλών λυσοσωμικών πρωτεϊνών (Kurz et al., 2000; B. Y. Lee et al., 2006). Η αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των λυσοσωμάτων στα γηρασμένα κύτταρα αποδίδεται κυρίως στη συσσώρευση λιποφουσκίνης, μιας ενδογενώς φθορίζουσας ουσίας που συγκεντρώνεται με την

ηλικία στα λυσοσώματα των μετα-μιτωτικών κυττάρων. Η αδυναμία αποικοδόμησης και απομάκρυνσή της από το κύτταρο, την καθιστά έναν κυτταρικό δείκτη γήρανσης (Mohamad Kamal et al., 2020). Επίσης, η δραστηριότητα του ενζύμου σχετιζόμενου με τη γήρανση β γαλακτοσιδάση (senescence-associated beta-galactosidase, SA-β-gal) χρησιμοποιείται ως δείκτης της αυξημένης περιεκτικότητας των γηρασμένων κυττάρων σε λυσοσώματα (B. Y. Lee et al., 2006). Το 1995, οι Dimri και συνεργάτες ανακάλυψαν ότι εκτός από τη λυσοσωμική β-γαλακτοσιδάση, η οποία είναι ανιχνεύσιμη σε pH 4.0, τα γηρασμένα κύτταρα εκφράζουν β-γαλακτοσιδάση ανιχνεύσιμη σε pH 6.0, την SA-β-gal. Η συσσώρευση του ενζύμου SA-β-gal και η ανίχνευση της δραστηριότητάς του σε pH 6.0, αποτελούν τον πρώτο και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη κυτταρικής γήρανσης (G. P. Dimri et al., 1995), ενώ η δραστηριότητα αυτή δεν παρατηρείται σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας (Mohamad Kamal et al., 2020). Η SA-β-gal αποτελεί ένα από τα πολλαπλά μετάγραφα του γονιδίου *GLBI*, ενώ ο μηχανισμός που οδηγεί στην υπερέκφρασή της κατά τη γήρανση δεν έχει πλήρως περιγραφεί έως σήμερα (M. Dimri & Dimri, 2019; Hernandez-Segura et al., 2018).



**Εικόνα 1.5:** Χρώσης β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) που έχει πραγματοποιηθεί σε κυτταρικές σειρές πρόδρομων λιποκυττάρων του ανθρώπου. Αριστερά απεικονίζονται τα νεαρά κύτταρα και δεξιά τα γηρασμένα κύτταρα (Khosla et al., 2020).

Τέλος, ένα εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων που μας δίνει τη δυνατότητα να εξηγήσουμε το ρόλο της κυτταρικής γήρανσης στη γήρανση του οργανισμού, καθώς και στις παθολογίες που σχετίζονται με την ηλικία, είναι η έκφραση του SASP (Campisi, 2013; Coppé et al., 2008; Mohamad Kamal et al., 2020).

Ένα βασικό ερώτημα στη μελέτη της γήρανσης είναι κατά πόσο οι αλλαγές που παρατηρούνται στην αναδιπλασιαστική γήρανση *in vitro* συνδέονται με τους μοριακούς μηχανισμούς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που προκαλούν τη γήρανση των κυττάρων *in vivo* (Phipps et al., 2007). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τη συσχέτιση μεταξύ των δύο φαινομένων. Οι ινοβλάστες που προέρχονται από ηλικιωμένους δότες παρουσιάζουν μικρότερη ικανότητα πολλαπλασιασμού στην καλλιέργεια, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ηλικία του δότη επηρεάζει την αναδιπλασιαστική διάρκεια ζωής των κυττάρων. Ειδικότερα, όσο μεγαλύτερη ήταν η ηλικία του δότη, τόσο μικρότερος ο αριθμός των κυτταρικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρά του *in vitro* (Chondrogianni et al., 2004; Martin et al.,

1970; Schneider & Mitsui, 1976). Προς υποστήριξη αυτού, ινοβλάστες που απομονώθηκαν από αιωνόβιους δότες πραγματοποίησαν περισσότερες κυτταρικές διαιρέσεις στην καλλιέργεια σε σύγκριση με κύτταρα δότη ηλικίας 80 ετών (Chondrogianni et al., 2004), γεγονός που ενισχύει περαιτέρω τη συσχέτιση μεταξύ κυτταρικής και οργανισμικής γήρανσης. Επίσης, κύτταρα που έχουν απομονωθεί από άτομα που πάσχουν από σύνδρομο πρόωρης γήρανσης, όπως το σύνδρομο Werner, παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό κυτταρικών διπλασιασμών *in vitro*, σε σύγκριση με κύτταρα υγιών δοτών (Danes, 1971). Ακόμη, άτομα με σύνδρομο προγηρίας Hutchinson-Gilford (MIM #176670) εμφανίζουν επιταχυνόμενη μείωση του μήκους των τελομερών τους, βλάβες στο DNA και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Cisneros et al., 2023). Επιπλέον, πολλά χαρακτηριστικά γήρανσης που παρατηρούνται στα γηρασμένα κύτταρα *in vitro*, όπως η θετική χρώση SA-β-gal, η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p16<sup>INK4a</sup> και βλάβες στο DNA (γ-H2AX) ανιχνεύονται επίσης σε γηρασμένα κύτταρα και ιστούς *in situ*, υποστηρίζοντας περαιτέρω τη συσχέτιση *in vitro* και *in vivo* γήρανσης (Ogrodnik et al., 2024).

### Πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες

Στα κύτταρα είναι δυνατόν να προκληθεί η πρόωρη εμφάνιση ενός φαινοτύπου παρόμοιου με αυτόν που παρατηρείται στην αναδιπλασιαστική γήρανση, δηλαδή παρατηρείται επίσπευση της ολοκλήρωσης των κυτταρικών διπλασιασμών, που ονομάζεται πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες (stress-induced premature senescence, SISP). Η SISP οφείλεται σε παράγοντες στρες και όχι στη βράχυνση των τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι εσωτερικοί, εξωτερικοί, φυσικοί ή χημικοί, οξείς ή χρόνιοι και περιλαμβάνουν μια σειρά από άλλα σήματα, συμπεριλαμβανομένων της μη επιδιορθώσιμης βλάβης στο DNA (DNA-damage-induced senescence) που προκαλείται από ακτινοβολία (UV ή ιονίζουσα) ή φάρμακα (π.χ. μπλεομυκίνη), ενεργοποίηση ογκογονιδίων (π.χ. Ras, BRAF) ή αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. PTEN) (oncogene-induced senescence), επιγενετικές αλλαγές στη χρωματίνη (epigenetically-induced senescence), έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. υπεροξείδιο του υδρογόνου, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (oxidative stress-induced senescence), έκκριση του SASP από ένα πρωταρχικά γηρασμένο κύτταρο (paracrine senescence) ή τέλος η πρόσφατα αναφερόμενη επαγωγή πρόωρης γήρανσης μέσω της πρόκλησης μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (mitochondrial dysfunction-associated senescence, MiDAS) (Hernandez-Segura et al., 2018; Mohamad Kamal et al., 2020). Και στις περιπτώσεις της πρόωρα επαγόμενης γήρανσης λόγω στρες, τα κύτταρα εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται στην αναδιπλασιαστική γήρανση.

#### 1.1.2.2 Οργανισμικά μοντέλα γήρανσης

Για τη μελέτη της γήρανσης *in vivo* εκτός από τους αιωνόβιους, που είναι άνθρωποι που έχουν ξεπεράσει το εκατοστό έτος της ηλικίας τους και θεωρούνται παραδείγματα επιτυχούς γήρανσης, και τα σύνδρομα πρόωρης γήρανσης (π.χ. σύνδρομο Werner, σύνδρομο Hutchinson-Gilford), χρησιμοποιούνται ζωικά μοντέλα, όπως ζυμομύκητες,

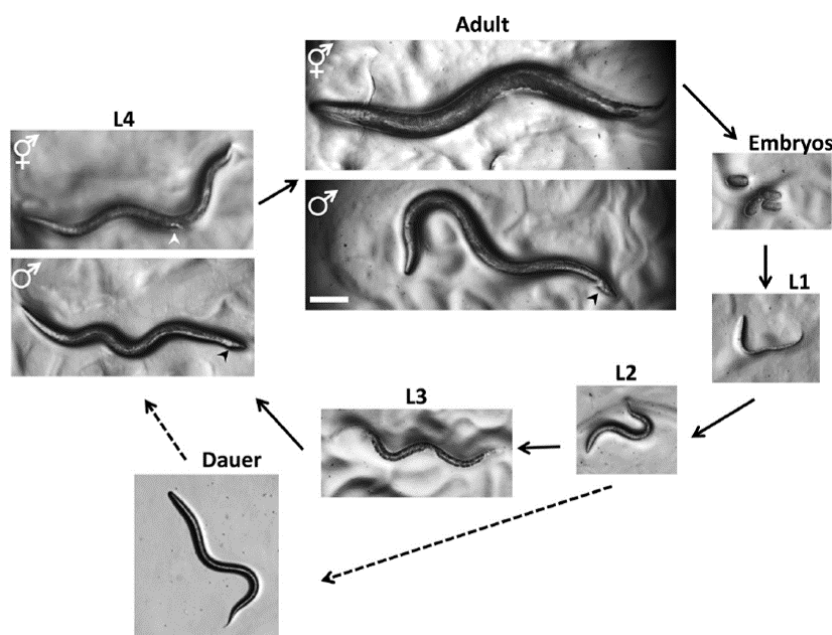
ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans*, η *Drosophila melanogaster* και τα ποντίκια που έχουν μικρό χρόνο ζωής και είναι εύκολα στο χειρισμό. Η χρήση των ζωικών μοντέλων στο πεδίο της γήρανσης έχει δώσει φως σε πολλά αναπάντητα ερωτήματα και έχει αναδείξει μηχανισμούς που διέπουν τη γήρανση και τις σχετιζόμενες με την ηλικία παθολογίες.

### *Caenorhabditis elegans*

Ο *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) είναι ένας ελεύθερος νηματώδης σκώληκας μικρού μεγέθους που συναντάται στο χώμα και σε φρούτα που βρίσκονται σε αποσύνθεση. Ο Brenner το 1974 ήταν εκείνος που πρώτος εισήγαγε το *C. elegans* στον κόσμο της επιστήμης (Brenner, 1974). Αποτελεί τον πρώτο πολυκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό που έχει αλληλουχηθεί πλήρως το γονιδίωμά του (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), ενώ η θέση και η γεναλογία κάθε κυττάρου στο έμβρυο, στην προνύμφη και στο ενήλικο άτομο είναι γνωστές. Πάνω από χίλια εργαστήρια παγκοσμίως χρησιμοποιούν ως οργανισμό μοντέλο το *C. elegans* (Corsi et al., 2015), καθώς είναι οικονομικός και απλός στο χειρισμό (Tissenbaum, 2015). Διατηρείται σε τρυβλία Petri ή σε υγρές καλλιέργειες και τρέφεται με ζωντανά ή νεκρά βακτήρια *Escherichia coli*. Τέσσερα βραβεία Νόμπελ έχουν αποδοθεί έως σήμερα σε επιστήμονες που χρησιμοποιούσαν ως μοντέλο το *C. elegans* για τη γενετική ρύθμιση της οργανογένεσης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής 2002), την ανακάλυψη του μηχανισμού απενεργοποίησης γονιδίων μέσω της παρεμβολής RNA (Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής 2006), τη χρήση της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής (green fluorescent protein, GFP) (Νόμπελ Χημείας 2008) και για την ανακάλυψη των microRNA και το ρόλο τους στη μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση (Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής 2024).

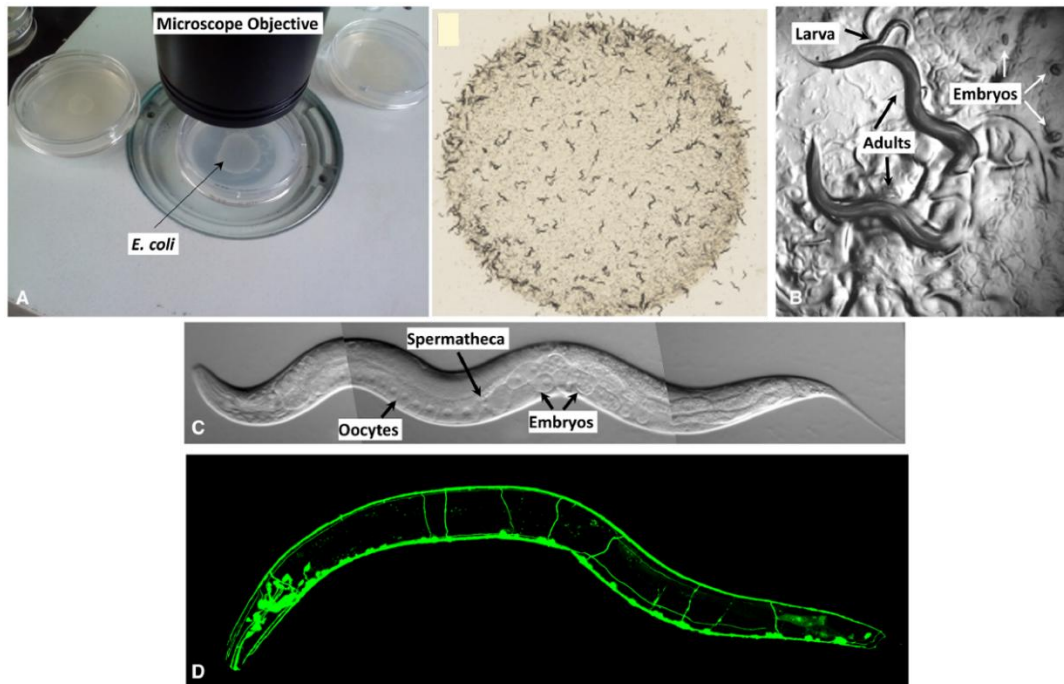
Ο κύκλος και το προσδόκιμο ζωής του είναι αρκετά σύντομος, γεγονός που τον καθιστά ιδανικό μοντέλο για πειράματα γήρανσης. Ειδικότερα, ο χρόνος γενιάς είναι μόλις 3 ημέρες στους 20 °C, ενώ η διάρκεια ζωής του είναι περίπου 3 εβδομάδες. Για να φθάσει ένας σκώληκας στο ενήλικο στάδιο, περνάει από το εμβρυϊκό στάδιο ως αυγό που περιβάλλεται από πολύ σκληρό περίβλημα και από τέσσερα στάδια προνυμφών (L1-L4). Τα έμβρυα γεννιούνται στο στάδιο περίπου των 24 κυττάρων και η εκκόλαψη πραγματοποιείται περίπου 16 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η προνύμφη L1 τρέφεται και αυξάνεται σε μέγεθος και πραγματοποιεί τέσσερις εκδύσεις για να φθάσει στο ενήλικο στάδιο. Το L1 στάδιο διαρκεί περίπου 16 ώρες, ενώ τα υπόλοιπα έχουν διάρκεια περίπου 12 ώρες το κάθε ένα (Corsi et al., 2015). Εάν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον ή συνθήκες που δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη (πρόκληση στρες, υπερπληθυσμιακές συνθήκες στην καλλιέργεια), οι L2 προνύμφες εισέρχονται σε ένα λανθάνον στάδιο, αυτό της προνύμφης dauer. Στο στάδιο αυτό οι προνύμφες δεν τρέφονται και προκαλείται αναστολή της ανάπτυξης. Τα ζώα μπορούν να διατηρηθούν ακόμη και μήνες σε αυτήν την κατάσταση, ενώ όταν οι συνθήκες γίνουν ξανά ευνοϊκές, οι σκώληκες εξέρχονται από το στάδιο της προνύμφης dauer και εισέρχονται στο στάδιο L4 (Hu, 2007). Οι νεοεκκολαφθείσες προνύμφες

έχουν μήκος 0.25 χιλιοστά, ενώ οι ενήλικοι σκώληκες έχουν μήκος 1 χιλιοστό (Corsi et al., 2015).



**Εικόνα 1.6:** Ο κύκλος ζωής του νηματώδη σκώληκα *C. elegans* (Corsi et al., 2015).

Ο *C. elegans* αποτελείται από μια εξωτερική στοιβάδα κυττάρων, την επιδερμίδα, που εσωκλείει τα κύρια όργανα του ζώου. Ακριβώς κάτω από την επιδερμίδα, συναντώνται οι μυς και οι νευρώνες που τους εκνευρώνουν, όπου η σύσπαση και χαλάρωσή τους οδηγεί στην «κομψή» (elegant) ημιτονοειδή κίνηση του ζώου. Εσωτερικά περιλαμβάνονται το γαστρεντερικό (όπου η ύπαρξη του φάρυγγα επιτρέπει την είσοδο της τροφής και την προώθησή της στο έντερο), το απεκκριτικό (με την ύπαρξη του ορθού στην περιοχή της έδρας) και το αναπαραγωγικό σύστημα (που περιλαμβάνει τη γονάδα όπου αναπτύσσονται τα ωοκύτταρα και το σπέρμα, και το γεννητικό πόρο που συμβάλει τόσο στην εξώθηση των αυγών από το ερμαφρόδιτο άτομο όσο και για την είσοδο του σπέρματος κατά το ζευγάρωμα). Στον *C. elegans* ως ενήλικοι σκώληκες συναντώνται ερμαφρόδιτα ή αρσενικά άτομα. Στον πληθυσμό τα ερμαφρόδιτα άτομα κυριαρχούν, ενώ συνυπάρχουν σε ποσοστό μικρότερο από 0.2% με αρσενικά άτομα (Corsi et al., 2015). Η ύπαρξη ερμαφρόδιτων και αρσενικών ατόμων με ξεχωριστές αναπαραγωγικές δομές, αντιστοιχούν σε δύο ξεχωριστές στρατηγικές αναπαραγωγής: την αυτογονιμοποίηση όταν υπάρχουν στον πληθυσμό μόνο τα ερμαφρόδιτα άτομα και το ζευγάρωμα όταν συνυπάρχουν αρσενικά. Με την αυτογονιμοποίηση, ένας σκώληκας άγριου τύπου μπορεί να δημιουργήσει περίπου 300 απογόνους, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων είναι ερμαφρόδιτα άτομα με μόλις 0,1% αρσενικά. Σε περίπτωση ζευγαρώματος, ο αριθμός των απογόνων μπορεί να φτάσει πάνω από 1000, και η πιθανότητα εμφάνισης αρσενικών ατόμων αγγίζει το 50%. Και τα δύο φύλα είναι διπλοειδή για τα πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα, ενώ τα ερμαφρόδιτα άτομα έχουν δύο X χρωμοσώματα (XX) και τα αρσενικά μόνο ένα (XO) (Corsi et al., 2015).



**Εικόνα 1.7: Παρατηρώντας το *C. elegans*.** (A) Τρυβλία Petri τοποθετημένα στη βάση ενός στερεομικροσκοπίου. Οι βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* είναι ορατές στην επιφάνεια του άγαρ μέσα στα τρυβλία και δεξιά φαίνεται σε μεγέθυνση ο πληθυσμός του *C. elegans* πάνω στη βακτηριακή χλόη. (B) Ο *C. elegans* όπως φαίνεται μέσα από το στερεομικροσκόπιο. Τα δύο ενήλικα ερμαφρόδιτα άτομα κινούνται με τη χαρακτηριστική ημιτονοειδή κίνηση, όπως υποδεικνύουν τα ίχνη πάνω στη βακτηριακή χλόη στην επιφάνειά του, ενώ δίπλα τους βρίσκονται προνύμφες και αυγά. (C) Ένα ενήλικο ερμαφρόδιτο άτομο παρατηρείται μέσω μικροσκοπίου. Το πρόσθιο μέρος είναι προς τα αριστερά με την κοιλιακή πλευρά να βρίσκεται στο κάτω μέρος. Διακρίνονται από αριστερά προς τα δεξιά στην κοιλιακή πλευρά τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα μέσα στη γονάδα (ορθογώνια κύτταρα με έναν κυκλικό πυρήνα μέσα), ακολουθούμενα από τη σπερματοθήκη (όπου γονιμοποιούνται τα ωοκύτταρα) και πολλαπλά έμβρυα μέσα στη μήτρα. (D) Εικόνα που δείχνει το νευρικό σύστημα του *C. elegans* σημασμένο με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP [τροποποίηση από (Corsi et al., 2015)].

Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό του *C. elegans* είναι το διαφανές σώμα του, το οποίο επιτρέπει την οπτικοποίηση και την ανάλυση συγκεκριμένων τύπων κυττάρων και κυτταρικών λειτουργιών με τη χρήση φθορίζουσών πρωτεϊνών, όπως η GFP. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο, καθώς σε συνδυασμό με την άριστη γνώση του αριθμού, της θέσης και της λειτουργίας των κυττάρων του σκώληκα (671 εμβρυικά κύτταρα και 959 σωματικά κύτταρα σε ενήλικα ερμαφρόδιτα ή 1031 σωματικά κύτταρα σε ενήλικα αρσενικά άτομα), επιτρέπει τον σχετικά εύκολο εντοπισμό κυτταρικών ανωμαλιών. Επιπλέον, τα ερμαφρόδιτα ενήλικα άτομα έχουν 302 νευρώνες απόλυτα χαρακτηρισμένους, με τον *C. elegans* να είναι το μόνο ζωικό μοντέλο με πλήρως χαρτογραφημένους νευρωνικούς συνδέσμους (Corsi et al., 2015; JG et al., 1986; Lin et al., 2023; Wilkinson et al., 2012).

Τα σωματικά κύτταρα του ενήλικου ζώου είναι μετα-μιτωτικά, καθιστώντας το *C. elegans* εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη της γήρανσης μη διαιρούμενων κυττάρων (χρονική γήρανση) (Wilkinson et al., 2012). Το 1977, ο Klass δημοσίευσε ένα άρθρο καθιστώντας τον *C. elegans* ως έναν πολύ καλό οργανισμό-μοντέλο για τη μελέτη της

γήρανσης καθιερώνοντας μεθόδους μέτρησης και εκτίμησης του προσδόκιμου ζωής των σκωλήκων (Klass, 1977). Έκτοτε, η χρήση του μοντέλου και η ανακάλυψη μεταλλαγμένων στελεχών που επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής του νηματώδους σκώληκα, έδωσαν φως στη βιολογία της γήρανσης και στην ανακάλυψη μονοπατιών που εμπλέκονται σε αυτήν, όπως το IIS μονοπάτι (C. Kenyon, 2011; C. J. Kenyon, 2010; Tissenbaum, 2015). Παράλληλα η δυνατότητα χρήσης μεγάλου αριθμού σκωλήκων, η δυνατότητα απενεργοποίησης σχεδόν κάθε γονιδίου μέσω της παρεμβολής RNA (RNAi) τρέφοντας τους σκώληκες με βακτήρια που εκφράζουν δίκλωνο RNA για το γονίδιο ενδιαφέροντος, και τα εξελικτικά συντηρημένα μονοπάτια που διέπουν τη διάρκεια ζωής του, έχουν εγκαθιδρύσει το *C. elegans* στην έρευνα για τη γήρανση (Tissenbaum, 2015). Ακόμη, η γήρανση του *C. elegans* μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τη γήρανση των ανθρώπων, όπως η ατροφία των μυών (σαρκοπενία), σημάδια νευρολογικής επιδείνωσης και η αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις (Corsi et al., 2015; Lin et al., 2023; Wilkinson et al., 2012), ενώ ποικίλα μοντέλα ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών, όπως της νόσου Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease, AD), της νόσου Χάντινγκτον (Huntington's disease, HD) και της νόσου Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD) έχουν δημιουργηθεί τόσο για τη μελέτη, όσο και την εύρεση χειρισμών βελτίωσης των σχετιζόμενων με τις ασθένειες φαινοτύπων και των παθολογιών τους (X. Chen et al., 2015; J. J. H. Liang et al., 2020).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι αρχικές παρατηρήσεις των μεταλλαγμένων *C. elegans* στελεχών που εμφανίζουν τροποποιήσεις στη διάρκεια ζωής τους, έδωσε το έναυσμα για την εκτίμηση της παραμέτρου της «διάρκειας υγείας», καθώς η διάρκεια ζωής (lifespan) που είναι το χρονικό διάστημα που ένας οργανισμός παραμένει ζωντανός, δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με την υγεία και την γενικότερη ευζωία (healthspan) του ζώου. Με τον όρο ευζωία ορίζεται το χρονικό διάστημα όπου το άτομο είναι ενεργό, παραγωγικό και απαλλαγμένο από παθολογίες που σχετίζονται με το γήρας, ενώ έχει αρχίσει να γίνεται το επίκεντρο της έρευνας στη γήρανση (Lin et al., 2023; Tissenbaum, 2012, 2015). Τέλος, ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός μελετών χρησιμοποιεί το *C. elegans* ως οργανισμό-μοντέλο για την εκτίμηση παρενεργειών και τοξικότητας ουσιών (Lin et al., 2023).

Παρά τα εξαιρετικά πλεονεκτήματα της χρήσης του *C. elegans* στη μελέτη της γήρανσης, η απλή διάταξη του σώματος, η έλλειψη ορισμένων οργάνων και ιστών (π.χ. εγκέφαλος), το μικρό του μέγεθος που καθιστά δύσκολες τις βιοχημικές αναλύσεις, καθώς και το γεγονός ότι είναι εξελικτικά απομακρυσμένο από τον άνθρωπο, είναι μερικά από τα μειονεκτήματα του συγκεκριμένου μοντέλου (Corsi et al., 2015; Tissenbaum, 2015).

### 1.1.3 Γήρανση και ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες

Η γήρανση είναι μια αναπόφευκτη ηλικιο-εξαρτώμενη απώλεια της λειτουργικότητας σε μοριακό, κυτταρικό και οργανισμικό επίπεδο, αποτελώντας χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των οργανισμών. Η γήρανση αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας στους ανθρώπους. Λόγω της συνολικής βελτίωσης της ποιότητας ζωής των ανθρώπων, το μέσο προσδόκιμο ζωής έχει αυξηθεί τον τελευταίο

αιώνα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) το προσδόκιμο ζωής ξεπερνά τα 80 έτη στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες. Καθώς όλο και μεγαλύτερο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού βρίσκεται στο στάδιο γήρατος, ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία γίνονται ολοένα και πιο σημαντικό βάρος για την παγκόσμια υγεία (Aunan et al., 2016, 2017; Campisi, 2013), με τις παθολογίες που σχετίζονται με την ηλικία να κάνουν την εμφάνισή τους από το μέσο της ζωής του είδους (π.χ. 50-60 έτη στους ανθρώπους) (Campisi, 2013).

Η ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων φαίνεται να εμπλέκεται σε ηλικιο-ερξαρτώμενες ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση, κυρίως μέσω του SASP (Campisi, 2013), ενώ απώλεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων ευθύνεται για παθολογίες όπως το γλαύκωμα, ο καταρράκτης και η οστεοαρθρίτιδα (Childs et al., 2015). Επίσης, η σχετιζόμενη με την ηλικία μειωμένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου σε συνδυασμό με τη συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών, συμβάλουν στη μειωμένη ανταπόκριση των οργανισμών στις απαιτήσεις που προκύπτουν υπό συνθήκες στρες. Αυτό σε συνδυασμό με τη μη επιτυχή ανακύκλωση των πρωτεϊνών μέσω των πρωτεολυτικών μηχανισμών του κυττάρου (πρωτεάσωμα, αυτοφαγία) οδηγεί στη συσσώρευση και εναπόθεση λανθασμένα αναδιπλωμένων και τοξικών πολυπεπτιδικών συσσωματωμάτων, υπονομεύοντας τη ζωτικότητα των κυττάρων. Αυτό είναι χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (neurodegenerative diseases), όπως είναι η AD και η PD (Aunan et al., 2017; Höhn et al., 2020). Τις τελευταίες δεκαετίες, εντατική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στο πεδίο των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καθώς πλήττουν εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και παραμένουν ένα αρκετά σημαντικό και άλυτο οικονομικό και κοινωνικό πρόβλημα. Συνάμα, καθώς η ίδια η γήρανση είναι ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου εκδήλωσης αυτών των ασθενειών, το πρόβλημα αναμένεται να αυξηθεί δραματικά λόγω της συνεχώς γηράσκουσας κοινωνίας (Aunan et al., 2016; X. Chen et al., 2015).

#### *1.1.3.1 Νόσος του Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease, AD)*

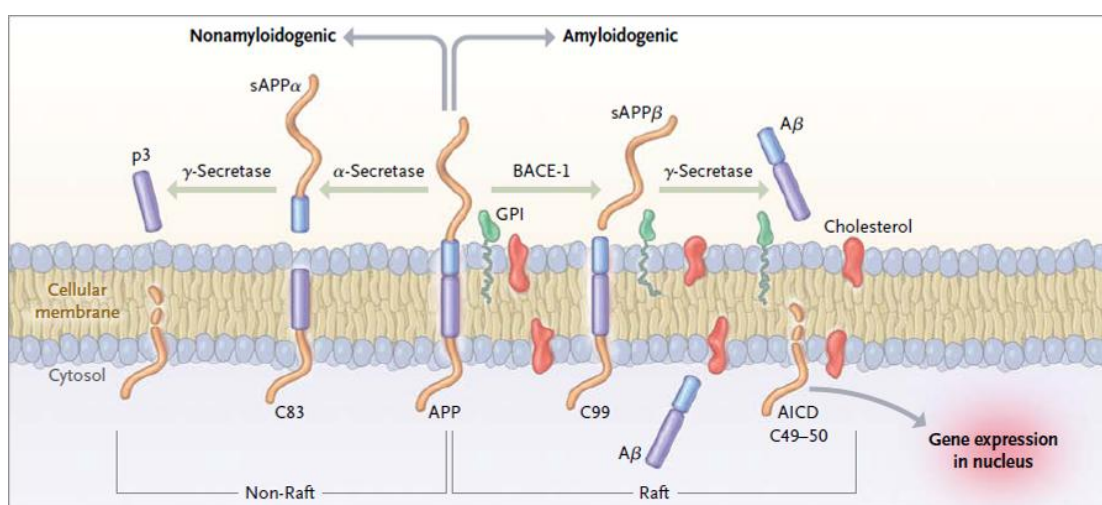
Η νόσος του Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease, AD) είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από δύο κύριους τύπους πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων: το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (Aβ), το οποίο συσσωρεύεται και δημιουργεί τις αμυλοειδείς πλάκες στον εξωκυττάριο χώρο του εγκεφάλου, και την πρωτεΐνη tau που συσσωρεύεται δημιουργώντας τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (neurofibrillary tangles, NFTs) μέσα στους νευρώνες του εγκεφάλου (Benilova et al., 2012; Masters et al., 2015; X. Zhang et al., 2018). Τα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της AD περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Alois Alzheimer το 1906, όταν παρατήρησε ότι ασθενείς ανέπτυξαν νευριτικές πλάκες και NFTs στον εγκέφαλό τους. Αρκετά αργότερα, τη δεκαετία του 1980, το Αβ πεπτίδιο και η πρωτεΐνη tau ταυτοποιήθηκαν ως τα κύρια συστατικά των πλακών και των NFTs, αντίστοιχα (Haass & Selkoe, 2007; Jeong, 2017).

Η σποραδική μορφή της νόσου είναι ο πιο κοινός τύπος που συναντάται στους ασθενείς με AD, με την αποτυχία απομάκρυνσης του Αβ πεπτιδίου από τον εγκέφαλο να

αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα. Μεταλλάξεις σε γονίδια που προκαλούν υπερπαραγωγή ή σχηματισμό των παθολογικών μορφών του Αβ πεπτιδίου έχουν χαρακτηριστεί για την αυτοσωματική επικρατούσα κληρονομική (οικογενής) μορφή της AD, που παρατηρείται στο 1-5% όλων των ασθενών που πάσχουν από AD (Masters et al., 2015; Reitz et al., 2011). Η μέση ηλικία έναρξης της σποραδικής μορφής της AD είναι τα 80 έτη, ενώ της οικογενούς περίπου τα 45 έτη. Κατά κανόνα, οι ασθενείς που πάσχουν από AD εμφανίζουν αρχικά μια ήπια έκπτωση της μνήμης, η οποία προοδευτικά επιδεινώνεται. Επίσης, οι ασθενείς εμφανίζουν δυσκολία στη βραχυπρόθεσμη μνήμη, στη συγκέντρωση του λόγου, στην οπτικοχωρική επεξεργασία καθώς και στην εκτέλεση νοητικών λειτουργιών (Masters et al., 2015).

Το γονίδιο *APP* (MIM \*104760) ήταν το πρώτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε να κατέχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της AD (Haass & Selkoe, 2007). Κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς (β-amyloid precursor protein, APP), η οποία εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 21 (*21q21.3*). Η APP είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που προσομοιάζει με υποδοχέα, η οποία εκφράζεται ευρέως σε νευρικά και άλλα είδη κυττάρων (Haass & Selkoe, 2007; Masters et al., 2015) και εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη των νευρώνων, η συναπτογένεση και η κυτταρική προσκόλληση (C. Crdenas-Aguayo et al., 2014). Η APP υφίσταται μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία εντός της διαμεμβρανικής περιοχής της μέσω τριών πρωτεασών που είναι αγκυροβολημένες στη μεμβράνη (membrane-anchored proteases) γνωστές ως α-, β-, και γ-εκκριτάσες. Οι α- και β-εκκριτάσες εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ αντίθετα οι γ-εκκριτάσες δρουν εντός της διαμεμβρανικής τους περιοχής. Η μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία της APP μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο διακριτών μονοπατιών: το αμυλοειδογενές και το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι. Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι (που αποτελεί περίπου το 10% της πρωτεόλυσης της APP), η APP διασπάται από τη β-εκκριτάση [ή beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE-1)], οδηγώντας στην παραγωγή και απελευθέρωση του αμινοτελικού άκρου της APP (sAPPβ) και ενός καρβοξυτελικού τμήματος 99 ή 89 αμινοξικών καταλοίπων (C99 ή C89). Η επακόλουθη διάσπαση του C99 από τη γ-εκκριτάση οδηγεί στην παραγωγή του Αβ πεπτιδίου καθώς και ενός ενδοκυτταρικού καρβοξυτελικού τμήματος της APP, γνωστό ως AICD (APP intracellular C-terminal domain). Η γ-εκκριτάση διασπά την APP σε διάφορες θέσεις παράγοντας ποικιλία Αβ πεπτιδίων και AICD τμημάτων. Οι ακριβείς θέσεις αυτών των διασπάσεων είναι υψίστης σημασίας για την ικανότητα αυτοσυσσώματωσης και τελικά την παθογένεια του Αβ πεπτιδίου (Benilova et al., 2012). Το πεπτίδιο Αβ μπορεί να ποικίλει σε μέγεθος, αποτελούμενο από 39-43 αμινοξέα (Jeong, 2017; Madhu & Mukhopadhyay, 2021; X. Zhang et al., 2018). Αν και το πεπτίδιο που κυρίως παράγεται (σε ποσοστό περίπου 90%) είναι εκείνο με μήκος 40 αμινοξέων (Αβ<sub>1-40</sub>), το Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο (που παράγεται σε ποσοστό περίπου 10%) έχει την τάση να σχηματίζει ινίδια και θεωρείται πιο επιρρεπές στη συσσωμάτωση και κατ' επέκταση πιο νευροτοξικό από το Αβ<sub>1-40</sub> (Benilova et al., 2012; C. Crdenas-Aguayo et al., 2014; Jeong, 2017; X. Zhang et al., 2018). Το Αβ πεπτίδιο έχει την τάση να αυτο-συγκεντρώνεται σε μονομερή (monomers), διμερή (dimers) ή

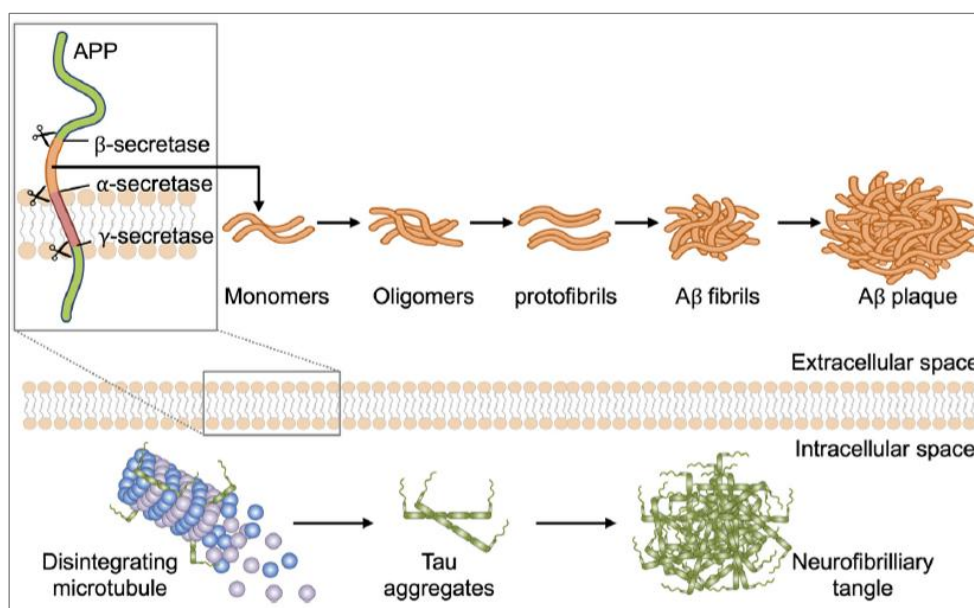
ολιγομερή (oligomers), τα οποία στη συνέχεια συνενώνονται δημιουργώντας ινίδια (fibrils), τα οποία διατάσσονται σε β-πτυχωτά φύλλα για να σχηματίσουν τις αδιάλυτες, και θερμοδυναμικά σταθερές, ίνες (insoluble fibrils) που συναντώνται στις εξωκυττάριες αμυλοειδείς πλάκες (C. Crdenas-Aguayo et al., 2014; Madhu & Mukhopadhyay, 2021; Querfurth & LaFerla, 2010). Αντίθετα, στο μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι και σε ποσοστό περίπου 90%, η APP διασπάται από την α-εκκριτάση οδηγώντας στην παραγωγή και απελευθέρωση του αμινοτελικού άκρου της APP (sAPP $\alpha$ ) και ενός καρβοξυτελικού τμήματος 83 αμινοξικών καταλοίπων (C83). Η επακόλουθη διάσπαση του C83 από τη γ-εκκριτάση οδηγεί και πάλι στην παραγωγή Αβ πεπτιδίων και AICD τμημάτων. Εντούτοις, τα παραγόμενα Αβ πεπτίδια (p3 πεπτίδια) είναι κυρίως Αβ<sub>17-40</sub> και Αβ<sub>17-42</sub>, τα οποία δε δημιουργούν συσσωματώματα (C. Crdenas-Aguayo et al., 2014; V. W. Chow et al., 2010; Querfurth & LaFerla, 2010).



**Εικόνα 1.8:** Το αμυλοειδογενές και το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι μέσω των οποίων πραγματοποιείται η μετα-μεταφραστική πρωτεολυτική επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του β αμυλοειδούς, APP. Η μη-αμυλοειδογενής επεξεργασία (αριστερά) της πρόδρομης πρωτεΐνης του β αμυλοειδούς, APP, ξεκινά από τη διάσπαση της α-εκκριτάσης εντός της ακολουθίας της. Ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα της APP πρωτεΐνης, sAPP $\alpha$ , απελευθερώνεται, αφήνοντας πίσω ένα θραύσμα 83 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο. Το C83 στη συνέχεια διασπάται από τη γ-εκκριτάση, απελευθερώνοντας το εξωκυτταρικό p3 πεπτίδιο και το ενδοκυτταρικό AICD. Η αμυλοειδογενής επεξεργασία (δεξιά) της APP ξεκινά από τη β-εκκριτάση, BACE-1, απελευθερώνοντας ένα μικρότερο σε μέγεθος εξωκυτταρικό τμήμα της APP, το sAPP $\beta$ . Το προκύπτον καρβοξυτελικό θραύσμα 99 αμινοξέων, C99, αποτελεί επίσης υπόστρωμα της γ-εκκριτάσης, παράγοντας το Αβ πεπτίδιο και το AICD. Η διάσπαση από τη γ-εκκριτάση λαμβάνει χώρα εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Τα sAPP $\alpha$  και sAPP $\beta$  είναι εκκρινόμενα θραύσματα του APP μετά από τις διασπάσεις της α-εκκριτάσης και β-εκκριτάσης, αντίστοιχα. Το AICD, μήκους περίπου 50 αμινοξέων, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα με στόχο τον πυρήνα όπου σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων [τροποποίηση από (Querfurth & LaFerla, 2010)].

Ο κρίσιμος ρόλος του πεπτιδίου Αβ στην ανάπτυξη της AD έχει αποδειχθεί μέσω της μελέτης γονιδιακών μεταλλάξεων που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή του Αβ πεπτιδίου. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες συσχέτισης πλήρους γονιδιώματος (genome-wide association studies, GWAS) σε ασθενείς με οικογενή AD έχουν αναδείξει μεταλλάξεις (ιδιαίτερα μη νοσηματικές μεταλλάξεις) στο APP γονίδιο, στο γονίδιο

πρεσενιλίνης-1 (presenilin-1, *PSEN1*, 14q24.3) και στο γονίδιο πρεσενιλίνης-2 (presenilin-2, *PSEN2*, 1q42.1). Τα *PSEN1* (MIM \*104311) και *PSEN2* (MIM \*600759) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αποτελούν συστατικά του συμπλόκου της γ-εκκριτάσης (Haass & Selkoe, 2007; X. Zhang et al., 2018). Οι περισσότερες μεταλλάξεις των παραπάνω γονιδίων οδηγούν σε υπερπαραγωγή του Αβ<sub>42</sub> πεπτιδίου ή σε αύξηση του λόγου Αβ<sub>42</sub>/Αβ<sub>40</sub> έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα Αβ ολιγομερών και την εναπόθεση αμυλοειδικών πλακών (Jeong, 2017; Masters et al., 2015; X. Zhang et al., 2018). Επιπρόσθετα, το επιπλέον αντίγραφο του χρωμοσώματος 21 στους ασθενείς με σύνδρομο Down (MIM #190685), οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή Αβ πεπτιδίου και σε εμφάνιση συνήθως κατά την τέταρτη δεκαετία της ζωής τους του φαινοτύπου της AD, υποστηρίζοντας περαιτέρω την εμπλοκή του *APP* γονιδίου στην ανάπτυξη της νόσου. Επιπλέον, μετάλλαξη στο γονίδιο *APP* που οδηγεί σε μείωση της παραγωγής του Αβ πεπτιδίου έχει προστατευτική δράση έναντι της όψιμης εμφάνισης της AD (Masters et al., 2015). Τέλος, η πρωτεΐνη ApoE, μία γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και το ήπαρ (X. Zhang et al., 2018), έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τη AD (Reitz et al., 2011). Ειδικότερα, η ApoE4 πρωτεΐνη, μία από τις τρεις ισομορφές της ApoE, μπορεί να δράσει ως παθολογικός μοριακός συνοδός ξεκινώντας τη συσσώματωση του Αβ πεπτιδίου μέσω της σύνδεσής της με το Αβ πεπτίδιο και επηρεάζοντας την απομάκρυνσή του από το κύτταρο (Jeong, 2017; Masters et al., 2015; X. Zhang et al., 2018).



**Εικόνα 1.9: Συσσωμάτωση του Αβ πεπτιδίου και της πρωτεΐνης tau.** Η πρόδρομη πρωτεΐνη του β αμυλοειδούς, APP, υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από τις α-, β- και γ- εκκριτάσες. Τα μονομερή (monomers) του Αβ πεπτιδίου μπορούν να συσσωματωθούν δημιουργώντας τα Αβ ολιγομερή (oligomers), τα ενδιάμεσα πρωτοϊνίδια (protofibrils), τα Αβ ινίδια (Aβ fibrils) και τελικά τις αμυλοειδείς πλάκες (Aβ plaque), οι οποίες αποτελούν ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της AD. Η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau οδηγεί σε απώλεια της σύνδεσής της με τους μικροσωληνίσκους και επακόλουθα σε αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης tau, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των tau πρωτεϊνών. Η συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau ευνοεί το σχηματισμό νευροϊνδιακών δεματίων

(neurofibrillary tangle) και την προοδευτική αλλαγή του κυτταροσκελετού, ενώ οδηγεί και σε διαταραχή της αξονικής μεταφοράς συμβάλλοντας στην παθολογία της AD (S. J. Lee et al., 2021).

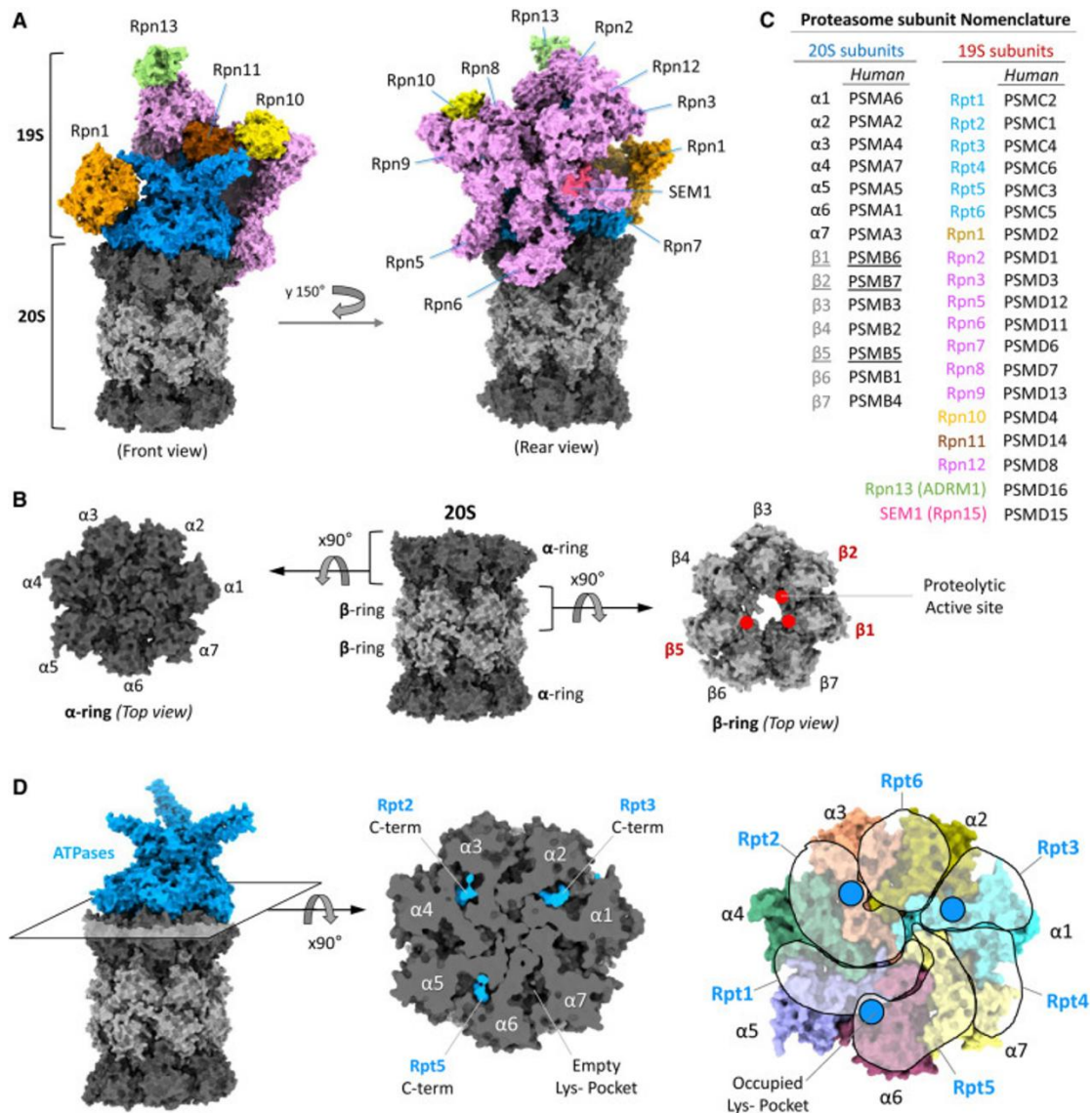
Αν και η υπόθεση του αμυλοειδούς υποστηρίζει ότι το Αβ πεπτίδιο αποτελεί την κύρια αιτία της AD (Hardy & Selkoe, 2002; Jeong, 2017; X. Zhang et al., 2018), πολλά παθολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στους ασθενείς, όπως η γνωστική εξασθένηση, σχετίζονται με τη συσσώρευση της πρωτεΐνης tau. Η tau είναι μία πρωτεΐνη που συμβάλει στη νευρωνική ακεραιότητα. Συγκεκριμένα, συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους και βρίσκεται φυσιολογικά στους νευρικούς άξονες, όπου μέσω της σύνδεσης και σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων συμβάλλει στην αξονική μεταφορά και πολικότητα (Jeong 2017). Στην AD, η tau υφίσταται υπερφωσφορυλίωση, εσφαλμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωση οδηγώντας στο σχηματισμό NFTs (Jeong, 2017; Masters et al., 2015). Παρά το γεγονός ότι δεν έχει αναφερθεί κάποια μετάλλαξη που να σχετίζεται με την πρωτεΐνη tau στους ασθενείς με AD, μεταλλάξεις έχουν καταγραφεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tau (*MAPT*), οι οποίες μεταβάλλουν την αλληλουχία της πρωτεΐνης και αυξάνουν την εσφαλμένη αναδίπλωσή της, οδηγώντας όμως σε άλλη μορφή άνοιας (Chung et al., 2019; Nizynski et al., 2017). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *MAPT* οδηγεί στην παραγωγή έξι βασικών ισομορφών της πρωτεΐνης tau στον ανθρώπινο εγκέφαλο (Nizynski et al., 2017).

## 1.2 Πρωτεάσωμα

### 1.2.1 Το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος

Το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS) είναι ένας εξαιρετικά συντηρημένος μηχανισμός μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών (Gu & Enenkel, 2014). Ο ρόλος του είναι να διατηρεί την ομοιόσταση των πρωτεϊνών και να εποπτεύει το ρυθμό αναπλήρωσής τους, διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης και της συνεχούς σύνθεσης νέων πρωτεϊνών. Αν και αρκετές πρωτεΐνες είναι πολύ σταθερές μέσα στο κύτταρο, ένα σημαντικό ποσοστό πρωτεϊνικών μορίων παρουσιάζουν ελαττωματική δομή λόγω σφαλμάτων κατά τη σύνθεση και/ή την αναδίπλωσή τους, υφίστανται οξειδωτικές βλάβες επηρεάζοντας τη λειτουργικότητά τους ή έχουν μικρό χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο (π.χ. ρυθμιστικές πρωτεΐνες). Έτσι, ο ρόλος του UPS είναι να απομακρύνει τις κατεστραμμένες ή μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, καθώς και όσες έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής, καθορίζοντας έτσι το χρόνο αλλά και το ρυθμό με τον οποίο μια πρωτεΐνη θα διασπαστεί. Ο πυρήνας αυτού του συστήματος είναι το πρωτεάσωμα (proteasome), ένα πρωτεολυτικό σύμπλοκο που εντοπίζεται σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα (Enenkel, 2014; Türker et al., 2021; H. Yu & Matouschek, 2017). Ειδικότερα, το πρωτεάσωμα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Palmer et al., 1996), στον πυρήνα (Ádori et al., 2006; Franić et al., 2021; Rivett et al., 1992; Scharf et al., 2007) και στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Ramachandran et al., 2018; Ramachandran & Margolis, 2017), ενώ πρωτεασώματα έχουν εντοπιστεί και στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Ben-Nissan et al., 2022; Dwivedi et al., 2021; Kulichkova et al., 2017; Lavabre-Bertrand et al., 2001). Οι λειτουργίες του δεν περιορίζονται μόνο στη διατήρηση της πρωτεόστασης· το πρωτεάσωμα εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της επιδιόρθωσης του DNA, της απόπτωσης, της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και της απόκρισης στο στρες, μεταξύ άλλων (Bard et al., 2018; Rousseau & Bertolotti, 2018), υπογραμμίζοντας τον καίριο ρόλο του στην κυτταρική επιβίωση.

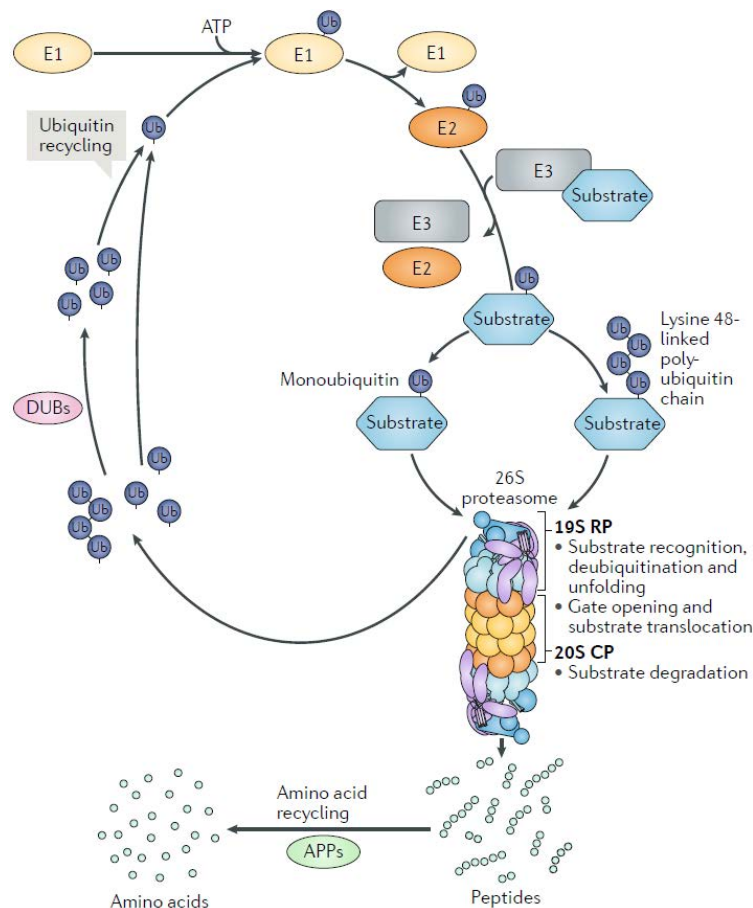
Το πρωτεάσωμα, μεγέθους περίπου 2.5 MDa, απαρτίζεται από τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα· από ένα κυλινδρικό, σε σχήμα βαρελιού, πρωτεολυτικό πυρήνα που ονομάζεται 20S καταλυτικό κέντρο (core particle, CP ή 20S πρωτεάσωμα) και από μία ή δύο 19S ρυθμιστικές υπομονάδες (regulatory particle, RP), γνωστές και ως PA700 activators. Όταν ένα 19S RP καλύπτει το 20S καταλυτικό κέντρο, δημιουργείται η 26S διαμόρφωση του πρωτεασώματος, ενώ η προσάρτηση του 19S RP και στις δύο πλευρές του CP οδηγεί στη διαμόρφωση του 30S πρωτεασώματος (Enenkel, 2014; Gu & Enenkel, 2014; H. Yu & Matouschek, 2017). Δεδομένου ότι οι 30S και 26S διαμορφώσεις αναφέρονται στη βιβλιογραφία συχνά ως 26S πρωτεάσωμα (G. A. Collins & Goldberg, 2017), θα αναφερόμαστε στη συνέχεια και στις δύο διαμορφώσεις ως 26S πρωτεάσωμα.



**Εικόνα 1.10: Η δομή του ανθρώπινου 26S πρωτεασώματος.** Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό κέντρο (σκούρο και ανοιχτό γκρι) και από μία 19S ρυθμιστική υπομονάδα (χρωματιστή). Τρεις υποδοχείς ομπικιτίνης στη 19S ρυθμιστική υπομονάδα [Rpn1 (πορτοκαλί), Rpn10 (κίτρινο) και Rpn13 (πράσινο)] είναι τοποθετημένοι περιφερειακά σαν μια «κουκούλα» που εσωκλείει όλες τις υπόλοιπες Rpn υπομονάδες [Rpn11 (καφέ), Sem1 (φούζια) και όλες οι υπόλοιπες (λιλά)] όπου περιβάλλουν τις έξι υπομονάδες με δράση ATPάσης τύπου AAA+ (μπλε). (B) Πλάγια όψη του 20S καταλυτικού κέντρου όπου φαίνονται οι τέσσερις δακτύλιοι στοιβαγμένοι σε διάταξη α1-7β1-7β1-7α1-7. Η άνω όψη του επάνω α-τύπου δακτύλιου (με κλειστή την πρωτεασωμική «πύλη») και του πρώτου (με σειρά εμφάνισης) β-τύπου δακτύλιου δείχνει τις επτά ομόλογες υπομονάδες σε ένα πρωτεάσωμα που βρίσκεται σε ηρεμία. Οι κόκκινες κουκίδες στο β-τύπου δακτύλιο υποδεικνύουν τις θέσεις των τριών καταλυτικών υπομονάδων του 20S καταλυτικού κέντρου β1, β2 και β5. (C) Ονοματολογία των υπομονάδων του 26S πρωτεασώματος. Η χρωματική κωδικοποίηση των υπομονάδων αντιστοιχεί σε αυτή της εικόνας (A). (D) Η αλληλεπίδραση των έξι υπομονάδων με δράση ATPάσης τύπου AAA+ με τον α-τύπου δακτύλιο του 20S καταλυτικού κέντρου (αριστερά). Η τομή στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης δείχνει τις τρεις καρβοξυ-τελικές ουρές [μοτίβο HbYX (μπλε)] των υπομονάδων Rpt2, Rpt3 και Rpt5 που εισάγονται στις αντίστοιχες τρεις (από τις συνολικά επτά) θέσεις λυσίνης στον α-τύπου δακτύλιο (στη μέση). Ασύμμετρη διάταξη των έξι υπομονάδων με δράση ATPάσης τύπου AAA+ επάνω στο δακτύλιο των επτά α-τύπου υπομονάδων (δεξιά). Κάθε διαφανές

*σχήμα αντιπροσωπεύει μια AAA+ περιοχή κάθε υπομονάδας με δράση ATPάσης. Οι μπλε κύκλοι υποδεικνύουν τη θέση της καρβοξυ-τελικής εισαγωγής στη θέση λυσίνης (Sahu & Glickman, 2021).*

Η ουμπικιτίνη (ubiquitin, Ub) είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη 76 αμινοξέων και αποτελεί κρίσιμο μόριο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του UPS (N. Zheng & Shabek, 2017). Ο ρόλος της ουμπικιτίνης είναι να τροποποιεί/επισημαίνει το πρωτεϊνικό υπόστρωμα που προορίζεται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ουμπικιτινυλίωση. Η σύνδεση της ουμπικιτίνης στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα είναι ATP (Adenosine-triphosphate)-εξαρτώμενη και καταλύεται από τρία ένζυμα: το ένζυμο ενεργοποίησης της ουμπικιτίνης E1, το ένζυμο σύζευξης της ουμπικιτίνης E2 και η λιγάση της ουμπικιτίνης E3 (Saeki, 2017; H. Yu & Matouschek, 2017). Ειδικότερα, το ένζυμο ενεργοποίησης της ουμπικιτίνης E1 ενεργοποιεί την ουμπικιτίνη μέσω κατανάλωσης ATP. Η ενεργοποιημένη πλέον ουμπικιτίνη μεταφέρεται στο ένζυμο σύζευξης της ουμπικιτίνης E2. Το τελευταίο βήμα της ουμπικιτινυλίωσης διαμεσολαβείται από τη λιγάση της ουμπικιτίνης E3, η οποία συνδέεται με το ένζυμο E2 και την πρωτεΐνη-στόχο, διευκολύνοντας τη μεταφορά της ουμπικιτίνης από το ένζυμο E2 στο υπόστρωμα που θα αποικοδομηθεί. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να σχηματιστεί μια πολυ-ουμπικιτινική αλυσίδα, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα διευκολύνοντας την αναγνώριση του υποστρώματος από το πρωτεάσωμα μέσω ειδικών υποδοχέων στις Rpn10, Rpn13 και Rpn1 υπομονάδες του 19S RP. Η πολυ-ουμπικιτινική αλυσίδα σχηματίζεται έπειτα από τη σύνδεση της καρβοξυ-τελικής ομάδας της ουμπικιτίνης με τα κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου μέσω ισοπεπτιδικού δεσμού. Έπειτα από την αρχική προσθήκη μιας ουμπικιτίνης σε ένα κατάλοιπο λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου, περισσότερα μόρια ουμπικιτίνης μπορούν να προστεθούν με τη σύνδεση της αμινικής ομάδας του καταλοίπου λυσίνης του ενός μορίου ουμπικιτίνης στην τελική καρβοξυλική ομάδα του άλλου (Bard et al., 2018). Τέσσερα μόρια ουμπικιτίνης συνδεδεμένα μέσω καταλοίπων λυσίνης 48 (Lys48) αποτελούν την τυπική μορφή ουμπικιτινυλίωσης (τετρα-ουμπικιτινυλίωση)· ωστόσο, έχουν αναφερθεί επίσης η μονο-ουμπικιτινυλίωση και οι πολλαπλές μονο-ουμπικιτινυλίώσεις (Braten et al., 2016; Livneh et al., 2017). Οι λιγάσες E3 είναι βασικοί ρυθμιστές της αλυσίδας ουμπικιτινυλίωσης, καθώς ελέγχουν την αποτελεσματικότητα και την ειδικότητα αυτής της αντίδρασης. Η ύπαρξη αρκετών εκατοντάδων λιγασών E3 που υπάρχουν στα ανθρώπινα κύτταρα, σε αντίθεση με τις λίγες δεκάδες E2 και τα μόλις δύο ένζυμα E1, αντανakλούν τον κρίσιμο ρόλο τους (Deshaies & Joazeiro, 2009; H. Yu & Matouschek, 2017). Καθώς το πρωτεϊνικό υπόστρωμα προσκολλάται στο 19S RP, τα ένζυμα απο-ουμπικιτινυλίωσης (deubiquitinating enzymes, DUBs) αφαιρούν τα μόρια ουμπικιτίνης από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα για να προάγουν τη μεταφορά του στον πυρήνα του πρωτεολυτικού συμπλόκου και να εμποδίσουν την αποικοδόμηση των μορίων ουμπικιτίνης μαζί με το υπόστρωμα στο οποίο είναι δεσμευμένα (Finley & Prado, 2020; Grice & Nathan, 2016; H. Yu & Matouschek, 2017). Όλες οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες θεωρούνται συστατικά του UPS.



**Εικόνα 1.11: Το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος.** Η ουμπικιτινυλίωση περιλαμβάνει τη σύνδεση της ουμπικιτίνης (Ub) με κατάλοιπα λυσίνης που εκτίθενται στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων που πρόκειται να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα. Αρχικά, η ουμπικιτίνη ενεργοποιείται από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουμπικιτίνης E1 με ταυτόχρονη κατανάλωση ATP, πριν δεσμευτεί στο E1. Στη συνέχεια, η ουμπικιτίνη μεταφέρεται από το ένζυμο E1 στο ένζυμο σύζευξης της ουμπικιτίνης E2. Μια λιγάση ουμπικιτίνης E3 στρατολογεί το δεσμευμένο με ουμπικιτίνη ένζυμο E2 και το υπόστρωμα ώστε να μεταφέρει την ουμπικιτίνη από το E2 στο υπόστρωμα. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουμπικιτίνης συνδεδεμένων στη λυσίνη 48 (το κύριο σήμα για τη διάσπαση από το πρωτεάσωμα) διευκολύνεται μέσω διαδοχικών κύκλων σύζευξης ουμπικιτίνης, ενώ η μονο-ουμπικιτινυλίωση μπορεί επίσης να είναι επαρκής για την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Τα υποστρώματα αποικοδομούνται σε μικρά πεπτίδια, τα οποία διασπώνται περαιτέρω σε αμινοξέα από αμινοπεπτιδάσες (aminopeptidases, APPs). Τα μόρια μονο-ουμπικιτίνης και πολύ-ουμπικιτίνης αφαιρούνται από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα από ένζυμα απο-ουμπικιτινυλίωσης (DUBs) πριν από τη διάσπαση του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Τα ελεύθερα μόρια ουμπικιτίνης ανακυκλώνονται για να χρησιμοποιηθούν σε νέο κύκλο ουμπικιτινυλίωσης. CP (καταλυτικό κέντρο), RP (ρυθμιστική υπομονάδα) (Rousseau & Bertolotti, 2018).

Εκτός από την ουμπικιτινο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση πρωτεϊνών, πρωτεόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί και απουσία ουμπικιτίνης (Rousseau & Bertolotti, 2018; H. Yu & Matouschek, 2017). Αυτός ο τύπος αποικοδόμησης πρωτεϊνών διεξάγεται κυρίως από το 20S πρωτεάσωμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι το 20S πρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης υπό συνθήκες στρες, ιδιαίτερα οξειδωτικού στρες, όπου το κύτταρο έρχεται αντιμέτωπο με πολλές κατεστραμμένες πρωτεΐνες (Ben-Nissan & Sharon, 2014; Davies, 2001; Pickering & Davies, 2012;

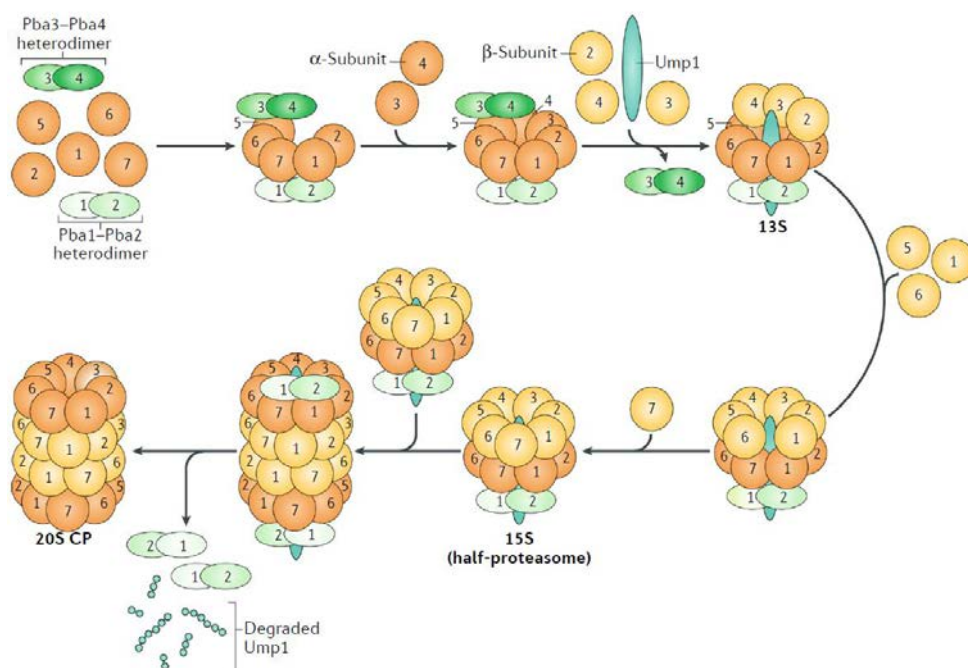
Raynes et al., 2016). Η στενή είσοδος του 20S CP, καθώς και η απουσία των υπομονάδων 19S RP (που διευκολύνουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων), οδήγησαν στην υπόθεση ότι πρωτεΐνες που είναι μερικώς ή χαλαρά αναδιπλωμένες είναι στόχοι της ουμπικιτινο-ανεξάρτητης πρωτεόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, αυτές είναι πρωτεΐνες που είτε έχουν εγγενώς αποδιοργανωμένες περιοχές (intrinsically disordered regions, IDRs) είτε έχουν χάσει την τριτοταγή τους δομή (Ben-Nissan & Sharon, 2014; Njomen & Tepe, 2019; Q. Yu et al., 2024). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το 20S πρωτεάσωμα μπορεί επίσης να αποικοδομήσει και πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί με ουμπικιτίνη (Sahu et al., 2021), υπογραμμίζοντας τη συμπληρωματική δράση των 20S και 26S πρωτεασωμάτων στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση (Ben-Nissan & Sharon, 2014; Y. Kim et al., 2023). Περαιτέρω απόδειξη της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ των δύο μορφών του πρωτεασώματος αποκαλύπτεται από την παρατήρηση ότι υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, το 26S πρωτεάσωμα έχει τη δυνατότητα να διασπάται στα επιμέρους 20S και 19S σύμπλοκα, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα του 20S πρωτεασώματος (Grune et al., 2011; Höhn et al., 2013; Kriegenburg et al., 2011; Reeg & Grune, 2015).

#### 1.2.1.1 20S καταλυτικό κέντρο

Τέσσερις επταμερείς δακτύλιοι στοιβάζονται για να σχηματίσουν το 20S καταλυτικό κέντρο του πρωτεασώματος μοριακού βάρους 700 kDa. Αυτό το κυλινδρικό, σε σχήμα βαρελιού, σύμπλεγμα που αποτελείται από 28 συνολικά υπομονάδες, σχηματίζεται από δύο β-τύπου δακτυλίους που βρίσκονται εσωτερικά του CP και από δύο εξωτερικούς α-τύπου δακτυλίους που εδράζονται εκατέρωθεν των β-τύπου δακτυλίων καλύπτοντας κάθε πλευρά του κυλινδρικού αυτού συμπλέγματος. Κάθε α- και β-τύπου δακτύλιος αποτελείται από επτά διαφορετικές, αλλά δομικά παρόμοιες, υπομονάδες, οι οποίες σχηματίζουν τελικά τη διάταξη  $\alpha 1-7\beta 1-7\beta 1-7\alpha 1-7$ . Οι εσωτερικές β υπομονάδες σχηματίζουν μια μεγάλη εσωτερική κοιλότητα μέσα στην οποία τελείται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Τρεις β υπομονάδες σε κάθε δακτύλιο, οι  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  και  $\beta 5$ , έχουν πρωτεολυτική δραστηριότητα με διαφορετική προτίμηση διάσπασης, που αποδίδεται στο κατάλοιπο θρεονίνης στο αμινο-τελικό άκρο των καταλυτικών τους κέντρων (Glickman & Ciechanover, 2002; Rousseau & Bertolotti, 2018; Saeki, 2017; H. Yu & Matouschek, 2017). Ειδικότερα, η  $\beta 1$  υπομονάδα έχει ενεργότητα κασπάσης (caspase-like, C-L) [επίσης γνωστή ως δραστηριότητα πεπτιδυλο-γλουταμυλο-υδρολάσης (PGPH)], η  $\beta 2$  υπομονάδα έχει ενεργότητα θρυψίνης (trypsin-like, T-L) και η  $\beta 5$  υπομονάδα έχει ενεργότητα χυμοθρυψίνης (chymotrypsin-like, CT-L) (Budenhölder et al., 2017; Rousseau & Bertolotti, 2018). Οι πρωτεολυτικές ενεργότητες C-L, T-L και CT-L οδηγούν στη διάσπαση του πεπτιδικού σκελετού μετά από όξινα, βασικά ή υδρόφοβα κατάλοιπα, αντίστοιχα (H. Yu & Matouschek, 2017). Οι α-τύπου υπομονάδες δεν θεωρείται ότι διαθέτουν κάποιου είδους ενζυμική ενεργότητα. Ωστόσο, οι υψηλά συντηρημένες και στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους αμινο-τελικές ουρές των α-τύπου υπομονάδων έχουν λειτουργικό ρόλο, καθώς σχηματίζουν την πρωτεασωμική «πύλη» με διάμετρο περίπου 13 Å (Budenhölder et al.,

2017; G. A. Collins & Goldberg, 2017; Rousseau & Bertolotti, 2018; H. Yu & Matouschek, 2017). Αυτό το στενό άνοιγμα χρησιμεύει ως πύλη του πρωτεασώματος επιτρέποντας την είσοδο του πρωτεϊνικού υποστρώματος στον πρωτεολυτικό θάλαμο. Συγκεκριμένα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα αμινο-τελικά κατάλοιπα της α3 υπομονάδας του πρωτεασώματος έχουν σημαντικό ρόλο, καθώς ελέγχουν την είσοδο του υποστρώματος και το άνοιγμα της πύλης (Groll et al., 2000).

Η βιογένεση του 20S καταλυτικού κέντρου στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μεσολαβείται από πολλούς παράγοντες με σκοπό τη διασφάλιση της σωστής συναρμολόγησής του. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τις εγγενείς ιδιότητες αυτοσυναρμολόγησης των υπομονάδων, τις αμινο- και καρβοξυ-τελικές ομάδες συγκεκριμένων υπομονάδων, καθώς και εξειδικευμένες πρωτεΐνες συνοδούς. Η συναρμολόγηση είναι λιγότερο πολύπλοκη διαδικασία για τα πιο απλά πρωτεασώματα που συναντώνται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, και μόνο ορισμένα χαρακτηριστικά συναρμολόγησης είναι κοινά μεταξύ των καταλυτικών κέντρων των πρωτεασωμάτων των βακτηρίων, των αρχαιοβακτηρίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών (Budenholzer et al., 2017). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η συναρμολόγηση του καταλυτικού κέντρου του πρωτεασώματος μπορεί να χωριστεί σε τρία βήματα: στη διαμόρφωση του α-τύπου δακτυλίου, στη διαμόρφωση του β-τύπου δακτυλίου και στο διμερισμό των ημιπρωτεασωμάτων και την ωρίμανση του πρωτεασώματος. Όλα τα προαναφερθέντα βήματα μεσολαβούνται από πέντε πρωτεΐνες συνοδούς συναρμολόγησης του πρωτεασώματος (proteasome assembly chaperons) ονόματι proteasome biogenesis-associated 1 (Pba1)-Pba4 στο ζυμομύκητα [proteasome assembly chaperone 1 (PAC1)-PAC4 στον άνθρωπο] και από τις underpinning maturation of proteasome 1 (Ump1) [proteasome maturation protein (POMP) στον άνθρωπο].



*Εικόνα 1.12: Το μοντέλο συναρμολόγησης του 20S καταλυτικού κέντρου του πρωτεασώματος (Rousseau & Bertolotti, 2018).*

*Σχηματισμός του α-τύπου δακτυλίου.* Από τις πέντε πρωτεΐνες συνοδούς συναρμολόγησης του πρωτεασώματος, οι τέσσερις είναι αφιερωμένες στη συναρμολόγηση του α-τύπου δακτυλίου, υποδηλώνοντας πως η οργάνωση των επτά διαφορετικών α-τύπου υπομονάδων σε έναν επταμερή δακτύλιο αποτελεί κρίσιμο βήμα για τη συναρμολόγηση του 20S πρωτεασώματος. Αυτές οι τέσσερις πρωτεΐνες συνοδοί σχηματίζουν δύο ετεροδιμερή, το Pba1–Pba2 και το Pba3–Pba4. Το σύμπλοκο Pba1–Pba2 διασφαλίζει την κατάλληλη ενσωμάτωση των α5 και α6 υπομονάδων του α-τύπου δακτυλίου, ενώ παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπει την πρόωρη σύνδεση του 19S RP με τον α-τύπου δακτύλιο. Στους ανθρώπους, εκτός από την αποτροπή της πρόωρης σύνδεσης με το 19S RP, η σύνδεση του PAC1–PAC2 με την ενδιάμεση μορφή του α-τύπου δακτυλίου αποτρέπει τον ανώμαλο διμερισμό των α-τύπου δακτυλίων. Στο ζυμομύκητα, το σύμπλοκο Pba3–Pba4 αλληλοεπιδρά με την υπομονάδα α5 του ενδιάμεσου α-τύπου δακτυλίου για να ελέγξει τη σωστή ενσωμάτωση των υπομονάδων α3 και α4 (Budenholzer et al., 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018).

*Σχηματισμός του β-τύπου δακτυλίου.* Ο α-τύπου δακτύλιος λειτουργεί ως μήτρα για τη συναρμολόγηση του β-τύπου δακτυλίου, η οποία ξεκινά με τη σταδιακή πρόσληψη των υπομονάδων β2, β3 και έπειτα της β4. Η πρωτεΐνη Ump1 ενσωματώνεται μαζί με τις πρώτες β-τύπου υπομονάδες, ενώ το σύμπλοκο Pba3–Pba4 αποσυνδέεται από τον α-τύπου δακτύλιο μετά την ενσωμάτωση της β3 υπομονάδας. Το προκύπτον ενδιάμεσο σύμπλοκο 13S, προσλαμβάνει στη συνέχεια τις υπομονάδες β5, β6, β1 και β7 για να σχηματίσει το σύμπλοκο 15S, το οποίο ονομάζεται ημιπρωτεάσωμα («μισό» πρωτεάσωμα). Ο διμερισμός των ημιπρωτεασωμάτων ξεκινά απευθείας μετά την ενσωμάτωση της β7 υπομονάδας, η ενσωμάτωση της οποίας θεωρείται ότι λειτουργεί ως περιοριστικός παράγοντας για το σχηματισμό του 20S CP (Betancourt et al., 2023; Budenholzer et al., 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018).

*Διμερισμός ημιπρωτεασωμάτων και ωρίμανση του πρωτεασώματος.* Η πρωτεΐνη Ump1 αποτρέπει τον ακατάλληλο διμερισμό των ημιπρωτεασωμάτων έως ότου διασφαλιστεί η σωστή ενσωμάτωση όλων των β-τύπου υπομονάδων. Μετά το διμερισμό των δύο ημιπρωτεασωμάτων το προκύπτον νεοσχηματισμένο πρωτεάσωμα αναδιαμορφώνεται. Με την απομάκρυνση μιας μικρής αλληλουχίας στο αμινο-τελικό άκρο των β1, β2, β5, β6 και β7 υπομονάδων αποκαλύπτονται τα κατάλοιπα θρεονίνης που φέρουν και το σύμπλοκο αποκτά ενεργότητα πρωτεάσης. Έπειτα, η πρωτεΐνη Ump1 αποικοδομείται από το νεοσχηματισμένο πρωτεάσωμα, ενώ το σύμπλοκο Pba1–Pba2 ανακυκλώνεται ώστε να χρησιμοποιηθεί σε νέο κύκλο συναρμολόγησης πρωτεασώματος. Σε αντίθεση με το σύμπλοκο Pba1–Pba2 στο ζυμομύκητα, το ετεροδιμερές PAC1–PAC2 στους ανθρώπους έχει αποδειχθεί ότι αποικοδομείται μετά την ολοκλήρωση της συναρμολόγησης του καταλυτικού κέντρου του πρωτεασώματος (Betancourt et al., 2023; Budenholzer et al., 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018).

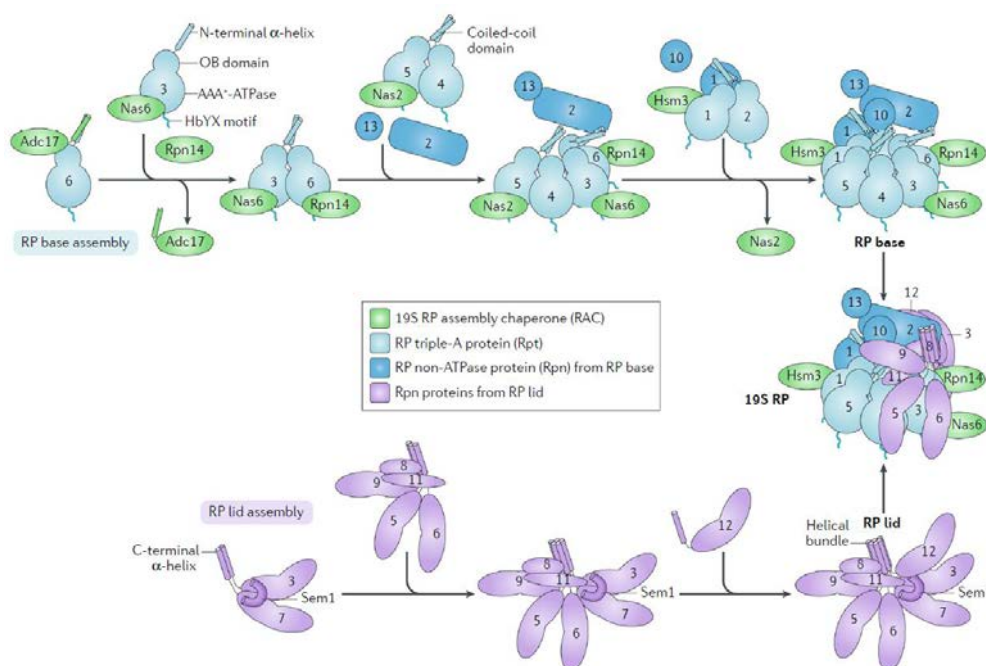
#### 1.2.1.2 19S ρυθμιστική υπομονάδα

Λόγω της μικρής διαμέτρου του πόρου του 20S CP, οι αναδιπλωμένες πρωτεΐνες δεν μπορούν να προσπελάσουν τον πρωτεολυτικό θάλαμο του πρωτεασώματος και επομένως διαφεύγουν της αποικοδόμησης. Έτσι, το πρωτεϊνικό υπόστρωμα πρέπει να αποδιαταχθεί (Saeki, 2017; H. Yu & Matouschek, 2017). Σε αυτό το στάδιο, το 19S RP κατέχει κρίσιμο ρόλο, καθώς είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση, τη δέσμευση, την απο-συμπικτινυλίωση, την αποδιάταξη και τη μετέπειτα μεταφορά του πρωτεϊνικού υποστρώματος στον πυρήνα του 20S CP, αφού προηγουμένως ανοίξει την πύλη του (Livneh et al., 2016; Rousseau & Bertolotti, 2018; H. Yu & Matouschek, 2017).

Το RP αποτελείται από 19 υπομονάδες και μπορεί να διαιρεθεί βιοχημικά στη βάση (base) και στο κάλυμμα (lid) (Bard et al., 2018; Saeki, 2017). Η βάση αποτελείται από 10 υπομονάδες: έξι υπομονάδες με δράση ATPάσης τύπου AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) διατεταγμένες σε ένα ετεροεξαμερικό δακτύλιο και τέσσερις υπομονάδες με δράση μη-ATPάσης. Οι υπομονάδες με δράση ATPάσης τύπου AAA+ είναι γνωστές ως Regulatory particle triple A protein 1 (Rpt1)- Rpt6 (G. A. Collins & Goldberg, 2017; Gu & Enenkel, 2014), ενώ εκείνες με δράση μη-ATPάσης υπομονάδες ονομάζονται Regulatory particle non-ATPase 1 (Rpn1), Rpn2, Rpn10 και Rpn13. Το κάλυμμα σχηματίζεται από εννέα υπομονάδες με δράση μη-ATPάσης: Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 και Sem1 και λειτουργεί ως γέφυρα που συνδέει το 20S καταλυτικό κέντρο με το 19S RP. Οι υπομονάδες Rpn3, Rpn7, Rpn8 και Rpn11 (από το κάλυμμα) και οι υπομονάδες Rpt3-Rpt6 και Rpn2 (από τη βάση) διευκολύνουν αυτή τη λειτουργία (Rousseau & Bertolotti, 2018). Οι υπομονάδες Rpn1, Rpn10 και Rpn13 λειτουργούν ως υποδοχείς συμπικτινής αναγνωρίζοντας το πρωτεϊνικό υπόστρωμα που έχει σημανθεί με αυτήν (G. A. Collins & Goldberg, 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018; Saeki, 2017; H. Yu & Matouschek, 2017). Η υπομονάδα Rpn11 είναι μια DUB που αποκόπτει τις αλυσίδες συμπικτινής από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα πριν από την αποικοδόμησή του από το 20S καταλυτικό κέντρο, απελευθερώνοντας μόρια συμπικτινής για επαναχρησιμοποίηση (G. A. Collins & Goldberg, 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018). Τέλος, ο δακτύλιος που σχηματίζεται από τις υπομονάδες με δράση ATPάσης τύπου AAA+ μαζί με τις υπομονάδες Rpn1, Rpn2 και Rpn13 (από τη βάση) προσκολλάται στον α-τύπου δακτύλιο του CP και είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της πρωτεασωμικής «πύλης» και τη μεταφορά του υποστρώματος στο 20S CP (Gu & Enenkel, 2014).

Η συναρμολόγηση του RP είναι μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων, όπου η βάση και το κάλυμμα μπορούν να συναρμολογηθούν ανεξάρτητα. Σε αντίθεση με το κάλυμμα, το οποίο είτε αυτοσυναρμολογείται είτε υποβοηθάται από παράγοντες συναρμολόγησης οι οποίοι δεν έχουν ακόμη βρεθεί, η συναρμολόγηση της βάσης πραγματοποιείται από πέντε πρωτεΐνες συνοδούς συναρμολόγησης του RP (RP assembly chaperons, RACs): Nas2 (p27 στον άνθρωπο), Nas6 (p28 στον άνθρωπο), DNA mismatch repair protein Hsm3 (S5b στον άνθρωπο), Rpn14 (Proteasomal ATPase associated factor 1, PAAF1 στον άνθρωπο) και ATPase dedicated chaperone of 17 kDa (Adc17 ή TMA17). Μέχρι σήμερα, δύο μοντέλα έχουν προταθεί για τη συναρμολόγηση

του RP. Σύμφωνα με το πρώτο, η συναρμολόγηση του RP είναι ανεξάρτητη από το CP, ενώ σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο το CP χρησιμοποιείται ως πλατφόρμα για τη συναρμολόγηση της βάσης του RP.



**Εικόνα 1.13:** Το μοντέλο συναρμολόγησης της 19S ρυθμιστικής υπομονάδας του πρωτεασώματος (Rousseau & Bertolotti, 2018).

**Συναρμολόγηση της βάσης του RP.** Ο εξαμελής δακτύλιος ATPάσης του RP έχει τη διάταξη Rpt1–Rpt2–Rpt6–Rpt3–Rpt4–Rpt5 και βασίζεται πάνω στη συναρμολόγηση τριών τμημάτων, κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από δύο ζευγάρια υπομονάδων με δράση AAA+ ATPάσης που συνδέονται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες RACs, αποτρέποντας έτσι την πρόωρη σύνδεση των ενδιάμεσων RP με το 20S πρωτεάσωμα. Οι πρωτεΐνες Rpn14, Nas6, Nas2 και Hsm3 συνδέονται με τα καρβοξυ-τελικά άκρα των αντίστοιχων Rpt υπομονάδων, σχηματίζοντας τρία σύμπλοκα: Rpn14–Rpt6–Rpt3–Nas6, Rpt4–Rpt5–Nas2 και Hsm3–Rpt1–Rpt2–Rpn1. Τα δύο πρώτα σύμπλοκα συνδέονται μεταξύ τους πριν από την ενσωμάτωση του τρίτου συμπλόκου Hsm3–Rpt1–Rpt2–Rpn1, μαζί με τις Rpn2 και Rpn13 υπομονάδες. Στη συνέχεια, η Rpn10 προσλαμβάνεται για να ολοκληρωθεί η συναρμολόγηση της βάσης του RP. Η ενσωμάτωση του συμπλέγματος Hsm3–Rpt1–Rpt2–Rpn1 ενεργοποιεί την απελευθέρωση της πρωτεΐνης Nas2 από τη βάση, ενώ οι Rpn14, Nas6 και Hsm3 απομακρύνονται κατά τη σύνδεση του RP με το 20S CP. Στο ζυμομύκητα, υπάρχει μια επιπλέον πρωτεΐνη RAC, η Adc17, όπου συνδέεται με την αμινο-τελική περιοχή της Rpt6 προωθώντας τη σύζευξη της Rpt6 με την Rpt3 υπομονάδα (Budenholzer et al., 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018).

**Συναρμολόγηση του καλύμματος του RP.** Ο σχηματισμός του καλύμματος ξεκινά με τη δημιουργία δύο ενδιάμεσων συμπλόκων: το ένα περιλαμβάνει τις Rpn5–6, Rpn8–9 και Rpn11 υπομονάδες, ενώ το άλλο αποτελείται από τις Rpn3, Rpn7 και Sem1 υπομονάδες. Τα ενδιάμεσα σύμπλοκα αυτοσυναρμολογούνται μέσω μιας ελικοειδούς

δέσμης που σχηματίζεται από τις ελικοειδείς περιοχές των καρβοξυ-τελικών άκρων των υπομονάδων του καλύμματος. Μετά τη σύνδεση αυτών των δύο ενδιάμεσων συμπλόκων, η τελευταία υπομονάδα του καλύμματος, η Rpn12, ενσωματώνεται προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση του καλύμματος, το οποίο καθίσταται πλέον έτοιμο να συνδεθεί με τη βάση (Budenhöfner et al., 2017; Gu & Enenkel, 2014; Rousseau & Bertolotti, 2018).

Η σύνδεση του RP με το CP διαμεσολαβείται από την εισαγωγή των καρβοξυ-τελικών HbYX μοτίβων (hydrophobic-tyrosine-X, Hb: υδρόφοβο, Y: τυροσίνη ή φαινυλαλανίνη, X: οποιοδήποτε αμινοξύ) των Rpt υπομονάδων (Rpt2, Rpt3, Rpt5) στις «θήκες» που σχηματίζονται από δύο γειτονικές α-τύπου υπομονάδες. Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του CP μετατοπίζοντας τα αμινοτελικά άκρα των α-τύπου υπομονάδων από το κέντρο του CP με σκοπό το άνοιγμα της πύλης του καταλυτικού κέντρου του πρωτεασώματος όταν δεσμεύεται σε αυτό το υπόστρωμα (G. A. Collins & Goldberg, 2017; Rousseau & Bertolotti, 2018).

### 1.2.2 Ενναλακτικές μορφές πρωτεασώματος

Τα ανοσοπρωτεασώματα είναι ιστο-ειδικές εκδοχές των πρωτεασωμάτων. Αρχικά θεωρούνταν πως εκφράζονται συνεχώς στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ωστόσο αργότερα αποκαλύφθηκε ότι εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς ύστερα από την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ιντερφερόνης (interferon, INF)- $\gamma$ , καθώς και του TNF- $\alpha$  (Ebstein et al., 2012). Τα ανοσοπρωτεασώματα σχηματίζονται όταν οι πρωτεολυτικές υπομονάδες  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  και  $\beta 5$  αντικαθίστανται από τις ανοσοϋπομονάδες  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  και  $\beta 5i$ , αντίστοιχα, έπειτα από *de novo* σύνθεση και συναρμολόγηση (Kniepert & Groettrup, 2014). Η υπομονάδα  $\beta 2i$  έχει ενεργότητα θρυψίνης, ενώ και οι δύο υπομονάδες  $\beta 1i$  (σε αντίθεση με την υπομονάδα  $\beta 1$  του 20S πρωτεασώματος) και  $\beta 5i$  του ανοσοπρωτεασώματος διαθέτουν ενεργότητα χυμοθρυψίνης, εξηγώντας έτσι την ενισχυμένη ενεργότητα χυμοθρυψίνης που παρουσιάζουν τα ανοσοπρωτεασώματα (Johnston-Carey et al., 2016). Τα ανοσοπρωτεασώματα παράγουν πεπτίδια που διευκολύνουν την αντιγονοπαρουσίαση από το μόρια τους μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I (Johnston-Carey et al., 2016; Kloetzel, 2004; Kniepert & Groettrup, 2014), ενώ εκτός από την εμπλοκή τους στην ανοσοαπόκριση, τα ανοσοπρωτεασώματα συμμετέχουν στην κυτταρική προσαρμογή σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες μέσω της επιλεκτικής αποικοδόμησης οξειδωμένων πρωτεϊνών (Johnston-Carey et al., 2016; Pickering et al., 2010; Pickering & Davies, 2012). Σε υποστήριξη αυτού, ποντίκια που στερούνται μίας ή δύο υπομονάδων του ανοσοπρωτεασώματος είναι πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες (Hussong et al., 2010). Το 11S ρυθμιστικό σύμπλοκο PA28 (επίσης γνωστό και ως REG) είναι ένας άλλος ρυθμιστής του πρωτεασώματος, ο οποίος έχει προταθεί ότι συνδέεται επιλεκτικά με το ανοσοπρωτεάσωμα αυξάνοντας τη δραστηριότητά του (Johnston-Carey et al., 2016; Pickering & Davies, 2012). Τρεις ισομορφές του PA28 έχουν περιγραφεί: το ετεροεπταμερές PA28 $\alpha$  και PA28 $\beta$  και το ομοεπταμερές PA28 $\gamma$  (Stadtmueller & Hill, 2011). Έχει προταθεί ότι το 11S ρυθμιστικό σύμπλοκο ενισχύει την επιλεκτικότητα των ανοσοπρωτεασωμάτων για οξειδωμένες πρωτεΐνες,

διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο σε καταστάσεις εκτεταμένου οξειδωτικού στρες, όπως η γήρανση ή ορισμένες ηλικιο-ερξαρτώμενες ασθένειες (Pickering et al., 2010, 2012).

Το θυμοπρωτεάσωμα (thymoproteasome) είναι μια άλλη εναλλακτική μορφή πρωτεασώματος που συναντάται αποκλειστικά στα κύτταρα του φλοιού του θύμου αδένου. Τα θυμοπρωτεασώματα απαρτίζονται από τις ανοσοϋπομονάδες  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  και από την  $\beta 5t$  (t από το thymus). Αντίθετα από την  $\beta 5i$  υπομονάδα του ανοσοπρωτεασώματος, η  $\beta 5t$  υπομονάδα έχει διαφορετική προτίμηση διάσπασης επιτρέποντας τη διάσπαση του πεπτιδικού σκελετού μετά από υδρόφιλα κατάλοιπα, εμφανίζοντας μειωμένη ενεργότητα χυμοθρυψίνης και αφήνοντας ανεπηρέαστες τις άλλες δύο πρωτεολυτικές ενεργότητες. Τα θυμοπρωτεασώματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θετική επιλογή των CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Budenholzer et al., 2017; Murata et al., 2008).

Τέλος, δύο ακόμη μορφές πρωτεασωμάτων έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία: το σπερματοπρωτεάσωμα που συναντάται στα θηλαστικά, όπου αντί για την  $\alpha 4$  υπομονάδα του καταλυτικού κέντρου του 20S πρωτεασώματος περιλαμβάνεται η εναλλακτική υπομονάδα  $\alpha 4s$ . Η υπομονάδα  $\alpha 4s$  συντίθεται αποκλειστικά στα γαμετικά κύτταρα των αρσενικών ατόμων μετά τη διαφοροποίησή τους σε σπερματοκύτταρα (Qian et al., 2013; Uechi et al., 2014), ενώ η ύπαρξή της φαίνεται να μην επηρεάζει τις τρεις πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεασώματος (Uechi et al., 2014). Μία ακόμη μορφή πρωτεασώματος έχει βρεθεί στο αναπαραγωγικό σύστημα της *Drosophila* (testis-specific proteasome), υψίστης σημασίας για τη γονιμότητα της μύγας, όπου τη θέση της  $\alpha 6$  υπομονάδας έχει πάρει η υπομονάδα Prosalph $\alpha 6T$  ( $\alpha 6T$ ) (Belote et al., 1998; Budenholzer et al., 2017; Zhong & Belote, 2007).

### 1.2.3 Ρύθμιση της πρωτεασωμικής έκφρασης

Η έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος καθώς και των συνοδών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη συναρμολόγησή του ρυθμίζεται μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης.

Το πιο καλά χαρακτηρισμένο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό που αφορά την πρωτεΐνη Rpn4 στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ο μεταγραφικός παράγοντας Rpn4 προσδένεται στην αλληλουχία 5'-GGTGGCAA-3', γνωστή ως proteasome-associated control element (PACE) (Belote et al., 1998; Rousseau & Bertolotti, 2018). Η αλληλουχία PACE (ή μικρές παραλλαγές της) βρίσκεται στους υποκινητές των περισσότερων γονιδίων υπεύθυνων για τη μεταγραφή υπομονάδων του πρωτεασώματος. Το πρωτεάσωμα διασπά το Rpn4, το οποίο έχει χρόνο ημιζωής περίπου δύο λεπτά. Έτσι, τα επίπεδα του Rpn4 στα κύτταρα σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος. Όταν η δραστηριότητα του πρωτεασώματος είναι μειωμένη, όπως κατά τη διάρκεια πρωτεοτοξικού στρες, το Rpn4 συσσωρεύεται στο κύτταρο οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων που σχετίζονται με το πρωτεάσωμα και επακόλουθα στη δημιουργία περισσότερων πρωτεασωμάτων. Ύστερα από την αποκατάσταση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας

του πρωτεασώματος παρατηρείται ενισχυμένη διάσπαση του Rpn4, επαναφέροντας τη μεταγραφή των γονιδίων του πρωτεασώματος σε βασικά επίπεδα (Mannhaupt et al., 1999; Xie & Varshavsky, 2001). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο υποκινητής του γονιδίου *RPN4* ρυθμίζεται και από ποικίλους μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με στρες, όπως Yap1, Rdrs, Hsf1 κ.α (Bard et al., 2018; Budenholzer et al., 2017; Livneh et al., 2016; M. Ma & Liu, 2010).

Η σηματοδοτική οδός TORC1 ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης των συνοδών πρωτεϊνών συναρμολόγησης του RP τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ζυμομύκητα. Η πρωτεΐνη mitogen-activated protein kinase 1, Mpk1, η οποία βρίσκεται κατώτερα (downstream) σε ένα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TORC1, επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών RACs υπό συγκεκριμένες συνθήκες στρες. Κατά τη διάρκεια στρες, η TORC1 αναστέλλεται, επιτρέποντας την ενεργοποίηση της Mpk1 και αυξάνοντας επακόλουθα την έκφραση των RACs. Ο ακριβής μηχανισμός που συμβαίνει αυτό δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Budenholzer et al., 2017; Rousseau & Bertolotti, 2016).

Στον άνθρωπο, οι μεταγραφικοί παράγοντες nuclear factor erythroid 2-related factor 1 (Nrf1) και nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων του πρωτεασώματος (Kapeta et al., 2010; Korovila et al., 2017; Kwak et al., 2003; Lefaki et al., 2017; Pajares et al., 2017; Radhakrishnan et al., 2010; Sha & Goldberg, 2014; Sykiotis & Bohmann, 2010). Και οι δύο μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ανήκουν στην υποοικογένεια cap 'n' collar (CNC) των μεταγραφικών παραγόντων leucine zipper (bZip) (Budenholzer et al., 2017; Q. Ma, 2013; Rousseau & Bertolotti, 2018), όπου συνδέονται με τις αλληλουχίες antioxidant response elements (AREs) που εντοπίζονται σε υποκινητές διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική απόκριση. Αλληλουχίες AREs βρίσκονται και στους υποκινητές όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεασωμικές υπομονάδες (Kapetanou et al., 2022). Ειδικότερα, ο Nrf1 ρυθμίζει την έκφραση των βασικών επιπέδων των υπομονάδων του πρωτεασώματος και αυξάνει την έκφραση των γονιδίων του πρωτεασώματος σε απόκριση βραχυπρόθεσμης και ήπιας αναστολής του πρωτεασώματος (Radhakrishnan et al., 2010; Sha & Goldberg, 2014). Αντίθετα, ο Nrf2 επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων του πρωτεασώματος σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Όπως και ο Rpn4, τόσο ο Nrf1 όσο και ο Nrf2 αποικοδομούνται γρήγορα από το πρωτεάσωμα, με χρόνο ημιζωής 12–13 λεπτά. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf1 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα για να αποικοδομηθεί από το 26S πρωτεάσωμα. Όταν η πρωτεασωμική λειτουργία διακυβεύεται, ο Nrf1 διαφεύγει της αποικοδόμησης, μετατοπίζεται στον πυρήνα και οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεασωμικές υπομονάδες (Koizumi et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2010; Sha & Goldberg, 2014). Αντίστοιχα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα μέσω σύνδεσης με τον αναστολέα του Nrf2 (inhibitor of Nrf2, INrf2) ή αλλιώς Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (Niture et al., 2014; J. Zhang et al., 2016; Y. Zhang et al., 2011). Το σύμπλεγμα Keap1/Nrf2 συνδέεται με το ολοένζυμο Cullin3/Ring box-1 (Rbx1) το οποίο ουμπικιτινυλιώνει τον Nrf2 που οδηγείται σε αποικοδόμηση μέσω του

26S πρωτεασώματος (Korovila et al., 2017; Q. Ma, 2013; Niture et al., 2014; J. Zhang et al., 2016). Σε περίπτωση οξειδωτικού στρες, ο Keap1 οξειδώνεται χάνοντας την ικανότητά του να δεσμεύει τον Nrf2, ο οποίος απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (Korovila et al., 2017; J. Zhang et al., 2016). Διάφορες κινάσες (όπως PKC, MAPKs ή PI3K) φωσφορυλιώνουν τον Nrf2, ο οποίος στη συνέχεια μεταφέρεται στον πυρήνα (Korovila et al., 2017; J. Zhang et al., 2016; Y. Zhang et al., 2011). Εκεί, ο Nrf2 σχηματίζει ετεροδιμερή με πρωτεΐνες Maf (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) ή c-Jun επιτρέποντας τη σύνδεση με τις αλληλουχίες ARE που βρίσκονται στις περιοχές υποκινητών πάνω από 200 γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική απόκριση (Q. Ma, 2013; Niture et al., 2014). Τέτοια γονίδια περιλαμβάνουν τα NQO-1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase-1], HO-1 (Heme oxygenase-1), GSTs (Glutathione S-transferases), γ-GCS (γ-Glutamylcysteine synthetase) και αρκετές υπομονάδες του πρωτεασώματος (Korovila et al., 2017; Lefaki et al., 2017; Niture et al., 2014), μεταξύ άλλων. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf3, ο οποίος παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον Nrf1. Παρόμοια με τους άλλους δύο μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας CnC-bZip, ο Nrf3, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα, ενώ η ενεργοποίησή του προάγει τη μεταγραφή πολλών πρωτεασωματικών γονιδίων. Ωστόσο, ο ρόλος του δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί (Kapetanou et al., 2022; Motosugi & Murata, 2019).

Τέλος, οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO ανήκουν στην ευρεία οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Forkhead που χαρακτηρίζεται από μια διατηρημένη περιοχή σύνδεσης με το DNA, γνωστή ως «forkhead box». Οι παράγοντες FoxO βρίσκονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στη διάρκεια ζωής τους μέσω του IIS μονοπατιού (Kapetanou et al., 2022). Οι φωσφορυλιωμένες μορφές των FoxO παραμένουν ανενεργές στο κυτταρόπλασμα, ενώ αποσιώπηση του IIS μονοπατιού οδηγεί στη μετατόπιση των FoxO στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που προάγουν τη μακροχρόνια επιβίωση (Altintas et al., 2016; Hesp et al., 2015). Οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO ελέγχουν την έκφραση διαφόρων συστατικών του UPS (S. Li et al., 2004; Matilainen et al., 2013; Motosugi & Murata, 2019; Webb & Brunet, 2014), ενώ πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας FoxO1 ρυθμίζει άμεσα την έκφραση της β5 καταλυτικής υπομονάδας του 20S πρωτεασώματος και συνεπώς την πρωτεασωματική ενεργότητα (Kapetanou et al., 2021).

#### **1.2.4 Πρωτεάσωμα και γήρανση**

Η ακεραιότητα του πρωτεώματος των οργανισμών διαταράσσεται κατά την γήρανση (Vilchez et al., 2014). Η ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση της λειτουργικότητας των πρωτεοστατικών μηχανισμών του κυττάρου, ένα από τα ορόσημα της γήρανσης (López-Otín et al., 2013, 2023), δυσχεραίνει την ικανότητα των κυττάρων να ανταποκριθούν επιτυχώς στην ολοένα και αυξανόμενη ανάγκη διατήρησης ενός λειτουργικού και ακέραίου πρωτεώματος (Hipp et al., 2019; Vilchez et al., 2014). Ως ένας από τους κύριους πρωτεοστατικούς μηχανισμούς που εποπτεύουν την ποιότητα και την ακεραιότητα των πρωτεϊνών, το πρωτεάσωμα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο

σε αυτή τη διαδικασία. Πράγματι, είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι τόσο η λειτουργία όσο και η ποσότητα του πρωτεασώματος μειώνονται με τη γήρανση (Carrard et al., 2002; Chondrogianni et al., 2020; Kevei & Hoppe, 2014; M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022). Ως εκ τούτου, η συσσώρευση κατεστραμμένων και μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, καθώς και η διαφυγή τους από την πρωτεασωμική αποικοδόμηση, συμβάλλει στην εμφάνιση και την πρόοδο της γήρανσης, καθώς και των ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών (Chondrogianni et al., 2014; Hipp et al., 2019; Papaevgeniou & Chondrogianni, 2016; M. Vasilopoulou et al., 2021).

Έχει αποδειχθεί ότι το πρωτεάσωμα παρουσιάζει βλάβες σε διάφορα επίπεδα κατά τη διάρκεια της γήρανσης: υπορρύθμιση της έκφρασης και/ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεασωμικών υπομονάδων, αποσυναρμολόγηση του πρωτεασώματος, συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που «φράζουν» το πρωτεάσωμα έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των πρωτεολυτικών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος (Carrard et al., 2002; Chondrogianni et al., 2014; Vilchez et al., 2014). Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της ηλικίας και της μείωσης της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε διάφορους ιστούς θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, των σκελετικών μυών, της επιδερμίδας, του λιπώδους ιστού, του αμφιβληστροειδούς, των πνευμόνων, της καρδιάς, του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, του υποκάμπου και του εγκεφαλικού φλοιού (Baraibar & Friguet, 2012; Carrard et al., 2002; Dasuri et al., 2009; Jung et al., 2007; Papaevgeniou & Chondrogianni, 2016; Vilchez et al., 2014), ενώ για άλλους, όπως το ήπαρ, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αμφιλεγόμενα (Bellavista et al., 2014; Carrard et al., 2002; Papaevgeniou & Chondrogianni, 2016). Επιπροσθέτως, μερική αναστολή του πρωτεασώματος σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες προκάλεσε την εμφάνιση ενός μη αναστρέψιμου, πρόωρου φαινοτύπου γήρανσης (Chondrogianni et al., 2003), υποστηρίζοντας περαιτέρω τον καταλυτικό ρόλο του πρωτεασώματος στη γήρανση.

Η ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση της λειτουργικότητας του πρωτεασώματος επιβεβαιώνεται και σε μελέτες με τη χρήση *in vivo* μοντέλων. Η απουσία της πρωτεΐνης UMP1 οδήγησε σε δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών και μείωση της επιβίωσης των κυττάρων στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* (Q. Chen et al., 2005). Αντίθετα, η υπερέκφραση της UMP1 αύξησε τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος και επιμήκυνε τη διάρκεια ζωής του ζυμομύκητα (Q. Chen et al., 2006). Διαταραχή στη συναρμολόγηση του 26S πρωτεασώματος παρατηρείται σε ενήλικες και γηραιούς εγκεφάλους του ψαριού killifish *Nothobranchius furzeri* (Kelmer Sacramento et al., 2020), όπως και σε γηραιότερα άτομα *D. melanogaster* (Brown et al., 2018; Vernace et al., 2007). Ακόμη, μειωμένη πρωτεασωμική ενεργότητα καταγράφηκε στους σωματικούς ιστούς της μύγας, ενώ διατήρηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας του πρωτεασώματος παρατηρήθηκε στις γονάδες: πιθανά ως έναν μηχανισμό διασφάλισης επιτυχούς αναπαραγωγής και διατήρησης της ακεραιότητας του γονιδιώματος μεταξύ των γενεών (Tsakiri et al., 2013). Αντίθετα, η υπερέκφραση της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος σε ενήλικες

μύγες αύξησε τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος, μείωσε τα επίπεδα των ουμπικιτινυλιωμένων πρωτεϊνών και παράλληλα αύξησε τη διάρκεια ζωής τους (Nguyen et al., 2019). Ομοίως, η υπερέκφραση των υπομονάδων *rpn-6* ή *pbs-5* (ομόλογη της β5) του πρωτεασώματος στον *C. elegans* οδήγησε σε επιμήκυνση της διάρκειας ζωής και βελτίωση της συνολικής υγείας των σκωλήκων, ενώ αποσιώπηση των παραπάνω υπομονάδων επιτάχυνε τη γήρανση των ζώων (Chondrogianni, Georgila, et al., 2015; Vilchez et al., 2012). Επίσης, η δημιουργία ενός διαγονιδικακού ποντικού με μειωμένη τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος είχε αρνητική επίδραση στη διάρκεια ζωής του (Tomaru et al., 2012). Αντιθέτως, ο μακρόβιος αρουραίος *Heterocephalus glaber* εμφανίζει υψηλότερες CT-L και T-L πρωτεασωματικές ενεργότητες σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες, γεγονός που πιθανόν να συνδράμει στην παρατεταμένη διάρκεια ζωής των οργανισμών αυτών (Rodriguez et al., 2012). Παρομοίως, καλλιέργειες ινοβλαστών από υγιείς αιωνόβιους αποκαλύπτουν ότι τόσο η λειτουργία όσο και η ενεργότητα του πρωτεασώματος παραμένουν αμετάβλητες σε σύγκριση με τα πρωτεασώματα από καλλιέργειες ινοβλαστών γηραιών (αλλά όχι αιωνόβιων) δοτών (Chondrogianni et al., 2000), υπογραμμίζοντας ότι η «επιτυχής» γήρανση φαίνεται να σχετίζεται με την ύπαρξη λειτουργικών πρωτεασωμάτων (M. Vasilopoulou et al., 2021).

### 1.2.5 Πρωτεάσωμα και ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες

Το πρωτεάσωμα έχει επίσης καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξη διαφόρων νόσων που σχετίζονται με τη γήρανση (Kandel et al., 2024; Q. Zheng et al., 2016), ιδιαίτερα των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση πρωτεϊνών που έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα, όπως το Αβ πεπτίδιο και η πρωτεΐνη tau στην AD, η α-συνουκλεΐνη στην PD, η μεταλλαγμένη χαντικτίνη λόγω της παρουσίας μιας μεγάλης πολυγλουταμινικής (polyQ) αλληλουχίας στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης στην HD, καθώς και η TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) και η μεταλλαγμένη SOD1 πρωτεΐνη (mSOD1) στο ALS (Q. Zheng et al., 2016). Πληθώρα μελετών έχουν αναδείξει τη σχέση μεταξύ της δυσλειτουργίας του UPS και των νευροεκφυλιστικών αυτών ασθενειών, όπως περιγράφεται στην ανασκόπηση των (Davidson & Pickering, 2023). Πράγματι, η αδυναμία του πρωτεασώματος να απομακρύνει συσσωματωμένες, μη σωστά αναδιπλωμένες ή κατεστραμμένες πρωτεΐνες οδηγεί στη συσσώρευσή τους στους νευρώνες και τελικά στην πρόοδο και την ταχύτερη εξέλιξη της νόσου (C. Zheng et al., 2014). Η απορρύθμιση του UPS έχει παρατηρηθεί στον εγκέφαλο ασθενών με AD (Keller et al., 2000; Lopez Salon et al., 2000), PD (McNaught et al., 2003), HD (Seo et al., 2004) και ALS (Kabashi et al., 2012). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ενδιάμεσου μεγέθους συσσωματώματα που δημιουργούνται από το Αβ πεπτίδιο, την α-συνουκλεΐνη και τη μεταλλαγμένη χαντικτίνη συνδέονται άμεσα με το 26S πρωτεάσωμα και αλληλοεπιδρούν αλλοστερικά με αυτό διατηρώντας το στην κλειστή του μορφή και άρα ανενεργό. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μεγάλα συσσωματώματα και μικρά ολιγομερή των πρωτεϊνών αυτών δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος *in vitro* (Thibaut et al., 2018), ενώ οι Suzuki και συνεργάτες έρχονται να υποστηρίξουν περαιτέρω τη σημασία του είδους των

συσσωματωμάτων με την παρατήρηση ότι δύο διαφορετικές δομές ινιδίων ασυνουκλεΐνης που δημιουργήθηκαν με διαφορετική επεξεργασία από τα ίδια μονομερή έχουν διαφορετική επίδραση στη λειτουργικότητα του πρωτεασώματος (Suzuki et al., 2020). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ένα φαύλο κύκλο όπου η μειωμένη ποσότητα και λειτουργία του πρωτεασώματος που παρατηρείται κατά τη γήρανση τροφοδοτεί τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών, ενώ η συσσώρευση αυτή δρα ανασταλτικά επάνω στις πρωτεολυτικές ενεργότητες και διαταράσσει ακόμη περισσότερο την ήδη μειωμένη δραστηριότητα του πρωτεασώματος (Davidson & Pickering, 2023; M. Vasilopoulou et al., 2021; M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022).

Ειδικότερα για την AD, η πρώτη ένδειξη ότι το UPS συνδέεται με τη νόσο ήταν η ανίχνευση της ουμπικιτίνης στις αμυλοειδικές πλάκες (Perry et al., 1987), ενώ μετέπειτα η ουμπικιτίνη βρέθηκε να συσσωρεύεται και σε NFTs σε ασθενείς που έπασχαν από AD (Cripps et al., 2006; Gentier & van Leeuwen, 2015; Oddo, 2008). Επιπροσθέτως, μια μεταλλαγμένη μορφή της ουμπικιτίνης (που δεν διαθέτει το κατάλοιπο γλυκίνης 76), UBB+1, βρέθηκε επίσης αυξημένη τόσο στις αμυλοειδικές πλάκες όσο και στα NFTs (Lindsten et al., 2002; van Leeuwen et al., 2006). Η UBB+1 εκφράζεται στους νευρώνες δεσμεύοντας τις πρωτεΐνες-στόχους του πρωτεασώματος, ανταγωνιζόμενη την κανονική ουμπικιτίνη (De Vrij et al., 2001). Με αυτόν τον τρόπο, η εξαρτώμενη από την ουμπικιτίνη πρωτεόλυση στα νευρικά κύτταρα αναστέλλεται, οδηγώντας σε συσσώρευση εσφαλμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και επακόλουθα σε περαιτέρω νευροτοξικότητα (Lindsten et al., 2002).

Τα πεπτίδια Αβ<sub>1-40</sub> και Αβ<sub>1-42</sub> βρέθηκε ότι αλληλοεπιδρούν άμεσα με το 20S πρωτεάσωμα αναστέλλοντας τη δραστηριότητά του (Oddo, 2008). Μειωμένη δραστηριότητα του πρωτεασώματος βρέθηκε επίσης στον εγκέφαλο ασθενών με AD (Chocron et al., 2022; Keller et al., 2000; Lopez Salon et al., 2000), καθώς και σε ζωικά μοντέλα για την AD (Almeida et al., 2006; Chocron et al., 2022; Necchi et al., 2011), ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι η μειωμένη δραστηριότητα του πρωτεασώματος δε συνοδεύεται από μείωση της πρωτεασωματικής έκφρασης (Almeida et al., 2006; Keller et al., 2000). Ακόμη, η αλληλεπίδραση μεταξύ του UPS και της πρωτεΐνης tau αποκαλύφθηκε όταν αναστολή του πρωτεασώματος σε κύτταρα οδήγησε σε παρεμπόδιση της πρωτεασωματικής διάσπασης της tau (Tseng et al., 2008). Σε υποστήριξη αυτού, οι Myeku και συνεργάτες παρουσίασαν τη θετική συσχέτιση μεταξύ της συσσωρευμένης πρωτεΐνης tau και της προοδευτικής μείωσης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος στον εγκέφαλο διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν tau (Myeku et al., 2016). Τέλος, έχει παρατηρηθεί δυσλειτουργία του ενζύμου αποουμπικιτινυλίσωσης ULCH1 στην AD. Αντίθετα, η υπερέκφρασή του μείωσε την παραγωγή Αβ πεπτιδίου και κατ' επέκταση το σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών και συνάμα βελτίωσε την απώλεια μνήμης διαγονιδιακών ποντικών-μοντέλων για την AD (M. Zhang et al., 2014).

### 1.3 Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος

Η κατάρρευση της πρωτεόστασης αποτελεί χαρακτηριστικό της γήρανσης, καθώς και των ασθενειών όπου η εμφάνισή τους σχετίζεται με αυτήν. Ως εκ τούτου, παρεμβάσεις που στοχεύουν στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος φαίνεται να δρουν ευεργετικά αποτρέποντας τη διατάραξη της πρωτεόστασης και βελτιώνοντας φαινοτύπους που σχετίζονται τόσο με τη γήρανση όσο και με ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες. Η ενίσχυση της πρωτεασωμικής λειτουργίας έχει επιτευχθεί με ποικίλους τρόπους σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα. Ειδικότερα, γενετικές παρεμβάσεις είτε μέσω υπερέκφρασης υπομονάδων του πρωτεασώματος είτε μέσω επαγωγής μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, καθώς και ενώσεις που επιδρούν απευθείας στη διαμόρφωση του πρωτεασώματος έχουν αποκτήσει ολοένα και μεγαλύτερη σημασία στην έρευνα για τη γήρανση. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεασωμική ενεργοποίηση μπορεί να επιτευχθεί και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ιδιαίτερα της φωσφορυλίωσης, η οποία επηρεάζει την ικανότητα του 26S πρωτεασώματος να διασπά πρωτεΐνες. Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεασωμικών υπομονάδων, όπως της Rpn6 μέσω των protein kinase A (PKA) και protein kinase G (PKG), ενισχύει τη λειτουργία του δρώντας ευεργετικά σε παθολογίες όπως η AD (Chondrogianni et al., 2020; Njomen & Tepe, 2019; Türker et al., 2021).

**Ενεργοποίηση μέσω υπερέκφρασης πρωτεασωμικών υπομονάδων.** Οι Gaczynska και συνεργάτες ήταν οι πρωτοπόροι στη μελέτη της γενετικής επαγωγής του πρωτεασώματος, δείχνοντας ότι υπερέκφραση της β5i καταλυτικής υπομονάδας του ανοσοπορωτεασώματος σε λεμφοβλάστες και κύτταρα HeLa οδηγεί σε αυξημένη CT-L και T-L ενεργότητα, ενώ η υπερέκφραση της β1i καταλυτικής υπομονάδας ενισχύει μόνο την T-L ενεργότητα (Gaczynska et al., 1994, 1996). Σε υποστήριξη αυτού, υπερέκφραση της β5 καταλυτικής υπομονάδας του πρωτεασώματος σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ινοβλαστών συμπαρασύρει την έκφραση αρκετών υπομονάδων του πρωτεασώματος ενισχύοντας τόσο τη συναρμολόγηση όσο και την ενεργότητα και των τριών πρωτεολυτικών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος. Παράλληλα, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες και καθυστερεί τη γήρανση των ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών (Chondrogianni et al., 2005). Ομοίως, η υπερέκφραση της υπομονάδας β5 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα φακού (lens) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση υπομονάδων του πρωτεασώματος και ενισχυμένη δραστηριότητά του, καλύτερη απομάκρυνση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών και προστασία από το οξειδωτικό στρες (Y. Liu et al., 2007). Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω υπερέκφρασης της β5 υπομονάδας μείωσε την ηλικιο-εξαρτώμενη απώλεια της λειτουργικότητάς του αυξάνοντας την αναδιπλασιαστική διάρκεια ζωής των κυττάρων και συνάμα βελτιώνοντας την έκφραση των βασικών παραγόντων πολυδυναμίας ενισχύοντας την ικανότητα διαφοροποίησης τόσο των νεαρών όσο και των γερασμένων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (Chondrogianni et al., 2020; Kapetanou et al., 2017). Επιπλέον, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης συνοδού που εμπλέκεται στη

συναρμολόγηση του πρωτεασώματος, POMP, αυξάνει τη λειτουργία του πρωτεασώματος και παρέχει αντίσταση στο οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Chondrogianni & Gonos, 2007).

Σε *in vivo* μοντέλα, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω υπερέκφρασης της *pbs-5* υπομονάδας στο *C. elegans* επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής του οργανισμού. Επίσης, η υπερέκφραση αυτή επιβραδύνει την παράλυση σε ένα διαγονιδιακό στέλεχος-μοντέλο του *C. elegans* για την AD που εκφράζει το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίο, μειώνοντας τόσο τα συνολικά όσο και τα oligομερή επίπεδα του Αβ πεπτιδίου στο νηματώδη σκώληκα (Chondrogianni, Georgila, et al., 2015). Αυξημένη αποικοδόμηση της APP πρόδρομης πρωτεΐνης του β αμυλοειδούς παρατηρήθηκε και έπειτα από την υπερέκφραση της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος σε ανθρώπινα SK-N-SH κύτταρα νευροβλαστώματος, στη *D. melanogaster* και σε ποντικούς μοντέλα για την AD που υπερεκφράζουν APP (Chocron et al., 2022). Πρόσφατα, ερευνητές αποκάλυψαν ότι η υπερέκφραση της β5 υπομονάδας μόνο σε ενήλικες μύγες *D. melanogaster* αυξάνει τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος, βελτιώνει την απομάκρυνση των ουμικιτινυλιωμένων ή συσσωρευμένων πρωτεϊνών οδηγώντας σε μακροζωία (Nguyen et al., 2019). Επιπρόσθετα, η έκφραση της υπομονάδας Rpn11 σε μύγες αναστέλλει την ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος και παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους, μειώνοντας παράλληλα το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από τη συσσώρευση της polyQ πρωτεΐνης (Tonoki et al., 2009). Η υπερέκφραση της υπομονάδας Rpn6 του 19S RP στο *C. elegans* (Vilchez et al., 2012) ή στη *D. melanogaster* (Tain et al., 2017) αρκεί για να ενισχύσει τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος και να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής αυτών των οργανισμών-μοντέλων. Η υπερέκφραση της UCHL1 μειώνει την παραγωγή Αβ πεπτιδίου, μειώνει το σχηματισμό αμυλοειδικών πλακών και βελτιώνει την απώλεια μνήμης σε διαγονιδιακά ποντίκια μοντέλα της AD (M. Zhang et al., 2014), υποστηρίζοντας την προστατευτική δράση της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος κατά της πρωτεοτοξικότητας του Αβ πεπτιδίου.

Τέλος, μια άλλη καινοτόμος προσέγγιση για την ενίσχυση της λειτουργίας του πρωτεασώματος είναι το άνοιγμα της πύλης του καταλυτικού του κέντρου. Η έκφραση τροποποιημένων μορφών της α3 υπομονάδας ( $\alpha$ -3ΔN) που έχει ως αποτέλεσμα τη διαγραφή των αμινο-τελικών τμημάτων της (η διάταξη των οποίων υπό φυσιολογικές συνθήκες εμποδίζει την είσοδο των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στον πυρήνα του 20S πρωτεασώματος) παράγει άθικτα, υπερενεργά πρωτεασώματα, ικανά να διασπούν γρήγορα τα τοξικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα που δημιουργούνται από την ασυνουκλείνη και την πρωτεΐνη tau σε ανθρώπινους ινοβλάστες (W. H. Choi et al., 2016; Chondrogianni et al., 2020). Υπερενεργά πρωτεασώματα που οδηγούν σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής και σε αντοχή στο οξειδωτικό στρες μέσω της έκφρασης τροποποιημένης μορφής της α3 υπομονάδας (οδηγώντας σε πρωτεασώματα με ανοιχτή «πύλη») επιτεύχθηκε και στον πολκύτταρο οργανισμό *C. elegans*. Ωστόσο, η γονιδιακή αυτή παρέμβαση είχε σοβαρές επιπτώσεις στο φαινότυπο των σκωλήκων, όπως μείωση της γονιμότητας και μειωμένη πρόσληψη τροφής (Anderson et al., 2022).

**Ενεργοποίηση μέσω επαγωγής μεταγραφικών παραγόντων.** Η φυσική αντιοξειδωτική ένωση που απομονώθηκε από σταυρανθή λαχανικά 3H-1,2-διθειολ-3-θειόνη (D3T) αυξάνει την έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος και ενισχύει τη δραστηριότητά του μέσω της επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Kwak et al., 2003), ενώ παράλληλα μειώνει τα επίπεδα του Αβ πεπτιδίου σε *in vitro* (L. Wang et al., 2017) και *in vivo* (Cui et al., 2018) μοντέλα για την AD.

Η ρεσβερατρόλη, μια πολυφαινολική ένωση που απαντάται στο φλοιό των σταφυλιών και στο κόκκινο κρασί προάγει την απομάκρυνση του Αβ πεπτιδίου μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος σε *in vitro* (Marambaud et al., 2005) και *in vivo* (Corpas et al., 2019; Regitz et al., 2016) μοντέλα AD και HD (Y. Liu et al., 2014). Η ενεργοποίηση αυτή έχειδειχθεί ότι συμβαίνει λόγω της ικανότητας της ρεσβερατρόλης να επάγει την ενεργοποίηση του Nrf2 (Park et al., 2009; Pickering et al., 2012), μεταξύ άλλων μεταγραφικών παραγόντων.

Η κερσετίνη είναι ένα φλαβονοειδές που συναντάται σε φρούτα και λαχανικά, γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση και την ικανότητά του να ενεργοποιεί τον Nrf2 (Kwak et al., 2003; Tanigawa et al., 2007). Η χορήγηση κερσετίνης αύξησε την CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος και οδήγησε σε επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των πρωτογενών, ανθρώπινων HFL-1 εμβρυϊκών ινοβλαστών. Μάλιστα, η χορήγηση κερσετίνης σε ήδη γηρασμένους ινοβλάστες οδήγησε σε αύξηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας και σε μείωση των επιπέδων των θετικών στη χρώση SA-β-gal κυττάρων (Chondrogianni et al., 2010).

Η χεδεραγενίνη και το 18α-γλυκυρρητινικό οξύ (18α-GA) είναι δύο τριτερπενοειδή που ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα μέσω της ενεργοποίησης του Nrf2 παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής των πρωτογενών ινοβλαστών του ανθρώπου. Επίσης, η χορήγηση 18α-GA σε γηρασμένα κύτταρα ήταν ικανή να αυξήσει την έκφραση πρωτεασωματικών υπομονάδων ενισχύοντας τη CT-L ενεργότητά του, αναδεικνύοντας τη δυνατότητα της ένωσης να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα ακόμη και σε γηρασμένα κύτταρα (Kapeta et al., 2010). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και *in vivo* στο *C. elegans*, όπου η χορήγηση του 18α-GA ενισχύει τη λειτουργία του πρωτεασώματος και παρατείνει τη διάρκεια ζωής των σκωλήκων μέσω της επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα SKN-1 (ομόλογο του Nrf2) (Papaevgeniou et al., 2016). Τόσο η κερσετίνη (Regitz et al., 2014) όσο και το 18α-GA (Papaevgeniou et al., 2016) καθυστερούν την παράλυση που προκαλείται από το Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο και μειώνουν τη συσσώρευσή του σε νηματώδεις σκωλήκες-μοντέλα για την AD. Αντίσταση στην πρωτεοτοξικότητα που προκαλείται από την ύπαρξη του Αβ πεπτιδίου παρατηρείται επίσης σε ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y καθώς και σε πρωτογενή νευρικά κύτταρα ποντικού που τους έχει χορηγηθεί το 18α-GA (Papaevgeniou et al., 2016).

Το εκχύλισμα φύλλων *Ginkgo biloba* (EGb 761) είναι μια ένωση με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η χορήγησή της σε HEK293 κύτταρα αυξάνει τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος και ενισχύει τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *PSMB5*, *PSMB6* και *PSMB7* που κωδικοποιούν τις β5, β1 και β2 υπομονάδες του

πρωτεασώματος, αντίστοιχα (Stark & Behl, 2014), ενώ οι Liu και συνεργάτες έδειξαν ότι το εκχύλισμα *G. biloba* ενεργοποιεί τον Nrf2 προωθώντας τη μεταφορά του στον πυρήνα (X. P. Liu et al., 2007). Η νευροπροστατευτική δράση του EGb 761 περιγράφηκε από τους Strak και Behl, όπου η χορήγησή του σε κύτταρα που εκφράζουν παθολογική μορφή της πρωτεΐνης polyQ, αύξησε την πρωτεασωματική ενεργότητα και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Stark & Behl, 2014). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα θετικά αποτελέσματα του *G. biloba* στο πρωτεάσωμα οφείλονται πιθανά στην ικανότητά του να ενεργοποιεί τον Nrf2.

Η κουρκουμίνη που απαντάται στο φυτό *Curcuma longa* έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα αυξάνοντας τη CT-L ενεργότητά του σε ανθρώπινα επιδερμικά κερατινοκύτταρα (Ali & Rattan, 2006). Μία ακόμη μελέτη ανέδειξε τις ευεργετικές ιδιότητες της κουρκουμίνης *in vivo*, δείχνοντας ότι η χορήγησή της παρατείνει τη διάρκεια ζωής του *C. elegans* μέσω της επαγωγής του SKN-1, μεταξύ άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Liao et al., 2011). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πρόσφατη μελέτη επισημαίνει ότι η χορήγηση της κουρκουμίνης σε συγκεντρώσεις nanomolar είναι ικανή να πυροδοτήσει την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, ενώ αντίθετα συγκεντρώσεις micromolar λειτουργούν καταστέλλοντας τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος (Khan et al., 2022). Επιπλέον, η ανάλογη με την κουρκουμίνη συνθετική ένωση ASC-JM17 προκαλεί την έκφραση των Nrf1 και Nrf2 μεταγραφικών παραγόντων, αυξάνοντας την έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος καθώς και αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι θετικές αυτές επιδράσεις της ASC-JM17 συνοδεύονται από προστασία έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από την ύπαρξη polyQ πρωτεϊνών σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα (Bott et al., 2016).

Τέλος, η τιλιοσίδη (tiliroside), ένα από τα πλουσιότερα σε φλαβονοειδή γλυκοσίδια που συναντώνται στους καρπούς του δέντρου *Platanus orientalis*, αυξάνει τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος και καθυστερεί την αναδιπλασιαστική γήρανση ινοβλαστών του ανθρώπου. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και *in vivo*, όπου η χορήγηση της τιλιοσίδης στη *D. melanogaster* αυξάνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος, η οποία συνοδεύεται και από αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων οδηγώντας σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής και βελτιώνοντας τη συνολική υγεία των μυγών (Chatzigeorgiou et al., 2017). Επίσης, η χορήγηση της τιλιοσίδης προστατεύει έναντι της νευροτοξικότητας και της αυξημένης παραγωγής ROS *in vitro* μέσω της ενεργοποίησης του Nrf2 (Velagarudi et al., 2018), υποστηρίζοντας την άποψη ότι η δράση της τιλιοσίδης βασίζεται στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω του Nrf2.

**Ενεργοποίηση μέσω επίδρασης στη δομή του πρωτεασώματος.** Το 20S καταλυτικό κέντρο του πρωτεασώματος αποτελείται από δύο εξωτερικούς α-τύπου δακτυλίους, οι οποίοι «σφραγίζουν» τον πρωτεολυτικό πυρήνα του μέσω των στενά συνδεδεμένων αμινο-τελικών άκρων των α-τύπου υπομονάδων. Οι α-τύπου δακτύλιοι, αποτελώντας τις «πύλες» του πρωτεασώματος, ελέγχουν την είσοδο της πρωτεΐνης-στόχου για αποικοδόμηση. Η έρευνα για την ανακάλυψη ενεργοποιητών του πρωτεασώματος έχει αποκαλύψει ενώσεις που ενισχύουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος μέσω της

πρόκλησης αλλαγών στη διαμόρφωσή του, οδηγώντας στο άνοιγμα των α-τύπου δακτυλίων του 20S πρωτεασώματος και άρα καθιστώντας το δεκτικό προς αποικοδόμηση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (Chondrogianni et al., 2020).

Οι Tanaka και συνεργάτες, έδειξαν πως η παρουσία μικρών συγκεντρώσεων δωδεκυλου-θεικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS) (0.04-0.08%) δρα ως ένας *in vitro* ενεργοποιητής του 20S πρωτεασώματος ευνοώντας το άνοιγμα της πρωτεασωμικής «πύλης» μέσω μερικής αποδιάταξής του (Tanaka et al., 1988, 1989). Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.08%, όπου το SDS αναστέλλει τη δράση του πρωτεασώματος (Tanaka et al., 1989). Παρόμοια ενεργοποίηση με το SDS έχει επιτευχθεί μέσω λιπαρών οξέων (fatty acids), όπως το ελαϊκό (oleic), το λινολεϊκό (linoleic) και το λινολενικό οξύ (linolenic acid) (Dahlmann et al., 1985; Watanabe & Yamada, 1996).

Το ισοπροπανολικό εκχύλισμα του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*, το οποίο περιέχει 99% λιπαρά οξέα και 1% ξανθοφύλλες, αυξάνει και τις τρεις πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεασώματος τόσο σε απομονωμένο ανθρώπινο πρωτεάσωμα όσο και σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα που τους έχει χορηγηθεί το ανωτέρω εκχύλισμα. Μάλιστα, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος διατηρείται και μετά από έκθεση των κερατινοκυττάρων σε UVA και UVB ακτινοβολία, ενώ παρατηρείται και μείωση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Bulteau et al., 2006). Επίσης, το πλούσιο σε λιπίδια εκχύλισμα από το *P. tricornutum* μειώνει τα επίπεδα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στο εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας ανθρώπων ύστερα από εφαρμογή του εκχυλίσματος δύο φορές την ημέρα για τρεις εβδομάδες (Nizard et al., 2004).

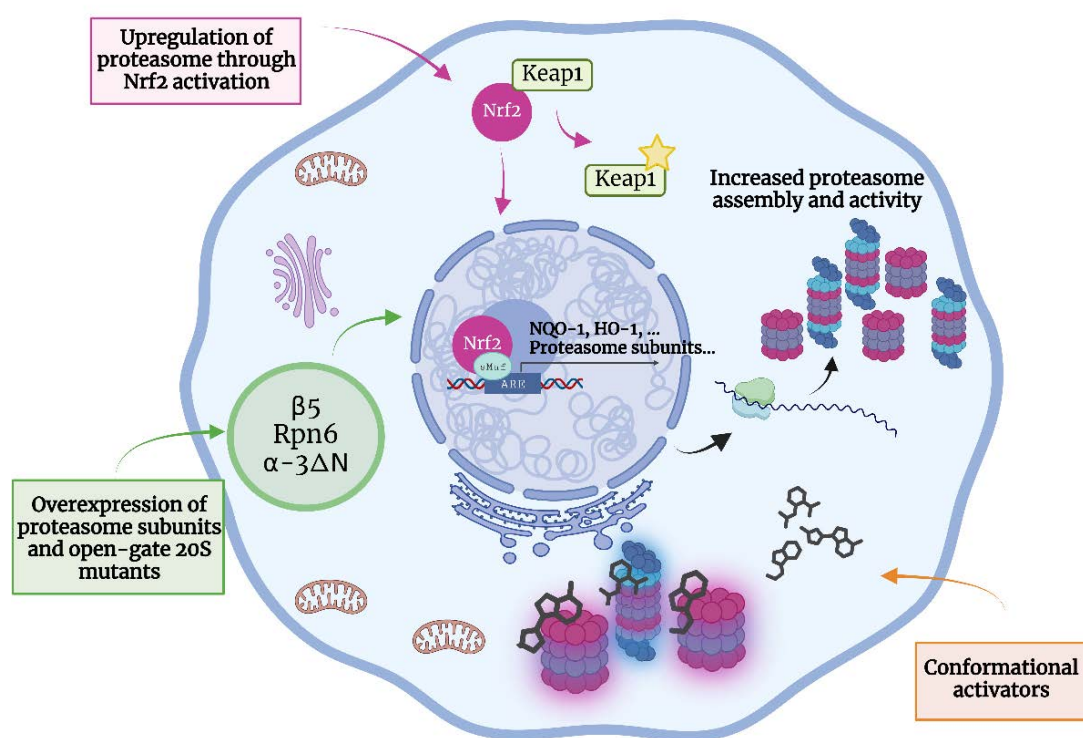
Η ελαιοευρωπαϊνή είναι μια άλλη ένωση που αλληλοεπιδρά με το 20S πρωτεάσωμα ενισχύοντας και τις τρεις πρωτεολυτικές του ενεργότητες *in vitro*. Η ελαιοευρωπαϊνή είναι το κύριο φαινολικό συστατικό του εκχυλίσματος φύλλων της *Olea europaea*, του ελαιολάδου και του καρπού των ελιών. Χορήγηση της ελαιοευρωπαϊνής σε πρωτογενείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου ανέδειξε τις αντιγηραντικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές της, καθώς τα κύτταρα καθυστερούν να εισέλθουν στο στάδιο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης και παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες (Katsiki et al., 2007).

Το τριτερπένιο βετουλινικό οξύ (betulinic acid) είναι ένας ακόμη θετικός ρυθμιστής του πρωτεασώματος, καθώς αυξάνει τη CT-L ενεργότητά του. Αντίθετα, δεν επηρεάζει την T-L ενεργότητα, ενώ η C-L ενεργότητα του πρωτεασώματος αυξάνεται ελαφρώς. Προσπάθειες για βελτιστοποίηση της δράσης του δεν έχουν τελεσφορήσει, καθώς οι παράγωγες ενώσεις που δημιουργήθηκαν οδήγησαν σε αντίθετα αποτελέσματα (L. Huang et al., 2007).

Επιπλέον, το συνθετικό πεπτίδιο proteasome activating peptide-1 (PAP1) αυξάνει τη CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος *in vitro* και *in cellulo* μέσω της ικανότητάς του να αλληλοεπιδρά με το 20S πρωτεάσωμα ευνοώντας το άνοιγμα της πύλης που οδηγεί στο καταλυτικό του κέντρο. Η ενεργοποίηση αυτή συνοδεύεται από προστασία των κυττάρων έναντι οξειδωτικού στρες και αυξάνει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης

SOD1 εμποδίζοντας τη συσσωμάτωσή της σε ένα κυτταρικό μοντέλο για τη νόσο ALS (Dal Vechio et al., 2014).

Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει νέους ενεργοποιητές/αγωνιστές του πρωτεασώματος, οι οποίοι αλληλοεπιδρούν είτε με το 20S είτε με το 20S και το 26S πρωτεάσωμα και λειτουργούν μέσω δύο κύριων μηχανισμών: (α) αλληλοεπιδρώντας αλλοστερικά με το πρωτεάσωμα ανοίγοντας την κλειστή πρωτεασωμακή «πύλη» που δημιουργείται από τις α-τύπου υπομονάδες των εξωτερικών δακτυλίων και προωθώντας την είσοδο του πρωτεϊνικού υποστρώματος στο καταλυτικό του κέντρο είτε (β) αλληλοεπιδρώντας αλλοστερικά με το πρωτεάσωμα ενισχύοντας τη σύνδεση του πρωτεϊνικού υποστρώματος και/ή την αποικοδόμησή του σε μία ή περισσότερες καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος (Njomen & Tepe, 2019). Τέτοιου είδους ενεργοποιητές ονομάζονται *δομικοί ενεργοποιητές* διότι στοχεύουν στην άμεση ενεργοποίηση του πρωτεασώματος και όχι στην ενεργοποίησή του μέσω άλλων μηχανισμών (Chondrogianni et al., 2020; Njomen & Tepe, 2019). Ενώσεις όπως η ιμιδαζολίνη (imidazoline) TCH-165 (Njomen et al., 2018), ανάλογα φαινοθειαζίνης (Jones et al., 2017), οι ενώσεις MK-886 και AM-404 (Salazar-Chaparro et al., 2024; Trader et al., 2017), η vitamin E succinate και το ουρσολικό οξύ (ursolic acid) (Coleman & Trader, 2018b), όπως και συγκεκριμένα κυκλικά πεπτίδια (Nelson et al., 2024) έχουν χαρακτηριστεί ως ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ιμιδαζολίνες είναι η μόνη κατηγορία ενώσεων αγωνιστών/ενεργοποιητών του πρωτεασώματος με δεδομένα από μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscope) που υποστηρίζουν τη δράση τους μέσω του ανοίγματος της πρωτεασωμακής «πύλης» (Njomen et al., 2018; Njomen & Tepe, 2019).



**Εικόνα 1.14: Τρόποι πρωτεασωμικής ενεργοποίησης.** Πρωτεασωμική ενεργοποίηση έχει επιτευχθεί είτε μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. Nrf2) και επακόλουθη επαγωγή της έκφρασης πρωτεασωμικών υπομονάδων (φούζια), μέσω γενετικών παρεμβάσεων που οδηγούν σε υπερέκφραση πρωτεασωμικών υπομονάδων ή στο «άνοιγμα της πύλης» του 20S πρωτεασώματος (πράσινο), και (γ) μέσω χορήγησης ενώσεων που επιδρούν στη δομή του πρωτεασώματος (πορτοκαλί). Created in BioRender. Vasilopoulou, M. (2024) <https://BioRender.com/o01t304>.

Καθώς οι γενετικές παρεμβάσεις δεν είναι πάντοτε εφικτές, πολλές μελέτες εστιάζουν σε φυσικές ενώσεις οι οποίες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα με στόχο την προαγωγή της υγιούς γήρανσης και της μακροζωίας. Οι ωκεανοί καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της Γης και αποτελούν το μεγαλύτερο βιότοπο, με περισσότερο από το ήμισυ της καταγεγραμμένης βιοποικιλότητας να αποτελείται από θαλάσσιους οργανισμούς. Για να προσαρμοστούν σε ποικίλα, και σε ορισμένες περιπτώσεις ακραία περιβάλλοντα, οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει βιοχημικές οδούς που επιτρέπουν την παραγωγή διαφόρων πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών με μοναδικές βιολογικές ιδιότητες. Πολλοί από τους μεταβολίτες αυτούς υπάρχουν και σε βρώσιμους θαλάσσιους οργανισμούς διεγείροντας το ενδιαφέρον για τις πιθανές εφαρμογές τους στην υγεία. Μέχρι σήμερα, πολλές φυσικές ενώσεις προερχόμενες από θαλάσσιους οργανισμούς έχουν χαρακτηριστεί για τις αντιοξειδωτικές και αντιγηραντικές τους ιδιότητες, καθώς και για τις προστατευτικές τους δράσεις έναντι της πρωτεϊνικής συσσώμωσης. Αν και πολλές ενώσεις με τις αντίστοιχες ιδιότητες προερχόμενες από χερσαίους οργανισμούς έχουν ταυτοποιηθεί ως πρωτεασωμικοί ενεργοποιητές, ελάχιστες ενώσεις που έχουν μελετηθεί να επιδρούν στο UPS προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς. Εντούτοις, αρκετές έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν οδούς που σχετίζονται τόσο με τη μεταγραφική ρύθμιση, όσο και με τη λειτουργία του UPS (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες FOXO και Nrf2) χωρίς όμως να μελετάται η άμεση σχέση τους με το πρωτεάσωμα (M. Vasilopoulou et al., 2021).

## 1.4 Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ταυτοποίηση φυσικών και συνθετικών ενώσεων με αντιγηραντική δράση και δράση εναντίον της πρωτεϊνικής συσσώματωσης, με έμφαση στην ταυτοποίηση ενώσεων ενεργοποιητών του πρωτεασώματος. Οι επιπτώσεις της δράσης των ενώσεων αυτών μελετήθηκαν αρχικά στην τροποποίηση του κυτταρικού (μοντέλο αναδιπλασιαστικής γήρανσης) και οργανισμικού (νηματώδης σκώληκας *C. elegans*) προσδόκιμου ζωής και επακόλουθα στην επαγωγή και εξέλιξη ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών, όπως η AD.

Στο πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής, και σε συνεργασία με το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σκοπός ήταν να ταυτοποιηθούν φυσικοί μεταβολίτες προερχόμενοι από τον ελληνικό θαλάσσιο πλούτο με ενεργοποιητική δράση έναντι του πρωτεασώματος. Μεταβολίτες διαφόρων χημικών ομάδων από βιβλιοθήκη πλήρως χαρακτηρισμένων ουσιών απομονωμένων από βενθικούς οργανισμούς της Μεσογείου σαρώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν δομικά (μέσω στερεοχημικής αλληλεπίδρασης) το πρωτεάσωμα *in vitro* μέσω χρήσης απομονωμένου καθαρού πρωτεασώματος, και *in cellulo* σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου. Στη συνέχεια, η ένωση με το βέλτιστο αποτέλεσμα ελέγχθηκε για την αντιγηραντική της δράση σε κυτταρικό (πρωτογενείς, εμβρυϊκοί ινοβλάστες ανθρώπου) και οργανισμικό (νηματώδης σκώληκας *C. elegans*) επίπεδο ώστε να μελετηθεί η επίδραση της δομικής ενεργοποίησης του πρωτεασώματος στην εξέλιξη της γήρανσης. Παράλληλα, η βέλτιστη αυτή ένωση ελέγχθηκε και για την πιθανή νευροπροστατευτική της δράση σε νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου και σε οργανισμικά μοντέλα του σκώληκα *C. elegans* για την AD, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της δομικής ενεργοποίησης του πρωτεασώματος στην επαγωγή και εξέλιξη ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών.

Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Katsiki et al., 2007) έδειξε πως η ελαιοευρωπαϊνή, το κύριο φαινολικό συστατικό του ελαιόλαδου, αλληλοεπιδρά με το 20S πρωτεάσωμα αυξάνοντας και τις τρεις πρωτεολυτικές του ενεργότητες *in vitro*, ενώ αποκαλύφθηκε και η αντιγηραντική δράση της ένωσης αυτής μέσω της επιβράδυνσης της κυτταρικής γήρανσης σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου. Συνδυάζοντας το κύριο συστατικό της ελαιοευρωπαϊνης, την υδροξυτυροσόλη, και τη βιταμίνη E, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών νέες υβριδικές ενώσεις (Koufaki M., Calogeropoulou. T., Chondrogianni. N., Papahatjis D., Gonos E., Fotopoulou T., Proussis K., Chazapi E., 2019, Bioinspired proteasome activators with anti-ageing activity, PCT/GR2019/000018, WIPO). Έτσι, στο δεύτερο μέρος της διδακτορικής διατριβής, οι νέες αυτές υβριδικές ενώσεις ελέγχθηκαν αρχικά ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν δομικά (μέσω στερεοχημικής αλληλεπίδρασης) το πρωτεάσωμα *in vitro* μέσω χρήσης απομονωμένου καθαρού πρωτεασώματος, και έπειτα *in cellulo* σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της δομικής ενεργοποίησης του

πρωτεασώματος τόσο στην εξέλιξη της γήρανσης όσο και στην επαγωγή και εξέλιξη της AD μέσω της αποτίμησης της αντιγηραντικής και/ή νευροπροστατευτικής δράσης των βέλτιστων υβριδικών ενώσεων σε αντίστοιχα κυτταρικά και οργανισμικά μοντέλα γήρανσης.

Συνολικά, η παρούσα διατριβή στοχεύει στην ταυτοποίηση συνθετικών και φυσικών ενώσεων με ενεργοποιητική δράση έναντι του πρωτεασώματος και στις επιδράσεις αυτών στην εξέλιξη της κυτταρικής και οργανισμικής γήρανσης καθώς και στην εξέλιξη της AD. Η πρωτοτυπία της διατριβής έγκειται στο γεγονός ότι οι ουσίες που ανέδειξε θα στοχεύουν απευθείας στο πρωτεασωματικό σύμπλοκο χωρίς να απαιτείται κανένα άλλο ενδιάμεσο βιομόριο για την επίτευξη της πρωτεασωματικής ενεργοποίησης. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ελεγχόμενη ενεργοποίηση του πρωτεασώματος και αποφεύγεται η εμφάνιση παρενεργειών καθώς δεν μεσολαβείται η τροποποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ. Nrf2) που έχουν ως στόχο την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Τέτοιοι δομικοί πρωτεασωματικοί ενεργοποιητές θα μπορούσαν να έχουν πολλές εφαρμογές τόσο στην αξιοποίησή τους σε καλλυντικά προϊόντα αντιγήρανσης, όσο και στην ανάπτυξη συμπληρωμάτων διατροφής ή φαρμάκων για την πρόληψη ή και τη θεραπεία ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών. Παράλληλα, η ανάδειξη δομικών ενεργοποιητών προερχόμενων από βενθικούς οργανισμούς της Μεσογείου θα αναδεικνύει τον θαλάσσιο πλούτο μας, ενώ ταυτόχρονα είναι πρωτοπόρος στον τομέα των πρωτεασωματικών ενεργοποιητών, καθώς υπάρχει, σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία, ακόμη μία μόνο μελέτη που αφορά εκχύλισμα (και όχι ένωση) από το άλγος *P. tricornutum* με την ικανότητα αυτή (Bulteau et al., 2006).

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

*Πίνακας 2-1: Χημικά αντιδραστήρια.*

| Αντιδραστήρια                                                                   | Εταιρεία                            |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Suc-LLVY-AMC (προσδιορισμός ενεργότητας χυμοθρυψίνης, CT-L proteasome activity) | UBPBio                              |
| Boc-LRR-AMC (προσδιορισμός ενεργότητας θρυψίνης, T-L proteasome activity)       | UBPBio                              |
| Z-LLE-AMC (προσδιορισμός ενεργότητας κασπάσης, C-L proteasome activity)         | UBPBio                              |
| Καθαρό, απομονωμένο, ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα                                   | Protein Center Kibbuzt Ramat Yohana |
| MG132                                                                           | UBPBio                              |
| Epoxomicin                                                                      | UBPBio                              |
| 2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)                          | Molecular Probes, Invitrogen Ltd    |
| DC assay για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών                        | Bio-Rad Laboratories                |
| Bradford για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών                        | Bio-Rad Laboratories                |
| Oxyblot™ Protein Oxidation Detection Kit                                        | Millipore                           |
| 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase                                    | Duchefa Biochemie                   |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO)                                                       | Sigma-Aldrich                       |
| Geneticin G418                                                                  | ThermoFisher Scientific             |
| Clarity™ Western ECL substrate                                                  | Bio-Rad Laboratories                |

## 2.1.2 Αντισώματα

Πίνακας 2-2: Αντισώματα.

| Αντίσωμα                                      | Δευτερογενές αντίσωμα | Αραίωση | Εταιρεία                 | Αριθμός καταλόγου |
|-----------------------------------------------|-----------------------|---------|--------------------------|-------------------|
| β1 υπομονάδα του πρωτεασώματος                | Anti-mouse            | 1:1000  | Enzo Life Sciences       | BML-PW8140        |
| β2 υπομονάδα του πρωτεασώματος                | Anti-mouse            | 1:1000  | Enzo Life Sciences       | BML-PW8145        |
| β5 υπομονάδα του πρωτεασώματος                | Anti-rabbit           | 1:1000  | Enzo Life Sciences       | BML-PW8895        |
| α6 υπομονάδα του πρωτεασώματος                | Anti-mouse            | 1:1000  | Enzo Life Sciences       | BML-PW8100        |
| α7 υπομονάδα του πρωτεασώματος                | Anti-mouse            | 1:1000  | Enzo Life Sciences       | BML-PW8110        |
| p21 Waf1/Cip1 (12D1)                          | Anti-rabbit           | 1:1000  | Cell Signaling           | 2947              |
| p16 INK4A (JC8)                               | Anti-mouse            | 1:1000  | Santa Cruz Biotechnology | sc-56330          |
| Rb x Amyloid oligomer antibody                | Anti-rabbit           | 1:1000  | Millipore                | AB9234            |
| 6E10                                          | Anti-mouse            | 1:1000  | BioLegend                | 803301            |
| Heme Oxygenase-1 (HO-1)                       | Anti-goat             | 1:1000  | Santa Cruz Biotechnology | sc-1797           |
| NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) (C19) | Anti-goat             | 1:1000  | Santa Cruz Biotechnology | sc-16464          |
| GAPDH                                         | Anti-mouse            | 1:1000  | Santa Cruz Biotechnology | sc-47724          |
| Actin                                         | Anti-mouse            | 1:1000  | MP Biomedicals           | 691002            |
| Anti-mouse                                    | *                     | 1:2000  | Santa Cruz Biotechnology | sc-516102         |
| Anti-rabbit                                   | *                     | 1:2000  | Santa Cruz Biotechnology | sc-2357           |
| Anti-goat                                     | *                     | 1: 2000 | Santa Cruz Biotechnology | sc-2354           |

### 2.1.3 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- Πρωτογενείς, εμβρυϊκοί ινοβλάστες του ανθρώπου (ECACC 89071902) (Human Fetal Lung Fibroblasts, **HFL-1**): απομονώθηκαν από πνεύμονα λευκού, υγιούς εμβρύου ηλικίας 16-18 εβδομάδων. Αποκτήθηκαν από την European Collection of Cell Cultures.
- Κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (Chinese Hamster Ovary, **CHO**) (άγριου τύπου, wt) και μετασχηματισμένες CHO κυτταρικές σειρές σταθερά διαμολυσμένες να εκφράζουν την αγρίου τύπου ανθρώπινη APP πρωτεΐνη (**CHO-7PA2**). Οι κυτταρικές σειρές CHO-7PA2 δημιουργήθηκαν με εισαγωγή του cDNA της βAPP770 (10 μg κυκλικού πλασμιδίου), η οποία φέρει τη μετάλλαξη Val → Phe στο κατάλοιπο 717, στο φορέα έκφρασης pCMV751 με χρήση της μεθόδου διαμόλυνσης Lipofectin. Η επιλογή και απομόνωση των κλώνων που εκφράζουν μόνιμα τη βAPP770 μετά τη διαμόλυνση πραγματοποιείται παρουσία γενετισίνης (geneticin, G418) (Podlisny et al., 1995). Τα κύτταρα αποκτήθηκαν μέσω της ευγενικής χορηγίας του Ερευνητή Α' Δρ. Κ. Βεκρέλλη.
- Νευροβλαστικά κύτταρα **SH-SY5Y** του ανθρώπου: 3<sup>η</sup> γενιάς νευροβλαστικά κύτταρα προερχόμενα από τη νευροβλαστική κυτταρική σειρά SK-N-SH. Απομονώθηκαν αρχικά από το μυελό των οστών τετράχρονου κοριτσιού με μεταστατική μορφή καρκίνου το 1970. Τα κύτταρα αποκτήθηκαν μέσω της ευγενικής χορηγίας του Ερευνητή Α' Δρ. Κ. Βεκρέλλη.

#### 2.1.3.1 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO<sub>2</sub> και σχετικής υγρασίας 95%. Η καλλιέργεια όλων των κυττάρων πραγματοποιείται σε άσηπτες συνθήκες όπως έχει περιγραφεί από τους Hayflick και Moorhead (Hayflick & Moorhead, 1961) και από τους Mondello και συνεργάτες (Mondello et al., 1999). Συνοπτικά, τα κύτταρα διατηρούνται σε πλήρες μέσο καλλιέργειας. Το μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε δεύτερη ημέρα. Οι πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου διατηρούνται σε μέσο καλλιέργειας Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% (v/v) θερμικά-απενεργοποιημένο ορό από έμβρυο βοός (heat-inactivated fetal bovine serum, FBS, Invitrogen), 2% γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 1% μη απαραίτητα αμινοξέα (Invitrogen). Τα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου καλλιεργούνται σε μέσο καλλιέργειας DMEM το οποίο εμπλουτίζεται με 10% (v/v) ορό FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Οι κυτταρικές σειρές CHO και CHO-7PA2 διατηρούνται σε μέσο καλλιέργειας Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 το οποίο εμπλουτίζεται με 10% (v/v) ορό FBS, 2% γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 150 μg/ml γενετισίνη G418 (αντιβιοτικό επιλογής διαμολυσμένων κυττάρων).

Για τη δημιουργία των μέσων καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με τα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y (conditioned media, CM/CM<sub>AB</sub>) ακολουθείται η εξής διαδικασία: όταν τα κύτταρα CHO και CHO-7PA2 καλύπτουν περίπου το 90% της επιφάνειας της φλάσκας, πλένονται μια φορά με διάλυμα PBS (διάλυμα φωσφορικών αλάτων, Phosphate-Buffered Saline) και επωάζονται για περίπου 16 ώρες σε εμπλουτισμένο μέσο καλλιέργειας RPMI χωρίς την παρουσία FBS και G418. Μετά το πέρας των 16 ωρών, τα κύτταρα CHO και CHO-7PA2 συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται στα 1500 rpm για 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα και τα κυτταρικά θραύσματα. Το υπερκείμενο από τα CHO και CHO-7PA2 κύτταρα αποτελεί το CM και CM<sub>AB</sub> conditioned medium, αντίστοιχα. Τα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου εκτίθενται σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας παρουσία της υπό εξέταση ένωσης στην επιθυμητή συγκέντρωση ή του διαλύτη (control) και σε 20 nM εποξομισίνης (ενός αναστολέα του πρωτεασώματος (Sin et al., 1999)), όπου αυτό αναφέρεται, για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα SH-SY5Y κύτταρα ξεπλένονται μία φορά με διάλυμα PBS και εκτίθενται στα αντίστοιχα conditioned media (CM/CM<sub>AB</sub>) εμπλουτισμένα με την υπό εξέταση ένωση ή το διαλύτη (control) και σε 20 nM εποξομισίνης, όπου αυτό αναφέρεται, για 24 ώρες.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου το 90% του πυθμένα της φλάσκας ή του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας ή ήταν αναγκαίο να χωρισθούν σε συγκεκριμένες αραιώσεις, τότε ανακαλλιεργούνται. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κύτταρα που καλλιεργούνται σε μονοκυτταρικό ταπήτιο γίνονται τόσα πολλά με το πέρας των ημερών αποκτώντας τέτοια επαφή μεταξύ τους η οποία οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού τους, φαινόμενο που ονομάζεται «αναστολή της αύξησης λόγω επαφής» (contact inhibition of growth). Το φαινόμενο αυτό πρέπει να αποφεύγεται στην περίπτωση των πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. Για την πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας, αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ακολουθεί μία έκπλυση με διάλυμα PBS ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα ορού που παρεμποδίζουν τη δράση της θρυψίνης. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 1 λεπτό παρουσία θρυψίνης και η αποκόλληση των κυττάρων επιτυγχάνεται με ήπια μηχανική ανατάραξη της φλάσκας ή του τρυβλίου καλλιέργειας. Στη συνέχεια, προστίθενται νέο θρεπτικό υλικό προκειμένου να τερματιστεί η δράση της θρυψίνης. Τα αποκολλημένα κύτταρα τοποθετούνται σε καινούριες φλάσκες (split) ή σε τρυβλία μετά την καταμέτρησή τους, ανάλογα με την απαιτούμενη συγκέντρωση και αραιώση αυτών. Για τα φυσιολογικά κύτταρα που πραγματοποιούν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων πριν φθάσουν στο σημείο της μη αντιστρεπτής παύσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (αναδιπλασιαστική γήρανση/replicative senescence), μια αραιώση (split ratio) 1:2 ισοδυναμεί με έναν κύκλο διπλασιασμού.

Ο αριθμός διπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού προσδιορίζεται με βάση το μαθηματικό τύπο:  $\log N / \log 2$ , όπου N ο αριθμός των κυττάρων σε μια πλήρη καλλιέργεια διαιρούμενος με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που τοποθετήθηκαν στη φλάσκα. Ειδικά για τον προσδιορισμό των κυτταρικών διαιρέσεων που συνολικά πραγματοποιούν στην καλλιέργεια τα κύτταρα παρουσία ουσιών, 55000 κύτταρα

τοποθετούνται σε κάθε βοθρίο ενός πιάτου 6 βοθρίων (6-well plate) εις τριπλούν για κάθε ουσία και για το διαλύτη της ουσίας (control) και γίνεται καταμέτρηση του αριθμού τους. Με τη βοήθεια του παραπάνω τύπου είναι δυνατός ο υπολογισμός του αριθμού των διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού. Οι μετρήσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται εις διπλούν με τη βοήθεια μετρητή κυττάρων Coulter Z2 Counter (Coulter Corporation) και οι τιμές παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος αυτών των τιμών. Παράλληλα κατά την *in vitro* καλλιέργεια των κυττάρων, απομονώνονται πρωτεΐνες από αυτά σε διάφορα στάδια. Για τους πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου, νεαρά *in vitro* κύτταρα θεωρούνται εκείνα που βρίσκονται σε CPD < 35 και γηρασμένα τα κύτταρα CPD > 40. Για τα καρκινικά κύτταρα (SH-SY5Y, CHO, CHO-7PA2) δεν υπολογίζονται κυτταρικοί διπλασιασμοί, αφού οι κυτταρικές αυτές σειρές είναι αθάνατες.

#### 2.1.3.2 Αποθήκευση των κυττάρων

Για μακράς διάρκειας αποθήκευση κυτταρικών σειρών και πρωτογενών κυττάρων, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται, συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση, επαναιωρούνται σε υγρό κατάψυξης και μεταφέρονται σε πλαστικά φιαλίδια κρυοσυντήρησης (ampoules, Corning). Το υγρό κατάψυξης περιέχει 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma-Aldrich) ως κρυοπροστατευτικό μέσο παρεμποδίζοντας το σχηματισμό παγοκρυστάλλων που είναι καταστρεπτικοί για τα κύτταρα. Μετά από σταδιακή ψύξη με τη βοήθεια ειδικού δοχείου με ισοπροπανόλη στους -80 °C για περίπου 16 ώρες, τα φιαλίδια κρυοσυντήρησης μεταφέρονται και αποθηκεύονται σε δοχεία υγρού αζώτου (-196 °C). Αντίθετα, η διαδικασία απόψυξης γίνεται γρήγορα με απευθείας τοποθέτηση του φιαλιδίου από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C. Ακολούθως, το περιεχόμενο του φιαλιδίου επαναιωρείται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας και μεταφέρεται σε φλάσκες. Αφού ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων (την επόμενη ημέρα) το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με νέο.

#### 2.1.4 Νηματώδης σκώληκας *C. elegans*

##### 2.1.4.1 Διαγονιδιακά στελέχη *C. elegans*

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του νηματώδους σκώληκα *Caenorhabditis elegans* που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2-2**. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από το *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) του πανεπιστημίου της Minnesota χρηματοδοτούμενο από το National Institutes of Health – Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Το στέλεχος UA198 είναι ευγενική χορηγία του Καθηγητή Guy A. Caldwell. Η παρατήρηση των σκωλήκων έγινε στο στερεομικροσκόπιο Nikon SMZ 745.

**Πίνακας 2-3: Στελέχη νηματώδους σκώληκα *C. elegans*.**

| Ονομασία | Γονότυπος              | Περιγραφή    |
|----------|------------------------|--------------|
| N2       | Wild type (N2) Bristol | άγριος τύπος |

|               |                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CL4176</b> | dvIs27 [pAF29(myo-3p:A-Beta (1-42)::let-851 3'UTR) + (pRF4(rol-6(su1006)))]                                                           | Θερμοεπαγόμενη έκφραση του ανθρώπινου Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου στα μυϊκά κύτταρα. Οδηγεί σε σταδιακή παράλυση των ζώων εντός 24-48 ωρών έπειτα από αύξηση της θερμοκρασίας. Σήμανση με <i>rol-6</i> (οι σκώληκες κάνουν κυλινδρικές κινήσεις). Διατήρηση στους 16 °C.          |
| <b>CL2331</b> | dvIs37 [myo-3p::GFP::A-Beta (3-42) + <i>rol-6</i> (su1006)]                                                                           | Έκφραση του ανθρώπινου Αβ <sub>3-42</sub> πεπτιδίου στα μυϊκά κύτταρα συζευγμένο με GFP. Δημιουργία συσσωματωμάτων Αβ <sub>3-42</sub> πεπτιδίου. Σήμανση με <i>rol-6</i> (οι σκώληκες κάνουν κυλινδρικές κινήσεις). Διατήρηση στους 16 °C. Πιο άρρωστο σε υψηλότερες θερμοκρασίες. |
| <b>UA198</b>  | <i>baIn34</i> [ <i>P<sub>eat-4</sub></i> ::Αβ, <i>P<sub>myo-2</sub></i> ::mCherry]; <i>adIs1240</i> [ <i>P<sub>eat-4</sub></i> ::GFP] | Έκφραση του ανθρώπινου Αβ <sub>1-42</sub> πεπτιδίου στους γλουταματεργικούς νευρώνες συζευγμένο με GFP. Έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής mCherry στους μυς του φάρυγγα. Διατήρηση στους 20 °C.                                                                                    |

#### 2.1.4.2 Συντήρηση και καλλιέργεια στελεχών *C. elegans*

Η καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους σκώληκα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τεχνικές που έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Stiernagle, 2006). Τα διάφορα στελέχη καλλιεργούνται σε NGM (Nematode Growth Media) τρυβλία μεσαίου μεγέθους (60 mm) με άγαρ (ποσότητας 8 ml) με επίστρωση καλλιέργειας *E. coli* στελέχους OP50 (0.2 - 0.5 ml) ως τροφή των σκωλήκων, υπό μη υπερπληθυσμιακές συνθήκες. Τα τρυβλία με τους σκώληκες διατηρούνται κατά κανόνα μεταξύ 15 και 20 °C, ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης για το κάθε στέλεχος. Τα τρυβλία με τους σκώληκες τοποθετούνται ανάποδα ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο αφυδάτωσης.

Για την ανανέωση των πληθυσμών των σκωλήκων χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι. Η πιο γρήγορη και απλή μέθοδος ονομάζεται «chunking», όπου με ένα αποστειρωμένο

νυστέρι ή σπάτουλα αποκόπτεται ένα μικρό τμήμα από το άγαρ ενός NGM τρυβλίου που περιέχει ένα πληθυσμό σκωλήκων και τοποθετείται ανεστραμμένα στην επιφάνεια ενός νέου NGM τρυβλίου. Με αυτόν τον τρόπο, οι σκώληκες σέρνονται από αυτό το κομμάτι και εξαπλώνονται επάνω στη βακτηριακή χλόη του νέου NGM τρυβλίου. Η δεύτερη μέθοδος αφορά στην επιλογή και τη μεταφορά μικρού αριθμού σκωλήκων (συνήθως 4) με τη χρήση ενός pick ενός λευκόχρυσου σύρματος με πεπλατυσμένο άκρο στερεωμένο σε μία πιπέτα Pasteur. Κατά τη διαδικασία αυτή, μικρή ποσότητα από τη βακτηριακή χλόη συλλέγεται με το pick (προς αποφυγή τραυματισμού των σκωλήκων) και στη συνέχεια επιλέγονται οι σκώληκες που θα μεταφερθούν στα νέα τρυβλία. Η άκρη του pick ακουμπάται ελαφρώς επάνω στη βακτηριακή χλόη του νέου τρυβλίου και οι σκώληκες σέρνονται προς το νέο τρυβλίο. Το σύρμα θερμαίνεται σε φλόγιστρο μεταξύ των μεταφορών ώστε να αποστειρωθεί και να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις.

#### 2.1.4.3 Διατροφή στελεχών *C. elegans*

Μικρή ποσότητα βακτηριακής καλλιέργειας *E. coli* OP50 (0.2 - 0.5 ml) που έχει αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani medium) στους 37 °C και βρίσκεται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής της, επιστρώνεται στην επιφάνεια NGM τρυβλίων, αφήνεται να αναπτυχθεί περαιτέρω και να στεγνώσει (περίπου 24 ώρες). Τα επιστρωμένα τρυβλία διατηρούνται στους 4 °C. Το στέλεχος OP50 της *E. coli* χρησιμοποιείται για την καθημερινή συντήρηση και ανάπτυξη των σκωλήκων. Η *E. coli* OP50 είναι ένα στέλεχος αυξότροφο σε ουρακίλη, αποτρέποντας την ανάπτυξή της λόγω της έλλειψης ουρακίλης στα NGM τρυβλία. Η περιορισμένη βακτηριακή χλόη είναι επιθυμητή διότι επιτρέπει την ευκολότερη παρακολούθηση των σκωλήκων και διευκολύνει το ζευγάρωμά τους. Το στέλεχος αυτό είναι επίσης ανθεκτικό στη στρεπτομυκίνη, η οποία προστίθεται στο NGM για την αποφυγή επιμολύνσεων. Για να δημιουργηθεί καλλιέργεια *E. coli* OP50, σε LB με αμικικιλίνη εμβολιάζεται μικρή ποσότητα βακτηρίων προερχόμενα από μία αποικία και στη συνέχεια καλλιεργούνται στους 37 °C υπό ανάδευση έως την εκθετική φάση οπότε και απλώνεται σε NGM τρυβλία με στείρα τεχνική. Αρκετά σημαντικό είναι τα βακτήρια να μην απλώνονται σε ολόκληρο το τρυβλίο, καθώς οι σκώληκες έχουν την τάση να περνούν το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου τους στη βακτηριακή χλόη. Με τον τρόπο αυτό, ελαχιστοποιείται η πιθανότητα οι σκώληκες να συρθούν επάνω στις πλευρές του τρυβλίου με συνέπεια να αφυδατωθούν.

#### 2.1.4.4 Αποθήκευση στελεχών *C. elegans*

Οι νηματώδεις *C. elegans* μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80 °C μετά από κατάλληλη διεργασία. Για να είναι επιτυχημένη η ψύξη τα ζώα πρέπει να βρίσκονται στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο και η ψύξη έως τους -80 °C να είναι σταδιακή. Οι προνύμφες που βρίσκονται στο αναπτυξιακό στάδιο L1 ή L2 επιβιώνουν καλύτερα τη ψύξη, ενώ τα καλά τρεφόμενα σκουλήκια, τα ενήλικα, τα αυγά και οι προνύμφες dauer δεν επιβιώνουν επιτυχώς. Έτσι, είναι καλύτερο να ψύχονται νηματώδεις από τρυβλία τα οποία περιέχουν πολλά L1-L2 ζώα και των οποίων μόλις

έχει εξαντληθεί η τροφή (*E. coli* OP50). Τα NGM τρυβλία ξεπλένονται αρχικά με κρύο διάλυμα M9 (για σταδιακή ψύξη) και στο εναιώρημα προστίθεται ίσος όγκος παγωμένου διαλύματος ψύξης. Ακολουθώντας, το εναιώρημα κατανέμεται σε αρκετά πλαστικά φιαλίδια κρυοσυντήρησης (ampoules, Corning) τα οποία καταψύχονται σταδιακά με τη βοήθεια ειδικού δοχείου με ισοπροπανόλη στους -80 °C. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας ένα από τα φιαλίδια αποψύχεται μετά από περίπου μία εβδομάδα προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της ψύξης. Η απόψυξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου όπου αφήνεται να λιώσει ο πάγος και στη συνέχεια το περιεχόμενο μεταφέρεται σε NGM τρυβλία επιστρωμένα με *E. coli* OP50. Οι σκωλήκες αφήνονται να ανακάμψουν για 3-4 μέρες στη βέλτιστη για το εκάστοτε στέλεχος θερμοκρασία. Όσα περισσότερα ζώα επιβιώσουν τόσο αποτελεσματικότερο ήταν το πάγωμά τους και τόσο μεγαλύτερες οι πιθανότητες να διατηρηθούν τα ζώα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Συνίσταται η αποθήκευση των σκωλήκων και σε υγρό άζωτο (-196 °C) όπου η ανάκτηση των νηματωδών που ψύχθηκαν κυμαίνεται σε ποσοστό 35-45%, ποσοστό το οποίο ενδέχεται να μειωθεί ελαφρώς μετά την πάροδο κάποιων χρόνων. Η ανάκαμψη των σκωλήκων που έχουν διατηρηθεί στους -80 °C δεν είναι τόσο επιτυχημένη όσο αυτής από το υγρό άζωτο.

### 2.1.5 Διαλύματα

**Πίνακας 2-4: Διαλύματα.**

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Πλήρες μέσο καλλιέργειας HFL-1</b>        | Υγρό καλλιέργειας DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) στο οποίο έχει προστεθεί: 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (για την παροχή των απαραίτητων αυξητικών παραγόντων), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 2 mM γλουταμίνη, 1% (v/v) μη απαραίτητα αμινοξέα |
| <b>Πλήρες μέσο καλλιέργειας SH-SY5Y</b>      | Υγρό καλλιέργειας DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) στο οποίο έχει προστεθεί: 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (για την παροχή των απαραίτητων αυξητικών παραγόντων), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη                                                   |
| <b>Πλήρες μέσο καλλιέργειας CHO/CHO-7PA2</b> | Υγρό καλλιέργειας RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) στο οποίο έχει προστεθεί: 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (για την παροχή των απαραίτητων αυξητικών παραγόντων), 100 units/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 2 mM γλουταμίνη, 150 µg/ml G418           |
| <b>Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS)</b>       | 10x PBS σε απεσταγμένο νερό προκειμένου να γίνει 1x                                                                                                                                                                                                                         |

|                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Διάλυμα θρυψινοποίησης</b>                                             | 1% (v/v) θρυψίνη σε διάλυμα PBS/0.02% EDTA                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Υγρό κατάψυξης κυττάρων HFL-1/SH-SY5Y/CHO/CHO-7PA2</b>                 | 40% (v/v) πλήρες θρεπτικό υλικό (ανάλογα την κυτταρική σειρά που πρόκειται να καταψύξουμε), 50% (v/v) FBS, 10% (v/v) DMSO. Φυλάσσεται στους 4 °C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα μήνα από την ημέρα παρασκευής του                                                                                                             |
| <b>Διάλυμα 1% (w/v) Crystal violet</b>                                    | 1gr Crystal Violet σε 100 ml ddH <sub>2</sub> O                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Διάλυμα μονιμοποίησης κυττάρων</b>                                     | 0.2% (v/v) γλουταραλδεΐδη, 2% (v/v) φορμαλδεΐδη                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Διάλυμα χρώσης SA-β-γαλακτοσιδάσης</b>                                 | 150 mM NaCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 40 mM κιτρικό οξύ C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , 12 mM φωσφορικό νάτριο Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.0, 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-gal). Το διάλυμα παρασκευάζεται ακριβώς πριν από τη χρήση του |
| <b>Διάλυμα RIPA buffer για απομόνωση πρωτεϊνών</b>                        | 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM φαινυλμεθυλσουλφονύλο-φθορίδιο (PMSF)                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Διάλυμα λύσης για ενεργότητες πρωτεασώματος (Lysis buffer)</b>         | 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10% γλυκερόλη, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mg/ml απροτινίνη, 0.2% Nonidet P-40, 5 mM ATP, 1 mM DTT, 10 mM φαινυλμεθυλσουλφονύλο-φθορίδιο (PMSF)                                                                                                                                                                 |
| <b>Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes</b>                                           | 0.1 M Hepes σε ddH <sub>2</sub> O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.3 με HCl                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Διάλυμα Laemmli για απομόνωση πρωτεϊνών για ανοσοαποτύπωμα Western</b> | 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη, 0.01% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 1M DTT (προαιρετικό)                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>4x Tris-HCl-SDS, pH 6.8 (Stacking buffer)</b>                          | 0.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6.8 με τη χρήση HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C                                                                                                                                                                                                               |
| <b>4x Tris-HCl-SDS, pH 8.8 (Resolving buffer)</b>                         | 1.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.8 με τη χρήση HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Διάλυμα ακρυλαμίδιου (40%) (Acrylamide solution)</b>                   | 38 gr ακρυλαμίδα, 2 gr 1,2-διϋδρόξυ-αιθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο. Ο όγκος του                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                                                                          |                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                          | διαλύματος συμπληρώνεται με ddH <sub>2</sub> O έως 100 ml. Φυλάσσεται στους 4 °C                                                                                                   |
| <b>Πήκτωμα συμπύκνωσης ακρυλαμιδίου (6%) (Stacking Gel)</b>              | 6% (v/v) διάλυμα ακρυλαμιδίου, 1x Tris-HCl pH 6.8, 1% (v/v) APS, 0.2% (v/v) TEMED                                                                                                  |
| <b>Πήκτωμα διαχωρισμού ακρυλαμιδίου (12%) (Seperating/Resolving Gel)</b> | 12% (v/v) διάλυμα ακρυλαμιδίου, 1x Tris-HCl-SDS pH 8.8, 1% (v/v) APS, 0.2% (v/v) TEMED                                                                                             |
| <b>Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (Protein Loading Buffer)</b>               | 0.125 M Tris-HCl pH 7.5, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) γλυκερόλη, 2 mM EDTA pH 8, 0.01% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης                                                                     |
| <b>1x Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer)</b>                        | 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% (w/v) SDS                                                                                                                                         |
| <b>APS (10%)</b>                                                         | 1gr APS σε 10 ml ddH <sub>2</sub> O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C για περίπου 10 ημέρες                                                                                       |
| <b>Μπλε της βρωμοφαινόλης (0.4% w/v)</b>                                 | 4 mg μπλε της βρωμοφαινόλης σε 1 ml ddH <sub>2</sub> O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου                                                                             |
| <b>1x Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer buffer)</b>                  | 48 mM Tris, 39 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη, 0.04% (w/v) SDS                                                                                                                     |
| <b>Διάλυμα Ponceau S</b>                                                 | 2% (w/v) Ponceau S σε 30% (v/v) τριχλωροοξικό οξύ                                                                                                                                  |
| <b>20x TBS</b>                                                           | 20 mM Tris, 137 mM NaCl. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.6 με HCl                                                                                                            |
| <b>Διάλυμα πλύσης (Washing buffer)</b>                                   | 1x TBS/0.1% (v/v) Tween-20                                                                                                                                                         |
| <b>Διάλυμα Διαλυτοποίησης/Blocking</b>                                   | Διάλυμα 5% (w/v) σκόνης γάλακτος με χαμηλά λιπαρά σε 1x TBS/0.1% (v/v) Tween-20                                                                                                    |
| <b>Διάλυμα αφαίρεσης αντισωμάτων (Stripping buffer)</b>                  | 0.0625 M Tris, pH 6.7, 0.1 M β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% (w/v) SDS                                                                                                                      |
| <b>Dilution buffer για Oxyblot</b>                                       | 1x PBS/0.05% (v/v) Tween-20                                                                                                                                                        |
| <b>Blocking/Dilution buffer για Oxyblot</b>                              | 1% (w/v) BSA σε 1x PBS/0.05% (v/v) Tween-20                                                                                                                                        |
| <b>Nematode Growth Media (NGM) (1lt)</b>                                 | 3 gr NaCl, 2,5 gr bactopectone, 0,2 gr streptomycin, 17 gr agar, 1 ml CaCl <sub>2</sub> 1M, 1 ml MgSO <sub>4</sub> 1M, 1 ml χοληστερόλη (5 mg/ml διαλυμένη σε 100% αιθανόλη), 1 ml |

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                              | νυστατίνη (10 mg/ml διαλυμένη σε 70% αιθανόλη), 25 ml KPO <sub>4</sub> 1 M pH 6.0. Τα διαλύματα CaCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> και KPO <sub>4</sub> προϋπάρχουν αποστειρωμένα και προστίθενται στο διάλυμα μετά την αποστείρωσή τους. Το ίδιο γίνεται και με τη χοληστερόλη και τη νυστατίνη, τα οποία δεν αποστειρώνονται λόγω του ότι είναι διαλυμένα σε αιθανόλη |
| <b>Υδατικό διάλυμα M9 (1lt)</b>              | 3 gr KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6 gr Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5 gr NaCl. Μετά την αποστείρωση προστίθεται 1 ml MgSO <sub>4</sub> 1 M                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Διάλυμα ψύξης σκωλήκων (1lt)</b>          | 5,85 gr NaCl, 50 ml KPO <sub>4</sub> 1 M, pH 6.0, 200 ml γλυκερόλη, 3 ml MgSO <sub>4</sub> 1 M. Τα KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> και MgSO <sub>4</sub> προστίθενται μετά την αποστείρωση του διαλύματος. Το διάλυμα διατηρείται και χρησιμοποιείται στους 4 °C                                                                                                           |
| <b>Luria-Bertani medium (LB broth) (1lt)</b> | 10 gr bacto-tryptone, 5 gr yeast extract, 10 gr NaCl. Για την παρασκευή στερεών καλλιιεργειών σε τρυβλία απαιτείται επιπλέον η προσθήκη 15 gr bacto-agar                                                                                                                                                                                                                   |

### 2.1.6 Διάλυση και αποθήκευση ενώσεων

Όλες οι ενώσεις (φυσικές και συνθετικές) διατηρούνται σε μορφή σκόνης στους -20 °C έως ότου διαλυτοποιηθούν. Όλες οι συνθετικές ενώσεις αλλά και η πλειονότητα των φυσικών ενώσεων διαλύονται στον οργανικό διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση 5 ή 10 mg/ml και φυλάσσονται στους -20 °C. Εξάιρεση αποτελούν οι ενώσεις NKUAMAR168 και NKUAMAR211 που διαλύονται σε διπλά αποστεγμένο νερό (double distilled water, ddH<sub>2</sub>O). Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες, η ένωση NKUAMAR168 διαλύεται σε τελική συγκέντρωση 2 mg/ml. Στα πειράματα για τον προσδιορισμό των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος, οι συνθετικές ενώσεις διαλυτοποιούνται αμέσως πριν την πραγματοποίηση του πειράματος.

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Χορήγηση εν δυνάμει ενεργοποιητών του πρωτεασώματος σε κύτταρα

Κάθε ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων σε νεαρούς, πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου (CPD < 35) για 2 ή 24 ώρες, ενώ τα κύτταρα-μάρτυρες (control) επωάζονται με το διαλύτη κάθε ουσίας (ddH<sub>2</sub>O ή DMSO). Πιο συγκεκριμένα, 5x10<sup>5</sup> κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία petri καλλιέργειας και 16 ώρες αργότερα προστίθενται νέο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας στο οποίο εμπεριέχεται η ένωση (φυσική ή συνθετική) σε διάφορες συγκεντρώσεις ή ο διαλύτης. Μετά το πέρας της χρονικής διάρκειας χορήγησης των ενώσεων και του διαλύτη, τα κύτταρα συλλέγονται και λύνονται για απομόνωση πρωτεϊνών. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προσδιορίζεται η βασική πρωτεασωμική ενεργότητα, αυτή της χυμοθρυψίνης CT-L, η οποία σχετίζεται με καθυστέρηση της κυτταρικής γήρανσης (Chondrogianni et al., 2005), είτε οι άλλες δύο πρωτεασωμικές ενεργότητες (ενεργότητα κασπάσης C-L και ενεργότητα θρυψίνης T-L).

### 2.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών για μέτρηση πρωτεολυτικής ενεργότητας πρωτεασώματος

Η απομόνωση πρωτεϊνών για τη μέτρηση ειδικών πρωτεολυτικών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος γίνεται με τη χρήση διαλύματος λύσης για ενεργότητες. Το διάλυμα αυτό σε συνδυασμό με τις ήπιες συνθήκες λύσης (όχι vortex, διατήρηση εκχυλισμάτων σε πάγο) εξασφαλίζει τη διατήρηση των απομονωμένων πρωτεϊνών στη φυσιολογική τους μορφή (native form) και κατ' επέκταση σε μορφή που είναι ενεργές και πλήρως λειτουργικές. Οι διαδικασίες που ακολουθούν πραγματοποιούνται σε πάγο.

#### 2.2.2.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Συνοπτικά:

1. Πλύσιμο κυττάρων με διάλυμα PBS για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
2. Θρυψινοποίηση των κυττάρων για 1 λεπτό στους 37 °C για αποκόλληση από το υπόστρωμα.
3. Προσθήκη θρεπτικού μέσου για απενεργοποίηση της θρυψίνης και συλλογή των αποκολλημένων κυττάρων.
4. Φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά και πλύσιμο ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS.
5. Φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά, αναδιάλυση ιζήματος σε διάλυμα λύσης για ενεργότητες πρωτεασώματος και ήπια ανακίνηση σε ρότορα για 30 λεπτά στους 4 °C. Αποφεύγεται η βίαιη ανάδευση (με τη χρήση vortex)

προκειμένου να αποφευχθεί η διάσπαση των διαφόρων πρωτεασωμικών συμπλόκων.

6. Φυγοκέντρωση στα 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
7. Συλλογή υπερκειμένου για προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεϊνών και μέτρηση πρωτεασωμικών ενεργοτήτων.

#### 2.2.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από πληθυσμό νηματωδών σκωλήκων *C. elegans*

Συνοπτικά:

1. Δημιουργία συγχρονισμένων πληθυσμών σκωλήκων. 50 ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα του επιθυμητού στελέχους αφήνονται να γεννήσουν αυγά για περίπου 3 ώρες σε NGM τρυβλία επιστρωμένα με UV-θανατωμένα βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση είτε τον οργανικό διαλύτη DMSO (control), ώστε να δημιουργηθούν συγχρονισμένοι πληθυσμοί ερμαφρόδιτων ατόμων. Τα ενήλικα ζώα στη συνέχεια απομακρύνονται και οι απόγονοι αφήνονται να μεγαλώσουν στους 20 °C έως το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξής τους.
2. Συλλογή σκωλήκων σε eppendorf με τη χρήση 1 ml παγωμένου διαλύματος M9.
3. Αφαίρεση υπερκειμένου όταν οι σκωλήκες καθιζάνουν στον πάτο του eppendorf.
4. Προσθήκη 1 ml παγωμένου διαλύματος M9.
5. Επανάληψη βημάτων 3-4 έως ότου απομακρυνθούν τα υπολείμματα της τροφής των σκωλήκων που έχουν παρασυρθεί κατά τη συλλογή τους.
6. Αφαίρεση υπερκειμένου, αναδιάλυση ιζήματος σε διάλυμα λύσης για ενεργό πρωτεασώματος και ήπια ανακίνηση σε ρότορα για 30 λεπτά στους 4 °C. Αποφεύγεται η βίαιη ανάδευση (με τη χρήση vortex). Σε περίπτωση μη λύσης των σκωλήκων, αυτή υποβοηθάτε με τη χρήση υπερήχων (sonication) για 5 λεπτά.
7. Φυγοκέντρωση στα 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
8. Συλλογή υπερκειμένου για προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεϊνών και μέτρηση πρωτεασωμικών ενεργοτήτων.

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

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν ακολουθείται η μέθοδος Bradford (MM, 1976) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης

απορρόφησης της χρωστικής από το 470 nm στα 595 nm. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα, συγκεκριμένος όγκος κάθε δείγματος υπό ανάλυση, αντιδρά με το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad) (σε αραιώση με ddH<sub>2</sub>O 1:5) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ταυτόχρονα, με το ίδιο αντιδραστήριο αντιδρούν και γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης [αλβουμίνη ορού βοός (Bovine serum albumin, BSA) σε ποσότητες 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 8 μg] για το ίδιο χρονικό διάστημα ώστε να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη. Η αντίδραση των πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Bradford δίνει προϊόν μπλε χρώματος που απορροφά στα 595 nm. Μετά την επώαση των δειγμάτων ακολουθεί φωτομέτρηση. Σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης και συγκέντρωσης της πρότυπης πρωτεΐνης και με βάση αυτή, υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για περίπου μία ώρα. Το αντιδραστήριο Bradford επηρεάζεται από υψηλές συγκεντρώσεις (1%) απορρυπαντικών, όπως Triton X-100 και SDS. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση πιάτου 96 βοθρίων (96-well plate).

#### 2.2.4 Μέτρηση της πρωτεολυτικής ενεργότητας του πρωτεασώματος

Οι ειδικές πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεασώματος (ενεργότητα χυμοθρυψίνης, ενεργότητα κασπάσης και ενεργότητα θρυψίνης) υπολογίζονται με βάση την υδρόλυση ειδικών φλουοροπεπτιδίων (fluorogenic peptides) (Kisselev & Goldberg, 2005). Χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτίδια Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) για τη μέτρηση ενεργότητας χυμοθρυψίνης (chymotrypsin proteasome activity, CT-L), Z-Leu-Leu-Glu-7-amino-4-methylcoumarin (Z-LLE-AMC) για τη μέτρηση ενεργότητας κασπάσης (caspase proteasome activity, C-L) και Boc-Leu-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Boc-LRR-AMC) για τη μέτρηση ενεργότητας θρυψίνης (trypsin proteasome activity, T-L). Τα πεπτίδια αυτά είναι ειδικά για τις ενζυμικές ενεργότητες των β<sub>5</sub>, β<sub>1</sub> και β<sub>2</sub> πρωτεασωμικών υπομονάδων, αντίστοιχα. Η μέτρηση της κάθε ενεργότητας γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Hepes pH 7.3, όπου προστίθενται σε συγκέντρωση 100 μM Suc-LLVY-AMC ή Z-LLE-AMC ή Boc-LRR-AMC σε αντίδραση τελικού όγκου 100 μl. Κατά τη διαδικασία της επώασης το κάθε φλουοροπεπτίδιο αναγνωρίζεται από την αντίστοιχη πρωτεασωμική ενεργότητα: το φλουοροπεπτίδιο Suc-LLVY-AMC από την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L proteasome activity) που βρίσκεται στην β<sub>5</sub> υπομονάδα, το Z-LLE-AMC από την ενεργότητα κασπάσης (C-L proteasome activity) που βρίσκεται στην β<sub>1</sub> υπομονάδα και το Boc-LRR-AMC από την ενεργότητα θρυψίνης (T-L proteasome activity) που βρίσκεται στην β<sub>2</sub> υπομονάδα. Προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η τιμή του φθορισμού που προκύπτει αφορά στην πρωτεασωμική ενεργότητα, για κάθε δείγμα παρασκευάζεται και δεύτερο πανομοιότυπο δείγμα όπου προστίθεται ο ειδικός αναστολέας του πρωτεασώματος MG132 σε τελική συγκέντρωση 20 μM (αρνητικός μάρτυρας). Η μέτρηση που λαμβάνεται από αυτό το δείγμα αφαιρείται από αυτήν που λαμβάνεται από το αντίστοιχο δείγμα όπου δεν έχει προστεθεί αναστολέας. Η διαφορά των τιμών αποτελεί την καθαρή μέτρηση που οφείλεται αποκλειστικά στη δράση του πρωτεασώματος. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται 0.01% (w/v) SDS (Tanaka et al., 1989). Η απελευθέρωση της 7-αμινο-

4-μεθυλο-κουμαρίνης (AMC) στο διάλυμα, η οποία προκύπτει μετά την πρωτεόλυσή της από το πρωτεάσωμα, μετريέται κάθε 5 λεπτά και για συνολικό διάστημα 30 λεπτών με τη χρήση του Safire<sup>2</sup> Multidetecation Microplate Reader (Tecan, Grodig, Austria) στους 37 °C. Το μήκος κύματος διέγερσης του AMC (excitation,  $\lambda_{ex}$ ) είναι 380 nm και το μήκος κύματος εκπομπής (emission,  $\lambda_{em}$ ) 460 nm. Η πρωτεασωμική ενεργότητα κάθε δείγματος προσδιορίζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) προς την αντίστοιχη πρωτεασωμική ενεργότητα του δείγματος-μάρτυρα (control), το οποίο ορίζεται αυθαίρετα ως το 100%. Για τον προσδιορισμό των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στα κύτταρα ή σε πληθυσμό σκωλήκων *C. elegans*, 10  $\mu$ g ολικών πρωτεϊνών επωάζονται παρουσία των φλουοροπεπτιδίων Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC ή Boc-LRR-AMC. Για την ταυτοποίηση ενώσεων ως πιθανών δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος, 0.5  $\mu$ g καθαρού, απομονωμένου, ανθρώπινου 20S πρωτεασώματος επωάζεται με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό έλεγχο ενώσεων.

### 2.2.5 Συνεχής καλλιέργεια κυττάρων παρουσία ενώσεων

Νεαροί, πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου ( $CPD \leq 30$ ) καλλιεργούνται συνεχώς παρουσία των ενώσεων ή του διαλύτη DMSO (control) έως ότου φθάσουν στο στάδιο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Συνοπτικά,  $55 \times 10^3$  κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα 6 βοθρίων (6-well plates) και 16 ώρες αργότερα προστίθενται νέο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας στο οποίο περιέχεται η ένωση (φυσική ή συνθετική) σε διάφορες συγκεντρώσεις (σε τριπλέτες) ή 0.1% DMSO (σε εξαπλέτα). Οι ενώσεις και ο διαλύτης DMSO παραμένουν διαρκώς στο μέσο της καλλιέργειας και κάθε δεύτερη ημέρα προστίθενται νέο καλλιεργητικό υλικό στα κύτταρα. Όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου το 90% του πυθμένα του βοθρίου, θρυψινοποιούνται και συλλέγονται σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει την ένωση ή το διαλύτη DMSO. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων εις διπλούν μέσω του Coulter Z2 Counter (Coulter Corporation) και προσδιορίζεται ο αριθμός διπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού με βάση το μαθηματικό τύπο:  $\log N / \log 2$ . Παράλληλα, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων και επιστρώνεται εκ νέου ο ίδιος αριθμός κυττάρων ( $55 \times 10^3$ ) σε καινούρια πιάτα 6 βοθρίων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται έως ότου τα κύτταρα φθάσουν στη μη αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού τους διπλασιασμού (αναδιπλασιαστική γήρανση).

### 2.2.6 Χρώση β-γαλακτοσιδάσης

Ο καλύτερος δείκτης μέχρι σήμερα για *in situ* ανίχνευση του φαινοτύπου της γήρανσης θεωρείται η χρώση σχετιζόμενη με την αναδιπλασιαστική γήρανση-β-γαλακτοσιδάση, SA-β-gal (G. P. Dimri et al., 1995). Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος 5-βρόμο-3ινδολ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal). Στα γηρασμένα κύτταρα, στα οποία αυξάνεται ο αριθμός και το μέγεθος των λυσοσωμάτων, το λυσοσωμικό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (που το βέλτιστο pH στο οποίο λειτουργεί είναι 4.0) διασπά το χρωμογόνο σε pH 6.0 στα γηρασμένα κύτταρα, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Δεδομένου ότι στα νεαρά κύτταρα δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των λυσοσωμάτων, δεν γίνεται ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου σε pH 6.0.

Συνοπτικά:

1.  $10^5$  κύτταρα τοποθετούνται σε πιάτα 6 βοθρίων (6-well plates).
2. 24 ώρες μετά τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS.
3. Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα μονιμοποίησης για 5 λεπτά.
4. Ξέπλυμα με διάλυμα PBS.
5. Επώση για 24 ώρες στους 37 °C παρουσία του διαλύματος χρώσης SA-β-γαλακτοσιδάσης απουσία CO<sub>2</sub>.
6. Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS.

Καταμετρούνται τα κύτταρα που δίνουν θετική χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης που εμφανίζεται ως μπλε χρώμα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που φέρουν την ενεργότητα του ενζύμου.

### 2.2.7 Scratch assay

Η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων που τους έχουν χορηγηθεί οι υπό έλεγχο ενώσεις ή ο διαλύτης DMSO (control) εκτιμάται με τη χρήση *in vitro* scratch assay, όπως έχει περιγραφεί από τους Liang και συνεργάτες (C.-C. Liang et al., 2007).

Συνοπτικά:

1.  $55 \times 10^3$  πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου που έχουν δεχθεί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους την επίδραση των ενώσεων ή του διαλύτη DMSO (control) τοποθετούνται σε πιάτα 6 βοθρίων (6-well plates).
2. Όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου το 100% του πυθμένα του βοθρίου, δημιουργείται μια «τεχνητή πληγή» (scratch) κατά μήκος του βοθρίου με τη χρήση ρύγχους πιπέτας τύπου P200. Κόκκινες σημάνσεις κατά μήκος της «τεχνητής πληγής» δημιουργούνται για την παρακολούθηση των ορίων της «τεχνητής πληγής» στα βοθρία εξέτασης.
3. Ξέπλυμα με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για αφαίρεση των κυτταρικών υπολειμμάτων.
4. Προσθήκη φρέσκου θρεπτικού μέσου καλλιέργειας που περιέχει την υπό έλεγχο ένωση ή το διαλύτη DMSO (control).
5. Παρακολούθηση των κυτταροκαλλιιεργειών έως ότου κλείσει το κενό (scratch) που έχει δημιουργηθεί. Οι φωτογραφίες λαμβάνονται 24 και 48 ώρες μετά τη δημιουργία της «τεχνητής πληγής».

### 2.2.8 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Όλη η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία (4 °C) προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα πρωτεόλυσης

των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Για τον ίδιο λόγο προστίθενται και αναστολείς πρωτεασών μέσα στα διαλύματα λύσης των πρωτεϊνών. Η απομόνωση πρωτεϊνών για τη διεξαγωγή ανοσοαποτυπώματος κατά Western (Western blot) γίνεται με τη χρήση διαλύματος Laemmli (Harlow & Lane, 1999). Με αυτή τη μέθοδο απομονώνονται ολικές πρωτεΐνες (total cell lysates) συμπεριλαμβανομένων και πρωτεϊνών που βρίσκονται μέσα σε μεμβράνες ή οργανίδια. Αυτό οφείλεται στη χρήση του SDS, ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Με την προσθήκη της διθειοθρεϊτόλης (DTT) ανάγονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη αρνητικό φορτίο, ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης.

Συγκεκριμένα:

1. Ξέπλυμα των κυττάρων που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα της φλάσκας ή του τρυβλίου καλλιέργειας με διάλυμα PBS για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
2. Θρυψινοποίηση των κυττάρων για 1 λεπτό στους 37 °C για αποκόλληση από το υπόστρωμα.
3. Προσθήκη θρεπτικού μέσου για απενεργοποίηση της θρυψίνης και συλλογή των αποκολλημένων κυττάρων.
4. Φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά και πλύσιμο ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS.
5. Φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά, αναδιάλυση ιζήματος σε διάλυμα Laemmli. Βρασμός σε θερμοκρασία 100 °C για 5 λεπτά.

Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από πληθυσμό νηματωδών σκωλήκων *C. elegans*, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.2 με τη διαφορά ότι η αναδιάλυση του ιζήματος πραγματοποιείται σε διάλυμα Laemmli.

Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C για μικρό χρονικό διάστημα, ενώ για μακροχρόνια αποθήκευση φυλάσσονται στους -80 °C.

### 2.2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο DC

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν με τη χρήση διαλύματος Laemmli ακολουθείται η μέθοδος DC σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε δύο χημικές αντιδράσεις που οδηγούν στην ανάπτυξη μπλε χρώματος: η πρώτη είναι η αντίδραση ιόντων χαλκού με πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον και η δεύτερη που αφορά την αντίδραση του σχηματιζόμενου συμπλόκου πρωτεϊνών-χαλκού με το αντιδραστήριο Folin. Η ανάπτυξη του χρώματος οφείλεται κυρίως στα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη και σε μικρότερο βαθμό στα αμινοξέα κυστεΐνη, κυστίνη και ιστιδίνη. Η ανάπτυξη μπλε χρώματος, με μέγιστη απορρόφηση στα 750 nm και ελάχιστη στα 405 nm,

δημιουργείται λόγω της επίδρασης των πρωτεϊνών στο αντιδραστήριο Folin, όπου το τελευταίο οδηγείται σε απώλεια ενός, δύο ή τριών ατόμων οξυγόνου. Ταυτόχρονα, με το ίδιο αντιδραστήριο αντιδρούν και γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης (BSA σε ποσότητες 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 1.5, 2 και 3  $\mu\text{g}$ ) για το ίδιο χρονικό διάστημα ώστε να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη. Οι γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης θα πρέπει να έχουν δημιουργηθεί με το ίδιο διάλυμα που πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των πρωτεϊνών των οποίων τη συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση πιάτου 96 βοθρίων (96-well plate).

Συγκεκριμένα:

1. Παρασκευή αντιδραστηρίου A' (reagent A') με προσθήκη 20  $\mu\text{l}$  αντιδραστηρίου S (reagent S) για κάθε 1 ml αντιδραστηρίου A (reagent A).
2. Προσθήκη 5  $\mu\text{l}$  από τις γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης και από τα υπό ανάλυση δείγματα σε αντίστοιχο βοθρίο.
3. Προσθήκη 25  $\mu\text{l}$  από το reagent A' σε κάθε βοθρίο.
4. Προσθήκη 200  $\mu\text{l}$  reagent B σε κάθε βοθρίο. Ήπια ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά.
5. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 750 nm.

Μετά τη φωτομέτρηση, σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης και συγκέντρωσης της πρότυπης πρωτεΐνης και με βάση αυτή, υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων. Το μπλε παραγόμενο χρώμα παραμένει σταθερό για περίπου μία ώρα.

## 2.2.10 SDS PAGE-Ανοσοαποτύπωση (Western blot)

### 2.2.10.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Τα πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκαν όπως έχουν περιγραφεί από τον Laemmli (Laemmli, 1970). Στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες έχουν αποκτήσει αρνητικό φορτίο λόγω της επίδρασης με το SDS και η κινητικότητά τους στην πηκτή πραγματοποιείται με βάση το μοριακό τους βάρος. Χρησιμοποιήθηκαν 12% αποδιατακτικά πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμιδίου. Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel) στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των πολυπεπτιδίων με βάση το μοριακό τους βάρος, προστίθεται το πήκτωμα συμπίεσης (6%) (stacking gel), το οποίο επιβραδύνει τη μετακίνηση των πρωτεϊνών από το θετικό προς τον αρνητικό πόλο προκειμένου να εξασφαλιστεί η ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδος όλων των πολυπεπτιδίων στο πήκτωμα διαχωρισμού. Το διάλυμα των πρωτεϊνών (συγκέντρωσης 15-20  $\mu\text{g}$ ) αναμιγνύεται με διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (loading buffer), θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 100 °C και φορτώνεται στην κορυφή κατακόρυφου αποδιατακτικού πηκτώματος 12% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει γλυκερόλη που υποβοηθά το

φόρτωμα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, SDS που αποδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες ώστε αυτές να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, και μπλε της βρωμοφαινόλης ώστε να διευκολύνεται τόσο το φόρτωμα των πρωτεϊνών όσο και η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα με τα δείγματα, φορτώνονται και δείκτες πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη προκειμένου να αναγνωρίζεται ευκολότερα (με βάση το αναμενόμενο μοριακό βάρος της) η υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση εφαρμόζοντας σταθερή τάση 150V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) και τα δείγματα μετακινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο για χρόνο ανάλογο του μοριακού βάρους των υπό μελέτη πρωτεϊνών και τη συγκέντρωση των πηκτωμάτων συμπίκνωσης και διαχωρισμού. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται μέσω του δείκτη πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών.

#### 2.2.10.2 Ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται με αποτύπωση σε μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση μίας ή περισσότερων πρωτεϊνών μέσω της ανίχνευσής τους με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την προς ανίχνευση πρωτεΐνη (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Το πήκτωμα τοποθετείται σε επαφή με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσα σε ειδική συσκευή που βρίσκεται σε ηλεκτρικό πεδίο με τη νιτροκυτταρίνη προς το θετικό πόλο και το πήκτωμα με τις πρωτεΐνες προς τον αρνητικό πόλο (δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες έχουν ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο λόγω του SDS). Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται μέσα σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) για 1 ώρα και 45 λεπτά σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης 400 mA. Μετά τη μεταφορά, οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έπειτα από χρώση για 1 λεπτό με διάλυμα Ponceau S υπό ανακίνηση. Με αυτόν τον τρόπο, ελέγχεται η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών επάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, καθώς και το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων. Πλήρης αποχρωματισμός της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται ύστερα από πλύση με διπλά απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια η μεμβράνη είναι έτοιμη για ανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών.

Τα βασικά στάδια για την ανίχνευση του επιτόπου της υπό μελέτη πρωτεΐνης με τη βοήθεια του αντισώματος ελέγχου είναι αρχικά η κατάληψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης (blocking) με κάποιο πρωτεϊνικό διάλυμα, η επώαση με το αντίσωμα-ελέγχου (πρωτογενές αντίσωμα ειδικά παρασκευασμένο να αναγνωρίζει συγκεκριμένο επίτοπο της υπό μελέτη πρωτεΐνης) και η επακόλουθη επώαση με ένα δευτερογενές αντίσωμα έναντι της συντηρημένης περιοχής Fc του αντισώματος-ελέγχου, το οποίο φέρει και κάποιο μόριο ιχνηθέτη. Στα συγκεκριμένα πειράματα ο ιχνηθέτης είναι το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP) που με το κατάλληλο υπόστρωμα δίνει αντίδραση χημειοφωταύγειας. Ανάλογα σε ποιον οργανισμό (ποντίκι, κουνέλι, κατσίκι) έγινε η ανάπτυξη του πρωτογενούς αντισώματος, καθορίζεται και το είδος του δευτερογενούς αντισώματος (anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat, αντίστοιχα).

#### Συνοπτικά:

1. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα blocking άπαχου γάλακτος 5% (w/v) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση.
2. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα (αντίσωμα-ελέγχου) διαλυμένο σε διάλυμα blocking για ~16 ώρες στους 4 °C, υπό ανακίνηση.
3. Πλύσιμο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης (Washing buffer), υπό ανακίνηση.
4. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα (ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε) διαλυμένο σε διάλυμα blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση.
5. Πλύσιμο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης (Washing buffer), υπό ανακίνηση.

Το σύμπλεγμα αντιγόνου (πρωτεΐνη υπό μελέτη)-αντισώματος γίνεται ορατό με τη χρήση του Clarity™ Western ECL substrate (Enhanced Chemiluminescence, ECL, Bio-Rad Laboratories) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συσκευασία περιέχει δύο αντιδραστήρια, το Α που περιέχει υπεροξείδιο, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο HRP και το Β που περιέχει λουμινόλη ως ενισχυτή για τη χημειοφωταύγεια. Τα αντιδραστήρια Α και Β αναμιγνύονται ισόποσα και προστίθενται στην επιφάνεια της μεμβράνης για 1 λεπτό. Η έκθεση της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε στο ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories) για χρόνο που εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης αλλά και από τα επίπεδα συγγένειάς της με το πρωτογενές αντίσωμα. Η πυκνομέτρηση των πρωτεϊνικών ζωνών στα ανοσοαποτυπώματα έγινε με τη χρήση του προγράμματος Image Lab software 6.1.0 built 7 (Bio-Rad Laboratories).

#### 2.2.10.3 Dot blot

Το dot blot είναι μια απλουστευμένη ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά δείγματα δε διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης, αλλά τοποθετούνται απευθείας επάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε κυκλικές θέσεις με τη χρήση ειδικών συσκευών με υποβοήθηση κενού για απομάκρυνση των υγρών και αποφυγή ανάμιξης των δειγμάτων. Στην παρούσα διατριβή, στα δείγματα που προορίζονταν για τη συγκεκριμένη τεχνική, η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση διαλύματος Laemmli χωρίς την παρουσία μπλε της βρωμοφαινόλης. 5 μg διαλύματος ολικής πρωτεΐνης τοποθετούνται απευθείας επάνω σε 0.2 μm μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσα στην κυκλική θέση ειδικής συσκευής dot blot 96 θέσεων. Ακολουθεί η εφαρμογή κενού και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφήνεται να στεγνώσει καλά. Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.10.2 για την

ανίχνευση του επιτόπου της υπό μελέτη πρωτεΐνης με τη βοήθεια του αντισώματος ελέγχου από τη διαδικασία του blocking.

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

Η κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχει γίνει μεταφορά πρωτεϊνών, είναι δυνατόν να επαναχρησιμοποιηθεί περισσότερες από μία φορές. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην περίπτωση που χρειάζεται να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων που μελετώνται ή όταν τα υπό μελέτη δείγματα είναι σπάνια και δεν υπάρχει η δυνατότητα να δημιουργηθούν πολλές πανομοιότυπες μεμβράνες λόγω περιορισμένης ποσότητάς τους. Στις παραπάνω περιπτώσεις, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επάνω στην οποία έχει ήδη γίνει ιχνηθέτηση με κάποιο αντίσωμα, υποβάλλεται στη διαδικασία αφαίρεσης του αντισώματος επωάζοντάς την σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη). Ακολουθούν πλύσεις προκειμένου να απομακρυνθούν από τη μεμβράνη οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται προκειμένου να αποκολληθούν τα αντισώματα από αυτήν και έπειτα είναι έτοιμη για επαναχρησιμοποίηση επωάζοντάς την με το αντίσωμα που μας ενδιαφέρει όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.10.2.

Συνοπτικά:

1. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης στους 65 °C για 30 λεπτά μέσα σε διάλυμα αφαίρεσης αντισωμάτων (Stripping buffer).
2. Πλύσιμο της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης (Washing buffer) υπό ανακίνηση.
3. Η αποτύπωση κατά Western μπορεί να επαναληφθεί από το σημείο της επώασης με το διάλυμα blocking.

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επαναχρησιμοποιούνται και ακολουθεί ανοσοαποτύπωση ανιχνεύοντας τα επίπεδα έκφρασης μιας πρωτεΐνης, τα επίπεδα της οποίας δεν αλλάζουν κατά τις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος (π.χ. ανάμεσα σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα). Ο έλεγχος αυτός έγινε με ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) στην περίπτωση των κυττάρων και της ακτίνης στην περίπτωση των νηματωδών σκωλήκων *C. elegans*.

#### 2.2.11 Μέτρηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Oxyblot)

Η μέτρηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών γίνεται μέσω ανίχνευσης των καρβονυλομάδων που εισάγονται επάνω στις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών κατά τις οξειδωτικές αντιδράσεις αυτών με O<sub>3</sub>, οξείδια του αζώτου ή κατά την οξείδωση που καταλύεται από μέταλλα (metal catalysed oxidation) (Stadtman, 1992). Η ανίχνευση αυτών των ομάδων γίνεται με τη βοήθεια του «OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit» σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, οι καρβονυλομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών αντιδρούν με 2,4-

δινιτροφαινολυοϋδραζίνη (DNPH) δίνοντας 2,4-δινιτροφαινολυοϋδραζόνη (DNP). Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται με ειδικά αντισώματα (anti-DNP) μέσω ανοσοαποτυπώματος. Από κάθε δείγμα παρασκευάζονται δύο ισόποσα δείγματα, όπου το ένα αποτελεί το δείγμα που θα υποστεί τη διαδικασία ανίχνευσης των καρβονυλομάδων, ενώ το δεύτερο αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα καθώς αντιδρά με 1x Derivatization-Control Solution αντί για 1x DNPH Solution. Από το κιτ παρέχονται τα αντιδραστήρια: DNPH Solution, Derivatization-Control Solution, Neutralization Solution, Anti-DNP πρωτογενές αντίσωμα, δευτερογενές αντίσωμα.

Συνοπτικά (οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται δίνονται για X μl πρωτεΐνης):

1. X μl από κάθε δείγμα αναμειγνύονται με X μl 12% SDS ώστε η τελική συγκέντρωση αυτού να είναι 6%.
2. Το μείγμα υφίσταται την αντίδραση υποκατάστασης από DNP (derivatization) κατά την αντίδραση αυτού με 2X μl 1X DNPH Solution. Στον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα προστίθενται 2X μl 1x Derivatization-Control Solution.
3. Επώαση και των δύο μειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά (όχι πάνω από 30 λεπτά διότι μπορεί να πραγματοποιηθούν άλλες πλευρικές αντιδράσεις που θα αλλοιώσουν το αποτέλεσμα).
4. Προσθήκη 1.5X μl Neutralization Solution και στα δύο μείγματα ώστε να σταματήσουν οι αντιδράσεις.

Τα δείγματα είναι έτοιμα για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και ανοσοαποτύπωση. Ωστόσο, η αντίδραση κάλυψης των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης (blocking) πραγματοποιείται σε Blocking/Dilution Buffer που περιέχει BSA αντί για άπαχο γάλα. Το πρωτογενές (anti-DNP) και το δευτερογενές αντίσωμα διαλύονται σε Blocking/Dilution Buffer σε αραιώσεις 1:150 και 1:300, αντίστοιχα. Το Dilution Buffer περιέχει PBS και 0.05% Tween-20.

Το αντίσωμα που ανιχνεύει οξειδωμένες πρωτεΐνες μπορεί να δώσει σήμα σε διάφορα μοριακά βάρη δεδομένου ότι υπάρχει δυνατότητα οξείδωσης οποιασδήποτε πρωτεΐνης βρίσκεται στα κύτταρα.

#### 2.2.12 Μέτρηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS assay)

Η μέτρηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) στους πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου πραγματοποιείται με τη χρήση του φθορίζοντα δείκτη 2',7'-διχλωροφλουορεσκίνη (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA). Οι χημικά ανηγμένες ή ακετυλιωμένες μορφές της 2',7'-διχλωροφλουορεσκίνης είναι μη φθορίζουσες, μέχρις ότου η ομάδα του οξικού απομακρυνθεί από οξειδωτικές αντιδράσεις. Η αύξηση του φθορισμού η οποία οφείλεται στην οξείδωση αυτού του δείκτη καταμετράται με τη χρήση φωτομέτρου (Rosenkranz et al., 1992). Η χρωστική αυτή είναι φωτοευαίσθητη και γι' αυτό και πρέπει να χρησιμοποιείται υπό

συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθείται για την εκτίμηση των επιπέδων ROS μέσω της 2',7'-δихλωροφλουορεσκίνης είναι η εξής:

1.  $5 \times 10^5$  πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου επιστρώνονται σε τρυβλία petri καλλιέργειας.
2. 24 ώρες αργότερα προστίθενται θρεπτικό μέσο καλλιέργειας που περιέχει την ένωση ή το διαλύτη (control) και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες.
3. Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS, θρυψινοποίηση και φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε προθερμασμένο διάλυμα PBS, που περιέχει τη χρωστική σε τελική συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  (διάλυμα φόρτωσης/loading buffer).
5. Επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά. Φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
6. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε προθερμασμένο πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά.

Η απορρόφηση και η εκπομπή του οξειδωμένου προϊόντος μετρούνται αντίστοιχα στα μήκη κύματος 493 και 520 nm.

Γενικά, οι υψηλότερες τιμές φθορισμού αντιστοιχούν σε αυξημένα επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου. Παράλληλα με τα εξεταζόμενα δείγματα πρέπει να υπάρχουν και δείγματα-μάρτυρες που να αποδεικνύουν την αξιοπιστία της μεθόδου. Έτσι, θα πρέπει να μετράται ο αυτοφθορισμός των μη-βαμμένων με τη χρωστική κυττάρων. Επίσης, είναι σημαντικό να εκτιμηθεί ο φθορισμός που πιθανά παρουσιάζουν το πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και το διάλυμα PBS που χρησιμοποιούνται. Κατά κανόνα, σε υγιή κύτταρα οι παραγόμενες ρίζες οξυγόνου περιορίζονται σημαντικά από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Ο φθορισμός που παρουσιάζουν τα μη-βαμμένα κύτταρα είναι γενικά χαμηλός και παραμένει σταθερός κατά τη διάρκεια του πειράματος. Εντούτοις, είναι πιθανό να παρατηρηθεί μία σταδιακή αύξηση, λόγω αυτο-οξείδωσης, ή μείωση, λόγω απώλειας της χρωστικής από τα κύτταρα.

### 2.2.13 Δοκιμές οξειδωτικού στρες

#### 2.2.13.1 Επίδραση με $\text{H}_2\text{O}_2$ σε κύτταρα

Η κυτταρική επιβίωση εκτιμήθηκε μέσω καταμέτρησης των ζωντανών κυττάρων μετά από έκθεση σε 250 ή 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  για 2 ή 3 ώρες, αντίστοιχα. Συνοπτικά,  $10^4$  πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου επιστρώνονται σε πιάτα 6 βοθρίων (6-well plates) και 24 ώρες μετά χορηγούνται οι ενώσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ή ο διαλύτης DMSO (control) για 0, 2 ή 24 ώρες. Τα κύτταρα ακολούθως επωάζονται με  $\text{H}_2\text{O}_2$  παρουσία της ένωσης ή του διαλύτη DMSO και έπειτα ξεπλένονται με PBS. Τα κύτταρα είτε μετρούνται αμέσως μετά για την εκτίμηση της κυτταρικής επιβίωσης είτε αφήνονται να ανακάμψουν σε πλήρες θρεπτικό μέσο

καλλιέργειας παρουσία της ένωσης ή του διαλύτη DMSO για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Η καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται σε τριπλέτες χρησιμοποιώντας το μετρητή κυττάρων Coulter Z2 Counter.

#### *2.2.13.2 Επίδραση με παράγοντες οξειδωτικού στρες σε κύτταρα*

Πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου υποβάλλονται σε διάφορους παράγοντες οξειδωτικού στρες παρουσία των ενώσεων ή του διαλύτη DMSO (control). Ειδικότερα,  $10^4$  κύτταρα επιστρώνονται σε πιάτα 6 βοθρίων (6-well plates) και 24 ώρες μετά τους χορηγούνται οι ενώσεις ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Μετά το πέρας των 24 ωρών, τα κύτταρα δέχονται την επίδραση διαφόρων παραγόντων οξειδωτικού στρες για δυόμιση (2,5) ώρες με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας των ενώσεων ή του διαλύτη DMSO. Στη συνέχεια, ξεπλένονται με διάλυμα PBS και αφήνονται να ανακάμψουν για διάστημα επτά ημερών παρουσία των ενώσεων ή του διαλύτη DMSO στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με ανανέωση του μέσου καλλιέργειας ανά δύο ημέρες. Μετά το πέρας των επτά ημερών, πραγματοποιείται καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε τριπλέτες χρησιμοποιώντας το μετρητή κυττάρων Coulter Z2 Counter. Οι παράγοντες οξειδωτικού στρες στους οποίους υποβάλλονται τα κύτταρα είναι: 100 ή 300  $\mu\text{M}$  υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 1 ή 2% αιθανόλη (EtOH) και τριγλωριούχος σίδηρος 0.1 mM  $\text{FeCl}_3$  παρουσία ADP (0.5 mM) και L-ασκορβικού οξέος (25 mM) (metal catalyzed oxidation) (Chondrogianni et al., 2005).

#### **2.2.14 Μέτρηση της ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD**

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase, SOD) ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1.  $55 \times 10^5$  πρωτογενείς, εμβρυϊκοί HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου επιστρώνονται σε τρυβλία petri καλλιέργειας.
2. 24 ώρες αργότερα προστίθενται θρεπτικό μέσο καλλιέργειας που περιέχει την ένωση ή το διαλύτη (control) και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες.
3. Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS, θρυψινοποίηση και συλλογή των αποκολλημένων κυττάρων.
4. Φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά και πλύσιμο ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS.
5. Φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά, αναδιάλυση ιζήματος σε κρύο διάλυμα λύσης RIPA ενισχυμένο με αναστολείς πρωτεασών.
6. Λύση των κυττάρων με τη βοήθεια υπερήχων (sonication) για 5 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Συλλογή υπερκλειμένου για προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο DC.
9. Προσαρμογή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των δειγμάτων σε 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  για κάθε δείγμα.
10. Προσθήκη 25  $\mu\text{l}$  από κάθε δείγμα (10  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης) σε δύο βοηθία πιάτου 96 βοηθίων (96-well plate).
11. Προσθήκη 107.5  $\mu\text{l}$  16 mM Tris-HCl pH 8.0, 12.5  $\mu\text{l}$  300  $\mu\text{M}$  nitroblue tetrazolium chloride (NBT), 12.5  $\mu\text{l}$  468  $\mu\text{M}$  NADH και 12.5  $\mu\text{l}$  60  $\mu\text{M}$  phenazine methosulfate (PMS) (Sample).
12. Επανάληψη του βήματος 10 απουσία 12.5  $\mu\text{l}$  60  $\mu\text{M}$  phenazine methosulfate (PMS) (Sample').
13. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος (blank) ακολουθούνται τα βήματα 9-11 με τη διαφορά της προσθήκης 25  $\mu\text{l}$  διαλύματος λύσης RIPA αντί δείγματος.
14. Επώαση του πιάτου 96 βοηθίων για 10 λεπτά σε σκοτάδι.
15. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 560 nm.

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας SOD κάθε δείγματος χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:  $[(A0-A1)/A0] \times 100$ , όπου A0 είναι η απορρόφηση του τυφλού δείγματος (blank), A1 η απορρόφηση του δείγματος Sample αφαιρώντας την απορρόφηση του δείγματος Sample'.

#### **2.2.15 Δοκιμασία κηλίδωσης με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet assay)**

Για την εκτίμηση της ζωτικότητας και της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων ακολουθείται η δοκιμασία κηλίδωσης με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet assay) (Feoktistova et al., 2016). Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η

χρωστική crystal violet προσδένεται στις πρωτεΐνες και στο DNA των ζωντανών προσκολλημένων κυττάρων, όπου με προσθήκη οξικού οξέος η χρωστική μωβ χρώματος απελευθερώνεται στο υπερκείμενο και καταμετράται με τη χρήση φωτόμετρου στα 595 nm. Αντιθέτως, τα νεκρά κύτταρα χάνουν την ικανότητα προσκόλλησής τους στο υπόστρωμα και κατ' επέκταση απομακρύνονται από τον κυτταρικό πληθυσμό μειώνοντας την ποσότητα της χρωστικής crystal violet και άρα την οπτική της απορρόφηση.

Συγκεκριμένα:

1.  $2 \times 10^3$  κύτταρα επιστρώνονται σε πενταπλέτες σε πιάτα 96 βοθρίων (96-well plates) παρουσία 150  $\mu$ l θρεπτικού μέσου καλλιέργειας που περιέχει την υπό εξέταση ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση ή τον οργανικό διαλύτη DMSO (control) και επώάζονται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και CO<sub>2</sub> 5% για χρονικό διάστημα που απαιτεί η διαδικασία του εκάστοτε πειράματος.
2. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, πλύση μία φορά με διάλυμα PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% παραφορμαλδεΐδη για 20 λεπτά.
3. Απομάκρυνση της παραφορμαλδεΐδης και προσθήκη 100  $\mu$ l διαλύματος 0.2% κρυσταλλικού ιώδους διαλυμένο σε διπλά απεσταγμένο νερό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Πλύση των βοθρίων 3 φορές με 300  $\mu$ l νερό.
5. Καλή απομάκρυνση του νερού από τα βοθρία και επώαση με διάλυμα 30% οξικού οξέος για 20 λεπτά ώστε να απελευθερωθεί η χρωστική στο υπερκείμενο.
6. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm.

#### 2.2.16 Χορήγηση των ενώσεων στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*

Για την έκθεση των σκωλήκων *C. elegans* στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων, χρησιμοποιούνται NGM τρυβλία επιστρωμένα με *E. coli* OP-50, όπου τα βακτήρια έχουν θανατωθεί έπειτα από έκθεση των τρυβλίων σε υπεριώδη ακτινοβολία για 10 λεπτά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ώστε να αποφευχθούν οι παρενέργειες από το μεταβολισμό των ενώσεων από τα ζωντανά βακτήρια *E. coli* OP-50. Ακολουθώντας, στα τρυβλία τοποθετούνται 100  $\mu$ l μείγματος M9 και ένωσης/διαλύτη ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση της ένωσης στο τρυβλίο, αλλά και η σταθερή ποσότητα διαλύτη μεταξύ των τρυβλίων (DMSO < 0.1%) (Frankowski et al., 2013; X. Wang et al., 2010). Σημειώνεται ότι ο τελικός όγκος NGM στο τρυβλίο είναι 8 ml.

### 2.2.17 Δοκιμασία παράλυσης των σκωλήκων (Paralysis assay)

Για τις δοκιμασίες παράλυσης (paralysis assay) χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό στέλεχος του *C. elegans* CL4176 που αποτελεί οργανισμό-μοντέλο για την AD. Τα ζώα αυτού του στελέχους φέρουν ένα διαγονίδιο το οποίο αποτελείται από το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίο υπό έναν υποκινητή που οδηγεί την έκφρασή του στους μύες. Η αλληλουχία του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου ακολουθείται από μία ειδικά σχεδιασμένη 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) η οποία αποσταθεροποιεί το mRNA του Αβ<sub>1-42</sub> και το οδηγεί σε αποικοδόμηση. Μία θερμοευαίσθητη μεταλλαγή σε ένα από τα γονίδια (*smg-1*) που μεσολαβεί την αποικοδόμηση των mRNAs που φέρουν παρόμοια 3'UTRs, επιτρέπει τη μετάφραση του mRNA σε περιοριστική θερμοκρασία. Εκμεταλλευόμενοι αυτή τη θερμοευαίσθητη μεταλλαγή στο *smg-1* δε γίνεται μετάφραση του Αβ<sub>1-42</sub> mRNA στο στέλεχος CL4176 σε χαμηλή θερμοκρασία (16°C), ενώ αυτή επιτρέπεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (25°C) όπου το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του *smg-1* δε μπορεί να αποικοδομήσει το mRNA. Επομένως, στους 16°C τα στελέχη δεν εκφράζουν καθόλου ή μόνο μικρές ποσότητες Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου, ενώ στους 25°C το mRNA δεν αποικοδομείται και το πεπτιδίο είναι ανιχνεύσιμο, δημιουργούνται β-αμυλοειδείς δομές που συσσωρεύονται στα μυϊκά κύτταρα και το ζώο σταδιακά παραλύει (Link et al., 2003).

Για τη δοκιμασία παράλυσης των διαγονιδιακών σκωλήκων CL4176, 50 ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα αφήνονται να γεννήσουν αυγά για 2-3 ώρες σε ένα NGM τρυβλίο επιστρωμένο με θανατωμένα με υπερϊώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση είτε τον οργανικό διαλύτη DMSO (control), ώστε να δημιουργηθούν συγχρονισμένοι πληθυσμοί ερμαφρόδιτων ατόμων. Τα ενήλικα ζώα στη συνέχεια απομακρύνονται και οι απόγονοι αφήνονται να μεγαλώσουν στους 16 °C για 48 ώρες. Έπειτα, οι συγχρονισμένοι πληθυσμοί ατόμων (300-600 σκώληκες ανά συνθήκη πειράματος) μεταφέρονται στους 25 °C και 24 ώρες αργότερα τα ζώα εξετάζονται ανά μία ώρα για την ικανότητα τους να κινούνται. Οι σκώληκες χαρακτηρίζονται ως παράλυτοι εάν παρουσιάζουν γύρω από το κεφάλι τους ένα χαρακτηριστικό «στεφάνι» (halo) που σχηματίζεται επάνω στην θανατωμένη βακτηριακή χλόη ή εάν αποτύχουν να μεταδώσουν την κίνηση στο κατώτερο μισό μέρος του σώματός τους. Τα άτομα που πέθαναν, τα άτομα που εκκολάφθηκαν μέσα στο σώμα τους τα αυγά τους, εκείνα που παρουσίασαν προεξέχων γεννητικό πόρο (το σημείο από το οποίο γεννούν τα αυγά τους, vulva), είτε αποξηράθηκαν γιατί είχαν σκαρφαλώσει στα τοιχώματα του τρυβλίου, θεωρούνται «censored» και ενσωματώνονται διαφορετικά στα αποτελέσματα. Ο αριθμός N στις εικόνες των πειραμάτων απεικονίζει τον αριθμό των ατόμων που παρέλυσαν σε σχέση με το συνολικό αριθμό των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν (άτομα που παρέλυσαν υπό φυσιολογικές συνθήκες και άτομα που συμπεριλήφθηκαν διαφορετικά στην ανάλυση λόγω μη φυσιολογικών συνθηκών). Για την εκτίμηση των διαφορών στην παράλυση των ζώων και τον καθορισμό των p-values πραγματοποιείται η στατιστική ανάλυση log-rank (Mantel-Cox) test. Ως μέσος χρόνος παράλυσης θεωρείται το χρονικό διάστημα μέχρι την ώρα όπου το 50% των σκωλήκων του συνολικού πληθυσμού έχει παραλύσει.

### 2.2.18 Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης για την εκτίμηση των Αβ συσσωματωμάτων *in vivo*

Για τη μέτρηση και οπτικοποίηση των Αβ συσσωματωμάτων *in vivo*, χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό στέλεχος του *C. elegans* CL2331 που αποτελεί οργανισμό-μοντέλο για την AD. Τα ζώα που ανήκουν στο στέλεχος αυτό, εκφράζουν στα μυϊκά τους κύτταρα το ανθρώπινο Αβ<sub>3-42</sub> πεπτιδίο συζευγμένο με GFP. Τα διαγονιδιακά ζώα διατηρούνται στους 16 °C, ενώ αύξηση της θερμοκρασίας στους 20 °C οδηγεί στη συσσωμάτωση του Αβ<sub>3-42</sub> πεπτιδίου (Link et al., 2008), η οποία μπορεί να παρατηρηθεί με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης.

Για τη μέτρηση των Αβ συσσωματωμάτων στους σκώληκες του διαγονιδιακού στελέχους CL2331, 50 ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα αφήνονται να γεννήσουν αυγά για 2-3 ώρες σε ένα NGM τρυβλίο επιστρωμένο με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση είτε τον οργανικό διαλύτη DMSO (control), ώστε να δημιουργηθούν συγχρονισμένοι πληθυσμοί ερμαφρόδιτων ατόμων. Τα ενήλικα ζώα στη συνέχεια απομακρύνονται και οι απόγονοι αφήνονται να μεγαλώσουν στους 16 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια μεταφέρονται στους 20 °C μέχρι να φθάσουν το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης για την παρατήρησή τους (L4 stage, Day 1 of adulthood). Οι διαγονιδιακοί σκώληκες αναισθητοποιούνται με τη χρήση 100 mM λεβαμιζόλης (levamisole) επάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα επιστρωμένη με ένα λεπτό στρώμα πηκτώματος αгарόζης 2%. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης GFP (και κατ' επέκταση η παρουσία συσσωματωμάτων Αβ<sub>3-42</sub> πεπτιδίου) καταγράφεται μετά από την παρατήρηση αναισθητοποιημένων ζώων με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης Leica TSC SPE confocal laser scanning microscope (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany). Οι ρυθμίσεις του μικροσκοπίου παρέμεναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Για τη λήψη των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα LAS AF software. Οι εικόνες εστιάζονται στην μπροστινή περιοχή των σκωλήκων και ελήφθησαν με τον φακό 20/0.70. Η ανάλυση των φωτογραφιών έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ 1.53k (Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA). Ο αριθμός N στις εικόνες των πειραμάτων απεικονίζει τον αριθμό των ατόμων που παρατηρήθηκαν και συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση.

### 2.2.19 Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης για την εκτίμηση της Αβ νευροτοξικότητας *in vivo*

Για την εκτίμηση της Αβ-νευροτοξικότητας, χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό στέλεχος του *C. elegans* UA198 (Griffin et al., 2018, 2019). Τα ζώα που ανήκουν στο στέλεχος αυτό εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίο στους γλουταματεργικούς νευρώνες τους συζευγμένο με GFP. Οι πέντε (5) γλουταματεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στην οπίσθια περιοχή και συγκεκριμένα στην ουρά των διαγονιδιακών αυτών ζώων μετρούνται για την εκτίμηση του νευροεκφυλισμού που προκαλείται λόγω της ύπαρξης του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. Οι 5 οπίσθιοι γλουταματεργικοί νευρώνες έχουν επιλεγεί μεταξύ των υπολοίπων καθώς είναι ανατομικά διακριτοί, μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν και να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, ενώ

επίσης αρχίζουν να παρουσιάζουν σταδιακό εκφυλισμό νωρίς στη ζωή των διαγονιδιακών σκωλήκων.

Για την εκτίμηση της Αβ νευροτοξικότητας στους σκώληκες του διαγονιδιακού στελέχους UA198, 50 ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα αφήνονται να γεννήσουν αυγά για περίπου 3 ώρες σε ένα NGM τρυβλίο επιστρωμένο με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση είτε τον οργανικό διαλύτη DMSO (control), ώστε να δημιουργηθούν συγχρονισμένοι πληθυσμοί ερμαφρόδιτων ατόμων. Τα ενήλικα ζώα στη συνέχεια απομακρύνονται και οι απόγονοι αφήνονται να μεγαλώσουν στους 20 °C έως το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης τους (Day 1, 5, 6 of adulthood). Οι διαγονιδιακοί σκώληκες αναισθητοποιούνται με τη χρήση 100 mM λεβαμιζόλης (levamisole) επάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα επιστρωμένη με ένα λεπτό στρώμα πηκτώματος αгарόζης 2%. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης GFP (και κατ' επέκταση η ύπαρξη των γλουταματεργικών νευρώνων) καταγράφεται μετά από την παρατήρηση αναισθητοποιημένων ζώων με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης Leica TSC SPE confocal laser scanning microscope (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany). Για κάθε πείραμα παρατηρήθηκαν τουλάχιστον 25 σκώληκες ανά συνθήκη. Ένα ζώο θεωρείται ότι είναι φυσιολογικό εάν έχει και τους πέντε γλουταματεργικούς νευρώνες στην περιοχή της ουράς του χωρίς να παρατηρούνται σε αυτούς δυσμορφίες. Στη συνέχεια, για κάθε συνθήκη, υπολογίστηκε το ποσοστό των φυσιολογικών ατόμων προς το συνολικό αριθμό των ατόμων που παρατηρήθηκαν. Για τη λήψη των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα LAS AF software. Οι ρυθμίσεις του μικροσκοπίου παρέμεναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι εικόνες εστιάζονται στην οπίσθια περιοχή των σκωλήκων και ελήφθησαν με τον φακό 40/1.15. Η ανάλυση των φωτογραφιών έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ 1.53k (Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA).

#### **2.2.20 Απόκριση των σκωλήκων σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα (Mechanosensation)**

Για την εκτίμηση της ανταπόκρισης των σκωλήκων σε ήπιο μηχανικό ερέθισμα (gentle touch) 50 ενήλικα ερμαφρόδιτα διαγονιδιακά ζώα του στελέχους UA198 αφήνονται να γεννήσουν αυγά για περίπου 3 ώρες σε ένα NGM τρυβλίο επιστρωμένο με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση είτε τον οργανικό διαλύτη DMSO (control), ώστε να δημιουργηθούν συγχρονισμένοι πληθυσμοί ερμαφρόδιτων ατόμων. Τα ενήλικα ζώα στη συνέχεια απομακρύνονται και οι απόγονοι αφήνονται να μεγαλώσουν στους 20 °C έως το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης τους (Day 1, 5 of adulthood). Έπειτα μεμονωμένα άτομα μεταφέρονται σε NGM τρυβλίο απουσία *E. coli* OP-50 και αγγίζονται ελαφρώς με τη χρήση τρίχας (βλεφαρίδας ή τρίχας φρυδιού αποστειρωμένης εμβαπτίζοντάς την σε 70% αιθανόλη) κολλημένης στο άκρο μιας οδοντογλυφίδας. Το άγγιγμα γίνεται ακουμπώντας ελαφρώς την τρίχα στο σώμα του ζώου κοντά στην περιοχή της έδρας στην ουρά. Πραγματοποιούνται 5 αγγίγματα σε κάθε ζώο απόστασης μεταξύ τους 30 δευτερολέπτων, ώστε να αποφευχθεί η εξοικείωση των σκωλήκων στο άγγιγμα. Τα ζώα δεν πρέπει να αγγίζονται με την άκρη της τρίχας, καθώς αυτό παρέχει ισχυρότερο

ερέθισμα και μερικές φορές μπορεί να προκαλέσει αντίδραση, ακόμη και σε ζώα που δεν έχουν ευαισθησία στο ήπιο μηχανικό ερέθισμα. Θετική ανταπόκριση στο ερέθισμα που προκαλείται από την τρίχα (ζώα ευαίσθητα στο ήπιο μηχανικό ερέθισμα) θεωρείται εάν οι σκώληκες σταματήσουν την κίνησή τους προς την τρίχα ή κινηθούν μακριά από αυτήν (Chalfie et al., 2014). Έπειτα, οι σκώληκες επιστρέφονται στο αρχικό NGM τρυβλίο. Για κάθε πείραμα παρατηρήθηκαν τουλάχιστον 30 σκώληκες ανά συνθήκη. Για κάθε μεμονωμένο διαγονιδιακό ζώο, υπολογίστηκε το ποσοστό των θετικών ανταποκρίσεων προς το συνολικό αριθμό των ερεθισμάτων που δέχτηκε (που ήταν συνολικά 5) (Griffin et al., 2019).

#### **2.2.21 Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής των σκωλήκων (Lifespan assay)**

Για τον έλεγχο του προσδόκιμου ζωής των σκωλήκων (lifespan assay) (Wilkinson et al., 2012), 40 ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα αγρίου τύπου N2 αφήνονται να γεννήσουν αυγά για περίπου 2 ώρες σε ένα NGM τρυβλίο επιστρωμένο με *E. coli* OP50 βακτήρια, ώστε να δημιουργηθούν συγχρονισμένοι πληθυσμοί ερμαφρόδιτων ατόμων. Τα ενήλικα ζώα στη συνέχεια απομακρύνονται και οι απόγονοι αφήνονται να μεγαλώσουν στους 20 °C. Όταν οι σκώληκες φθάσουν στο τέταρτο προνυμφικό στάδιο L4, 130-150 άτομα διαμοιράζονται σε 4 - 5 NGM τρυβλία και αποτελούν τον πληθυσμό του πειράματος. Η ημέρα τοποθέτησης των L4 σκωλήκων στα NGM τρυβλία θεωρήθηκε ως ημέρα 0 του πειράματος. Οι σκώληκες μεγαλώνουν σε NGM τρυβλία επιστρωμένα με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 στους 20 °C που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση στην επιθυμητή συγκέντρωση, ενώ οι σκώληκες που αποτελούν το μάρτυρα του πειράματος αναπτύσσονται σε NGM τρυβλία παρουσία του οργανικού διαλύτη DMSO (control). Τα ζώα μεταφέρονται ανά 2 ημέρες σε καινούρια τρυβλία για αποφυγή πείνας και κατανάλωση μόνο φρέσκου βακτηριακού θρεπτικού υλικού και της υπό έλεγχο ένωσης. Οι συχνές μεταφορές εξυπηρετούν ώστε να αποφεύγονται τυχόν επιμολύνσεις από βακτήρια άλλου στελέχους ή από μύκητες που μπορεί να επηρεάσουν την έκβαση του πειράματος, αλλά και να μην αναμιχθούν οι αρχικοί πληθυσμοί με τους απογόνους τους. Η μεταφορά γίνεται με pick, με τη βοήθεια του οποίου μεταφέρεται κάθε ένα ζώο χωριστά. Τα ζώα εξετάζονται κάθε ημέρα για την ικανότητα τους να κινούνται και να τρέφονται μέχρι και το θάνατό τους. Στα τελευταία στάδια όπου η κινητικότητα τους έχει ελαττωθεί, τα ζώα ελέγχονται για την ικανότητα ανταπόκρισης σε εξωτερικό μηχανικό ερέθισμα (αντίδραση κατά την επαφή με το pick). Τα άτομα που πέθαναν λόγω των αυγών που εκκολάφθηκαν μέσα στο σώμα τους, λόγω προεξέχοντα γεννητικού πόρου (το σημείο από το οποίο γεννούν τα αυγά τους, vulva), λόγω αποξήρανσης γιατί είχαν σκαρφαλώσει στα τοιχώματα του τρυβλίου ή λόγω κακού χειρισμού, θεωρούνται «censored» και ενσωματώνονται διαφορετικά στα αποτελέσματα. Ο αριθμός N στις εικόνες των πειραμάτων απεικονίζει τον αριθμό των ατόμων που πέθαναν σε σχέση με το συνολικό αριθμό των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν (άτομα που πέθαναν υπό φυσιολογικές συνθήκες και άτομα που συμπεριλήφθηκαν διαφορετικά στην ανάλυση λόγω μη φυσιολογικών συνθηκών). Για την εκτίμηση των διαφορών στην επιβίωση των ζώων και τον καθορισμό των p-values πραγματοποιείται η στατιστική ανάλυση log-rank (Mantel-Cox) test. Ως μέση διάρκεια

ζωής θεωρείται το χρονικό διάστημα μέχρι την ημέρα όπου το 50% των σκωλήκων του συνολικού πληθυσμού έχει πεθάνει.

### 2.2.22 Φαινοτυπική ανάλυση των σκωλήκων

Για όλες τις φαινοτυπικές αναλύσεις χρησιμοποιείται το αγρίου τύπου στέλεχος N2 του *C. elegans*. Πιο συγκεκριμένα, περίπου 40-50 ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα αφήνονται να γεννήσουν αυγά για περίπου 20-30 λεπτά σε NGM τρυβλία επιστρωμένα με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση είτε το διαλύτη (control). Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, τα ενήλικα ερμαφρόδιτα ζώα απομακρύνονται από τα τρυβλία και οι απόγονοι παρατηρούνται για τα παρακάτω φαινοτυπικά χαρακτηριστικά:

*Μέτρηση φαρυγγικού παλμού (pharyngeal pumping)*: Την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων (Day 1 of adulthood) καταμετράται ο ρυθμικός παλμός των μυών του φάρυγγα για χρονικό διάστημα 60 δευτερολέπτων (Raizen et al., 2012). Μετρούνται συνολικά 50 ζώα ανά συνθήκη.

*Μέτρηση του χρόνου μεταξύ δύο διαδοχικών κενώσεων (defecation assay)*: Την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων (Day 1 of adulthood) καταμετράται το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο διαδοχικών κενώσεων που πραγματοποιούν οι σκώληκες (Hart, 2006). Μετρούνται συνολικά 50 ζώα ανά συνθήκη.

*Αναπτυξιακός ρυθμός (developmental timing)*: οι απόγονοι παρατηρούνται συχνά ώστε να καταγραφεί ο χρόνος που απαιτείται από την εκκόλαψη των αυγών έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης των σκωλήκων L4 (Filippopoulou et al., 2017; Papaevgeniou et al., 2016, 2019).

*Γονιμότητα (fecundity assay)*: Μεμονωμένα άτομα στο τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους L4 μεταφέρονται σε NGM τρυβλία επιστρωμένα με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση είτε το διαλύτη (control). Κάθε ζώο μεταφέρεται σε νέο NGM τρυβλίο κάθε δεύτερη ημέρα. Οι απόγονοί του μετρούνται σε κάθε NGM τρυβλίο μετά την εκκόλαψη των αυγών και όταν οι σκώληκες φτάσουν στο δεύτερο ή στο τρίτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L2 ή L3). Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν τα αρχικά επιλεγμένα άτομα σταματήσουν να γεννούν αυγά (Filippopoulou et al., 2017; Papaevgeniou et al., 2016, 2019).

*Μετάβαση στην προνύμφη dauer (dauer formation)*: Οι απόγονοι των σκωλήκων καλλιεργούνται στους 27 °C και 72 ώρες αργότερα καταμετράται ο αριθμός των ζώων που μετέβησαν στην dauer προνύμφη ως προς το σύνολο του αριθμού των απογόνων (Karp, 2018).

*Κινητικότητα (head thrashes)*: Μεμονωμένα άτομα μεταφέρονται σε NGM τρυβλίο απουσία βακτηρίων ώστε να συρθούν ελεύθερα για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ένα-ένα σε μία σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος M9 επάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνονται να προσαρμοστούν στο υδάτινο περιβάλλον για διάστημα 30 δευτερολέπτων. Έπειτα καταγράφεται ο αριθμός των κινήσεων του

κεφαλιού (τίναγμα δεξιά και αριστερά) που πραγματοποιεί κάθε σκώληκας σε χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων (W. Liu et al., 2020; K. G. Miller et al., 1996). Μετρούνται συνολικά τουλάχιστον 30 ζώα ανά συνθήκη.

Να σημειωθεί ότι για να πραγματοποιηθούν οι φαινοτυπικές αναλύσεις, τα υπό μελέτη ζώα βρίσκονται συνεχώς σε NGM τρυβλία επιστρωμένα με θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία βακτήρια *E. coli* OP50 που περιέχουν την υπό έλεγχο ένωση είτε το διαλύτη DMSO (control) ώστε να δέχονται συνεχώς την επίδραση της εξεταζόμενης ένωσης. Για τις δοκιμασίες όπου καταγράφονται μετρήσεις για περισσότερες από μία αναπτυξιακές ημέρες, τα ίδια ζώα μεταφέρονται σε φρέσκα NGM τρυβλία ώστε να παρακολουθείται ο ίδιος πληθυσμός ατόμων καθώς γηράσκει.

### 2.2.23 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και η γραφική απεικόνιση έγινε με τη βοήθεια των προγραμμάτων GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) και Microsoft Office 365 Excel (Microsoft Corporation). Όλες οι τιμές στους πίνακες και στα γραφήματα απεικονίζονται ως ο μέσος όρος των  $x$  ίδιων ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  μέσο τυπικό σφάλμα (Standard Error of the Mean, SEM). Κάτω από κάθε πίνακα ή γράφημα αναγράφεται το είδος της στατιστικής ανάλυσης που έχει πραγματοποιηθεί. Η τιμή  $p$  ( $p$ -value) χρησιμοποιείται προκειμένου να προσδιοριστεί το επίπεδο σημαντικότητας των πειραμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα ορίζεται ως εξής: τέσσερα αστεράκια (\*\*\*\*) υποδηλώνουν  $p < 0.0001$ , τρία αστεράκια (\*\*\*) υποδηλώνουν  $p < 0.001$ , δύο αστεράκια (\*\*) υποδηλώνουν  $p < 0.01$  και ένα αστεράκι (\*) υποδηλώνει  $p < 0.05$ . Οι τιμές με  $p$ -value  $\geq 0.05$  φανερώνουν διαφορές μη στατιστικά σημαντικές και για αυτό είτε δεν αναφέρονται καθόλου είτε αναφέρονται ως μη στατιστικά σημαντικές (not significant, ns).

## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Φυσικές ενώσεις

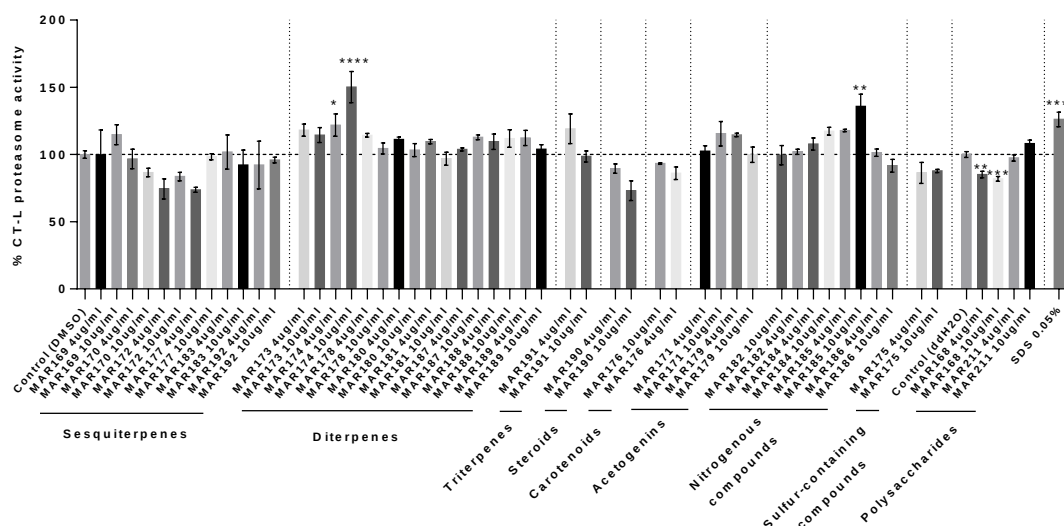
#### 3.1.1 Ταυτοποίηση ενός φυσικού μεταβολίτη προερχόμενο από θαλάσσιο οργανισμό της Μεσογείου Θάλασσας με ενεργοποιητική δράση έναντι του πρωτεασώματος

Στο πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής, σκοπός ήταν η ταυτοποίηση φυσικών μεταβολιτών του ελληνικού θαλάσσιου πλούτου με ενεργοποιητική δράση έναντι του πρωτεασώματος. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές ενεργοποιητών του πρωτεασώματος που να προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς. Αυτό το δεδομένο σε συνδυασμό με τον ανεκμετάλλευτο πλούτο των ελληνικών θαλασσών, μας ώθησε στο να αναζητήσουμε τέτοιες ενώσεις. Για το σκοπό αυτό, πρώτο μέλημα ήταν να αναζητήσουμε στη βιβλιογραφία ουσίες που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς και έχουν χαρακτηριστεί για την αντιγηραντική τους δράση είτε για τη δράση τους έναντι της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης, καθώς ο τρόπος δράσης των ουσιών αυτών πιθανά να οφείλεται στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος (M. Vasilopoulou et al., 2021). Έτσι, σε συνεργασία με το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ και εκμεταλλευόμενοι τη «βιβλιοθήκη» πλήρως χαρακτηρισμένων ενώσεων απομονωμένων από βενθικούς οργανισμούς της ανατολικής Μεσογείου Θάλασσας που διαθέτουν, καταλήξαμε σε 26 μεταβολίτες (Πίνακας 3-1) που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων τα σεσκιτερπένια (sesquiterpenes), διτερπένια (diterpenes), τριτερπένια (triterpenes), στεροειδή (steroids), καροτενοειδή (carotenoids), ακετογενίνες (acetogenins), αζωτούχες ενώσεις (nitrogenous compounds), ενώσεις που περιέχουν θείο (sulfur-containing compounds) και πολυσακχαρίτες (polysaccharides). Τους παραπάνω μεταβολίτες τους ελέγξαμε αρχικά για το εάν ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα μέσω απευθείας στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται απομονωμένο, ανθρώπινο, καθαρό 20S πρωτεάσωμα το οποίο επωάζεται στους 37°C με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό έλεγχο ουσιών παρουσία ειδικών φθορίζοντων υποστρωμάτων που αναγνωρίζονται ειδικά από το πρωτεάσωμα. Όταν τα υποστρώματα αυτά αποκόπτονται μέσω της αντίστοιχης ειδικής πρωτεασωματικής ενεργότητας, απελευθερώνονται στο υπερκείμενο και καταμετράται ο φθορισμός. Ελέγχθηκαν συνολικά δύο (2) συγκεντρώσεις για τον κάθε μεταβολίτη (4 και 10 µg/ml) και το αντίστοιχο δείγμα-μάρτυρα (control) όπου το καθαρό πρωτεάσωμα επωάστηκε με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση των ουσιών (DMSO ή ddH<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η πρωτεολυτική δράση του απομονωμένου καθαρού 20S πρωτεασώματος με βάση τον προσδιορισμό μίας εκ των τριών βασικών του ενεργοτήτων, της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L proteasome activity). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταβολίτες με τα κωδικά ονόματα NKUAMAR174 (εν συντομία MAR174) και NKUAMAR185 (εν συντομία MAR185) ενεργοποιούν δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L proteasome activity)

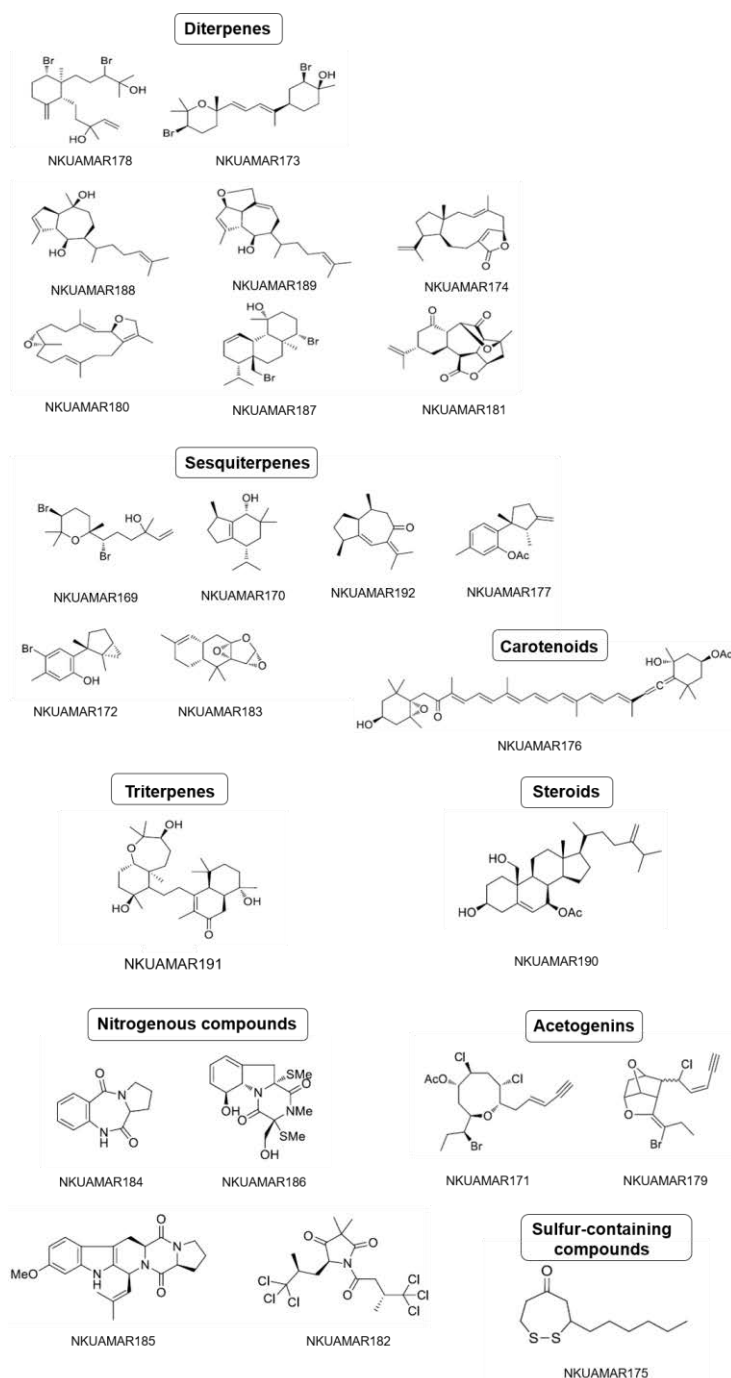
στατιστικά σημαντικά με καλύτερη αποδοτική συγκέντρωση και για τους δύο μεταβολίτες την 10 µg/ml (Εικόνα 3.1).

*Πίνακας 3-1: Ομαδοποίηση των 26 μεταβολιτών που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς της ανατολικής Μεσογείου Θάλασσας και ελέγχθηκαν για την ενεργοποιητική τους δράση έναντι του πρωτεασώματος.*

| Σεσκιτερπένια<br>(Sesquiterpenes)                                       | Διτερπένια (Diterpenes)                     | Ακτετογενίνες<br>(Acetogenins)                       |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| NKUAMAR169                                                              | NKUAMAR173                                  | NKUAMAR171                                           |
| NKUAMAR170                                                              | NKUAMAR174                                  | NKUAMAR179                                           |
| NKUAMAR172                                                              | NKUAMAR178                                  |                                                      |
| NKUAMAR177                                                              | NKUAMAR180                                  | <b>Αζωτούχες ενώσεις<br/>(Nitrogenous compounds)</b> |
| NKUAMAR183                                                              | NKUAMAR181                                  | NKUAMAR182                                           |
| NKUAMAR192                                                              | NKUAMAR187                                  | NKUAMAR184                                           |
|                                                                         | NKUAMAR188                                  | NKUAMAR185                                           |
|                                                                         | NKUAMAR189                                  | NKUAMAR186                                           |
|                                                                         |                                             |                                                      |
| <b>Τριτερπένια<br/>(Triterpenes)</b>                                    | <b>Στεροειδή (Steroids)</b>                 | <b>Καροτενοειδή<br/>(Carotenoids)</b>                |
| NKUAMAR191                                                              | NKUAMAR190                                  | NKUAMAR176                                           |
|                                                                         |                                             |                                                      |
| <b>Ενώσεις που περιέχουν<br/>θείο (Sulfur-containing<br/>compounds)</b> | <b>Πολυσακχαρίτες<br/>(Polysaccharides)</b> |                                                      |
| NKUAMAR175                                                              | NKUAMAR168                                  |                                                      |
|                                                                         | NKUAMAR211                                  |                                                      |

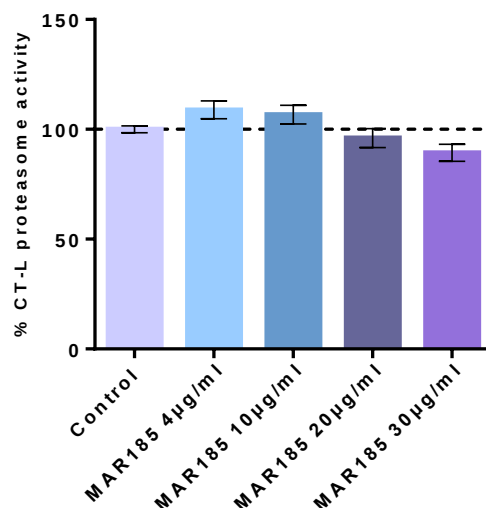


**Εικόνα 3.1:** Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης των 26 μεταβολιτών απομονωμένων από θαλάσσιους οργανισμούς της Μεσογείου Θάλασσας με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη (control, DMSO ή ddH<sub>2</sub>O) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των 26 μεταβολιτών διαφορετικών χημικών ομάδων που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς της Μεσογείου Θάλασσας. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).



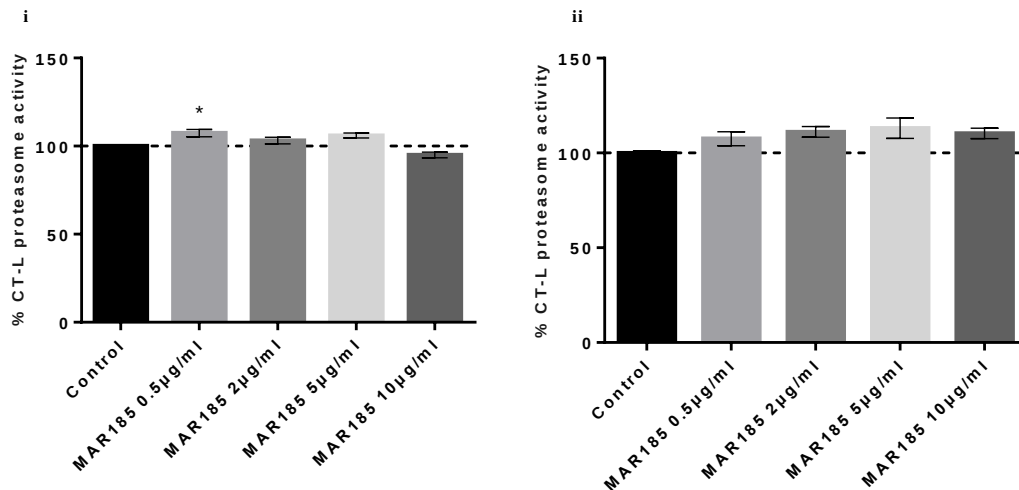
**Εικόνα 3.2:** Χημική σύσταση των μεταβολιτών που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς της ανατολικής Μεσογείου Θάλασσας και ελέγχθηκαν για την ενεργοποιητική τους δράση έναντι του πρωτεασώματος. Οι χημικές δομές των πολυσακχαριτών δεν παρουσιάζονται λόγω πειραμάτων που βρίσκονται σε εξέλιξη.

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, προχωρήσαμε σε επανάληψη του ανωτέρω πειράματος για την ένωση MAR185. Ελέγχθηκαν τέσσερις (4) διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ένωση MAR185 δεν οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος (**Εικόνα 3.3**) και επομένως δεν μπορούμε να θεωρήσουμε το μεταβολίτη ως δομικό ενεργοποιητή αυτού.



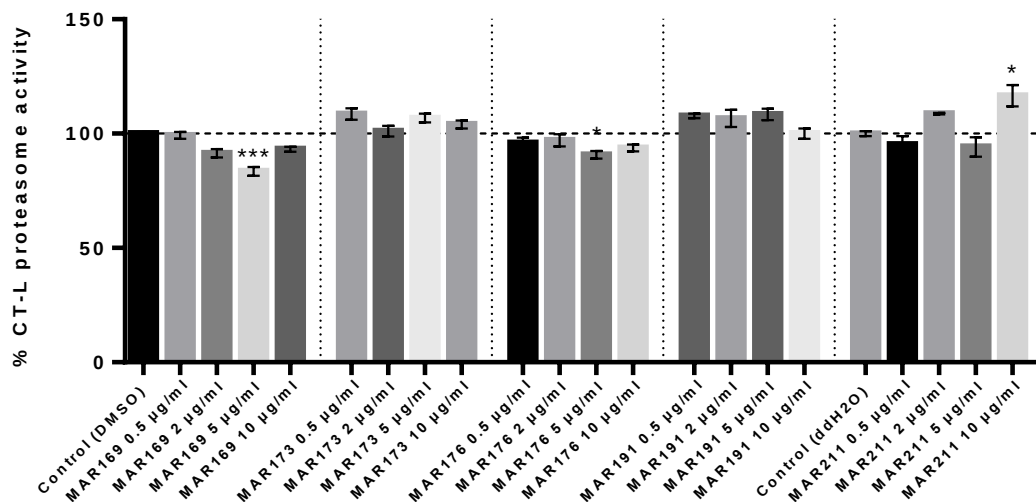
**Εικόνα 3.3:** Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης του μεταβολίτη MAR185 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη (DMSO) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (*one-way ANOVA*).

Καθώς είναι γνωστό ότι πολλές ουσίες είναι ικανές να ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες του πρωτεασώματος (Chondrogianni et al., 2020), στη συνέχεια εξετάσαμε εάν μπορεί να επιτευχθεί πρωτεασωμική ενεργοποίηση έπειτα από τη χορήγηση του μεταβολίτη MAR185 σε πρωτογενείς, ανθρώπινους, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες, ώστε να αποτιμηθεί η ενδεχόμενη πρωτεασωμική ενεργοποίηση *in cellulo* που πιθανά να οφείλεται σε ενεργοποίηση κάποιου σηματοδοτικού μονοπατιού και άρα σε έμμεση ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Χρησιμοποιήσαμε νεαρούς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες στους οποίους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις του MAR185. Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του μεταβολίτη για δύο (2) και είκοσι τέσσερις ώρες (24) και στη συνέχεια συλλέχθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών και αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η CT-L πρωτεασωμική ενεργότητα βρίσκεται στα ίδια ή σε ελάχιστα αυξημένα επίπεδα στους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που εκτέθηκαν για 2 (**Εικόνα 3.4 i**) ή 24 ώρες (**Εικόνα 3.4 ii**) στο MAR185 σε σύγκριση με εκείνους που εκτέθηκαν μόνο στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Επομένως, από τα παραπάνω αποτελέσματα, ο μεταβολίτης MAR185 δεν μπορεί να θεωρηθεί ενεργοποιητής του πρωτεασώματος, καθώς δεν ενεργοποίησε το πρωτεάσωμα *in vitro* ή *in cellulo* και για αυτό δεν μελετήθηκε περαιτέρω.



**Εικόνα 3.4:** Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, ανθρώπινους, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες μετά από δίωρη και εικοσιτετράωρη έκθεση στο μεταβολίτη MAR185. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε ο MAR185 στις συγκεντρώσεις 0.5, 2, 5 και 10 µg/ml για (i) 2 ώρες και (ii) 24 ώρες. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

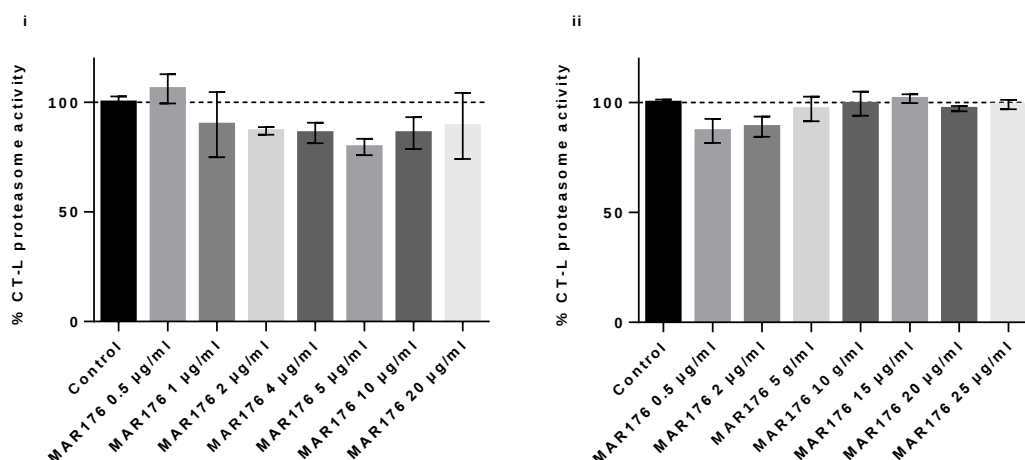
Σύμφωνα με την **Εικόνα 3.1**, οι μεταβολίτες MAR169, MAR173, MAR176, MAR191 και MAR211 προκάλεσαν αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του καθαρού 20S πρωτεασώματος, χωρίς ωστόσο αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Έτσι, θέλαμε να εξετάσουμε εάν μπορεί να επιτευχθεί πρωτεασωμική ενεργοποίηση έπειτα από τη χορήγηση των μεταβολιτών αυτών σε HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες, ώστε να αποτιμηθεί η ενδεχόμενη πρωτεασωμική ενεργοποίηση *in cellulo* που πιθανά να οφείλεται σε ενεργοποίηση κάποιου σηματοδοτικού μονοπατιού και άρα σε έμμεση ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Χρησιμοποιήσαμε νεαρούς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες στους οποίους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών. Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των μεταβολιτών (0.5, 2, 5 και 10 µg/ml) για είκοσι τέσσερις (24) ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών και αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) βρίσκεται στα ίδια ή σε ελάχιστα αυξημένα επίπεδα στους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που δέχθηκαν την επίδραση των μεταβολιτών σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικόνα 3.5**). Για το λόγο αυτό οι παραπάνω μεταβολίτες δεν μπορούν να θεωρηθούν ενεργοποιητές του πρωτεασώματος, τουλάχιστον στις συνθήκες που ελέγχθηκαν, και δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.



**Εικόνα 3.5:** Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στους μεταβολίτες MAR169, MAR173, MAR176, MAR191 και MAR211. Στο γράφημα παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε MAR169, MAR173, MAR176, MAR191 ή MAR211 στις συγκεντρώσεις 0.5, 2, 5 και 10 µg/ml για 24 ώρες. Η έκθεση των κυττάρων στη συγκέντρωση 10 µg/ml MAR211 για 24 ώρες προκάλεσε ελάχιστη αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $116.6 \pm 4.67$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Τέλος, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η φουκοξανθίνη έχει δειχθεί να ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, μεταξύ άλλων, και έχει χαρακτηριστεί για τις αντιγηραντικές, αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές της δράσεις (M. Vasilopoulou et al., 2021). Θέλοντας να εξετάσουμε εάν η φουκοξανθίνη που έχουμε απομονώσει από θαλάσσιους οργανισμούς της Μεσογείου Θάλασσας (MAR176) είναι ικανή να ενεργοποιήσει το 20S πρωτεάσωμα είτε *in vitro* είτε *in cellulo*, προχωρήσαμε σε περαιτέρω διερεύνηση του μεταβολίτη αυτού. Αρχικά, ελέγχθηκαν επτά (7) διαφορετικές συγκεντρώσεις του MAR176 για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα μέσω απευθείας στερεοχημικής αλληλεπίδρασης. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.6 i) έδειξαν ότι ο μεταβολίτης MAR176 δεν οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος και επομένως δεν μπορούμε να θεωρήσουμε το μεταβολίτη ως δομικό ενεργοποιητή αυτού. Έπειτα, χρησιμοποιήσαμε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου στους οποίους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις της MAR176. Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων MAR176 (0.5, 2, 5, 10, 15, 20 και 25 µg/ml) για είκοσι τέσσερις (24) ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών και αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η CT-L πρωτεασωμική ενεργότητα βρίσκεται στα ίδια επίπεδα στους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που δέχθηκαν την επίδραση των μεταβολιτών σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.6 ii). Συνολικά, στις

συνθήκες που ελέγχθηκαν, ο μεταβολίτης MAR176 δεν μπορεί να θεωρηθεί ενεργοποιητής του πρωτεασώματος.

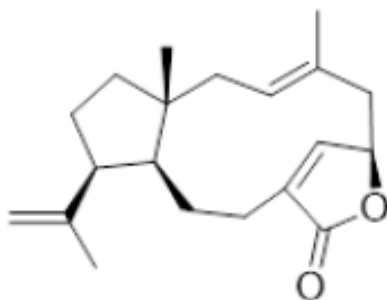


**Εικόνα 3.6:** Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω του μεταβολίτη *MAR176 in vitro* και *in cellulo*. (i) Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του καθαρού, απομονωμένου, ανθρώπινου 20S πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις MAR176. (ii) Παρουσιάζεται η % CT-L ενεργότητα του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε 0.5, 2, 5, 10, 15, 20 και 25 µg/ml MAR176 για 24 ώρες. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

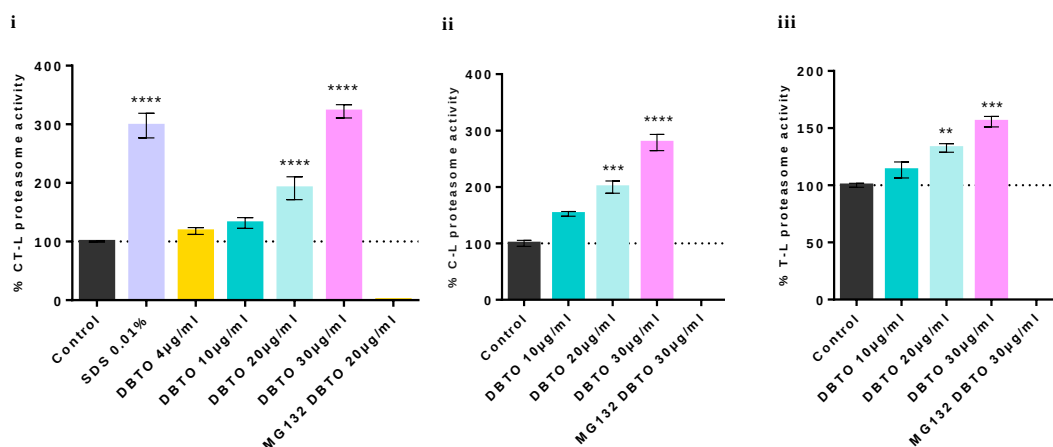
### 3.1.2 Ο μεταβολίτης DBTO ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MAR174 με το 20S καθαρό πρωτεάσωμα ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος, προχωρήσαμε σε επανάληψη του πειράματος και για αυτήν την ένωση. Ο μεταβολίτης με το κωδικό όνομα MAR174 απομονώθηκε από δείγματα του είδους *Dictyota mediterranea* που συλλέχθηκαν τον Αύγουστο του 2013 από την παραλία του Αγίου Θεοδώρου στην Κάρπαθο. Αποτελεί ένα dolabellane διτερπένιο που ονομάζεται (1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (εν συντομία θα αναφέρεται ως **DBTO**) και η χημική του δομή παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.7**. 2 τέσσερις (4) διαφορετικές συγκεντρώσεις του μεταβολίτη (παρόμοιες με αυτές που ελέγχθηκαν και για τον MAR185). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ένωση DBTO ενεργοποιεί δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά 1.9 και 3.2 φορές μετά από επώαση του καθαρού 20S πρωτεασώματος με την ένωση DBTO σε συγκέντρωση 20 µg/ml (66,5 µM) και 30 µg/ml (99,8 µM), αντίστοιχα (**Εικόνα 3.8 i**). Το SDS χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας (Tanaka et al., 1989). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την ενεργότητα κασπάσης (C-L) με αύξηση της ενεργότητας κατά 1.9 και 2.7 φορές (**Εικόνα 3.8 ii**) και την ενεργότητα τρυψίνης (T-L) με αύξηση της ενεργότητας κατά 1.3 και 1.5 φορές (**Εικόνα 3.8 iii**) παρουσία 20 και 30 µg/ml DBTO, αντίστοιχα. Για να διασφαλιστεί η ειδικότητα του πειράματος,

χρησιμοποιήθηκε ο MG132 αναστολέας του πρωτεασώματος (Kisselev & Goldberg, 2001) σε συνδυασμό με την ένωση DBTO. Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο μεταβολίτης DBTO αυξάνει και τις τρεις ενεργότητες του 20S καθαρού πρωτεασώματος ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος, υποδεικνύοντας την πιθανή δράση του DBTO ως δομικό ενεργοποιητή του 20S πρωτεασώματος μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης.



**Εικόνα 3.7:** Η χημική δομή του μεταβολίτη (1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (DBTO) (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022)

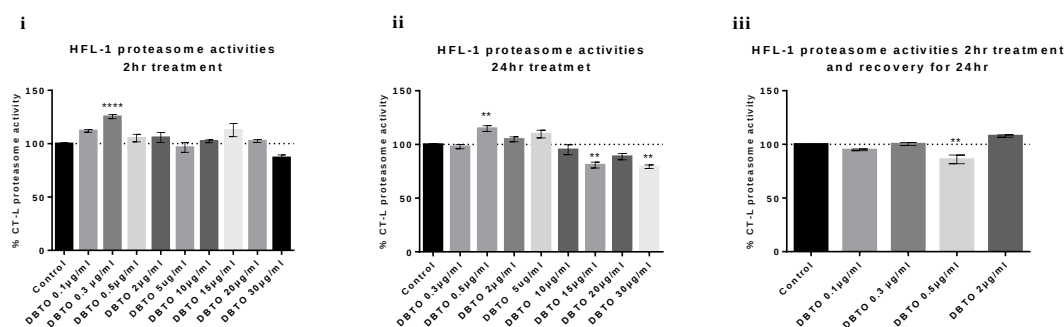


**Εικόνα 3.8:** Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L), κασπάσης (C-L) και τρυψίνης (T-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης του μεταβολίτη DBTO με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα (i) χυμοθρυψίνης (CT-L), (ii) κασπάσης (C-L) και (iii) τρυψίνης (T-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μεταβολίτη DBTO. (i) Στη συγκέντρωση 20 μg/ml (πρώτη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $191.1 \pm 19.49$  και στη συγκέντρωση 30 μg/ml (μέγιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $322.2 \pm 11.40$ . (ii) Στη συγκέντρωση 20 μg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $199.8 \pm 10.88$  και στη συγκέντρωση 30 μg/ml (μέγιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $278.9 \pm 14.31$ . (iii) Στη συγκέντρωση 20 μg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $132.7 \pm 3.80$  και στη συγκέντρωση 30 μg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $155.7 \pm 4.59$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

### 3.1.3 Ο μεταβολίτης DBTO ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η πρωτεασωμική ενεργοποίηση μπορεί να επιτευχθεί και έπειτα από τη χορήγηση του μεταβολίτη DBTO σε πρωτογενείς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου για αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης *in cellulo*. Χρησιμοποιήσαμε νεαρούς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες στους οποίους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις του DBTO. Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του DBTO για δύο (2), είκοσι τέσσερις (24) ώρες και για δύο (2) ώρες με επακόλουθη επαναφορά τους στο μέσο καλλιέργειας για είκοσι τέσσερις (24) ώρες. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών και αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας.

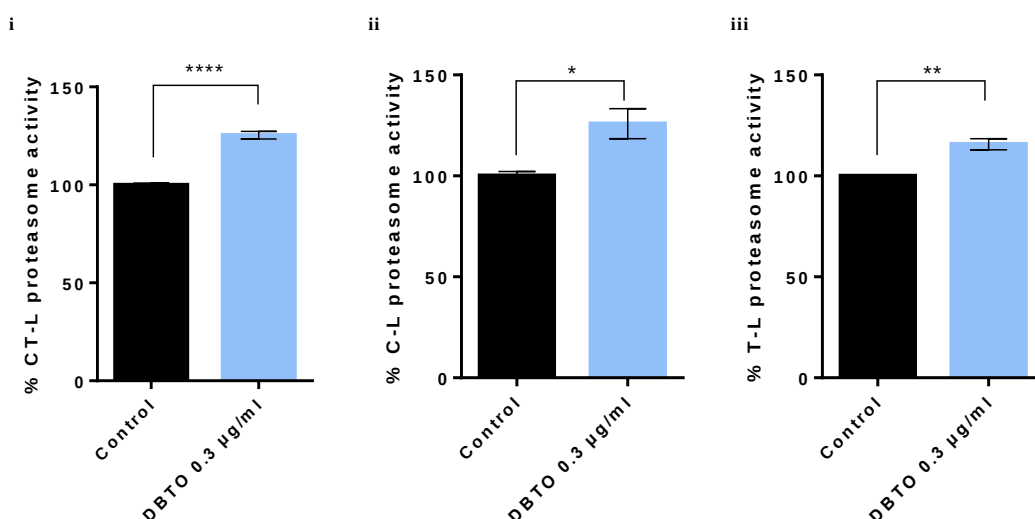
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) αυξάνεται στατιστικά σημαντικά στους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο μεταβολίτη DBTO σε σύγκριση με εκείνους που εκτέθηκαν μόνο στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Πιο συγκεκριμένα, όταν ο μεταβολίτης χορηγήθηκε στους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες για 2 ώρες, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος φτάνει σε ένα μέγιστο ποσοστό στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , ενώ στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις η ενεργοποίηση εμφανίστηκε μειωμένη (*Εικόνα 3.9 i*). Όταν η ουσία χορηγήθηκε στα κύτταρα για 24 ώρες, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος φτάνει σε ένα μέγιστο ποσοστό στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν να μην οδηγούν σε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος (*Εικόνα 3.9 ii*). Αντίθετα, στην περίπτωση που στα κύτταρα χορηγήθηκαν για 2 ώρες διαφορετικές συγκεντρώσεις του DBTO και ακολούθησε η έκθεση των κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας για 24 ώρες, δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του πρωτεασώματος (*Εικόνα 3.9 iii*), υποδηλώνοντας πως η θετική επίδραση της ουσίας διαρκεί όσο τα κύτταρα εκτίθενται σε αυτή.



**Εικόνα 3.9: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς, πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από (i) δίωρη και (ii) εικοσιτετράωρη έκθεση στο μεταβολίτη DBTO και (iii) μετά από δίωρη έκθεση στο μεταβολίτη DBTO και επακόλουθη εικοσιτετράωρη έκθεση των κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε ο μεταβολίτης DBTO (i) στις συγκεντρώσεις 0.1, 0.3, 0.5, 2, 5, 10, 15, 20 και 30  $\mu\text{g/ml}$  για 2 ώρες. Η έκθεση των κυττάρων στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $126.6 \pm 1.60$ , (ii) στις συγκεντρώσεις 0.3, 0.5, 2, 5, 10, 15, 20 και 30  $\mu\text{g/ml}$  για 24 ώρες. Η έκθεση**

των κυττάρων στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $114.8 \pm 2.62$  και (iii) στις συγκεντρώσεις 0.1, 0.3, 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  για 2 ώρες με επακόλουθη έκθεση των κυττάρων στο μέσο καλλιέργειας για 24 ώρες. Τα *p-value* προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

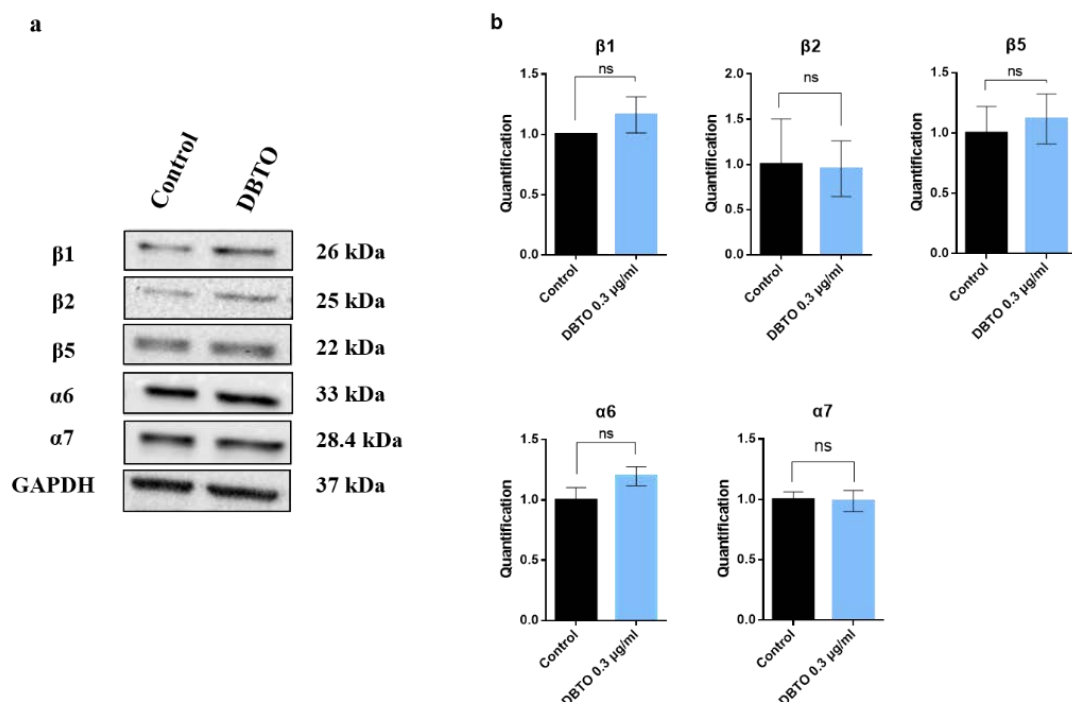
Καθώς παρατηρήθηκε μέγιστη ενεργοποίηση της CT-L ενεργότητας του πρωτεασώματος έπειτα από τη δίωρη έκθεση των νεαρών HFL-1 εμβρυϊκών ινοβλαστών του ανθρώπου στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  (0.99  $\mu\text{M}$ ) DBTO, επαναλάβαμε το πείραμα και για τις τρεις ενεργότητες του πρωτεασώματος μετρώντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L), την ενεργότητα τρυψίνης (T-L) και την ενεργότητα κασπάσης (C-L). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δίωρη έκθεση των πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO αυξάνει στατιστικά σημαντικά και τις τρεις ενεργότητες του πρωτεασώματος (Εικόνα 3.10).



**Εικόνα 3.10: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω του μεταβολίτη DBTO in cellulo.** Παρουσιάζεται η % ενεργότητα (i) χυμοθρυψίνης (CT-L), (ii) κασπάσης (C-L) και (iii) τρυψίνης (T-L) ενεργότητα του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου που τους χορηγήθηκε 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή ο διαλύτης (DMSO) για 2 ώρες. Η έκθεση αυτή προκάλεσε αύξηση της (i) CT-L ενεργότητας του πρωτεασώματος σε ποσοστό  $125.4 \pm 1.96$ , της (ii) C-L ενεργότητας του πρωτεασώματος σε ποσοστό  $125.8 \pm 7.40$  και της (iii) T-L ενεργότητας του πρωτεασώματος σε ποσοστό  $115.7 \pm 2.76$ . Τα *p-value* προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t-test* (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της έκθεσης του DBTO σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης του πρωτεασώματος στους HFL-1 ινοβλάστες, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των καταλυτικών  $\beta$ -υπομονάδων ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_5$ ), καθώς και των  $\alpha_6$  και  $\alpha_7$  ρυθμιστικών υπομονάδων του πρωτεασώματος. Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.11), υποδηλώνοντας ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στις πρωτεασωμικές ενεργότητες δεν προκύπτουν από αλλαγές στην

πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος και κατ' επέκταση από διαφορές στα επίπεδα του πρωτεασώματος μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου.



**Εικόνα 3.11:** Η χορήγηση του μεταβολίτη DBTO δε μεταβάλλει την πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος *in cellulo*. (a) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα) και (b) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β2, β5, α6 και α7 σε HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε 0.3 µg/ml DBTO ή στο διαλύτη DMSO (control) για 2 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των υπομονάδων του πρωτεασώματος στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) για 2 ώρες τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από κάθε ανοσοαποτύπωμα. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

### 3.1.4 Ο μεταβολίτης DBTO βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Οι φυσιολογικοί ινοβλάστες του ανθρώπου υφίστανται συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων στην καλλιέργεια έως ότου τα κύτταρα πάψουν να διαιρούνται παραμένοντας ζωντανά και μεταβολικώς ενεργά (Campisi, 2013; Hayflick & Moorhead, 1961). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αναδιπλασιαστική γήρανση (replicative senescence) και αποτελεί ένα μοντέλο μελέτης της γήρανσης *in vitro* (Hernandez-Segura et al., 2018). Μελέτες έχουν δείξει πως η διατήρηση της πρωτεασωμικής λειτουργίας είναι απαραίτητη για την καθυστέρηση της αναδιπλασιαστικής γήρανσης (Chondrogianni et al., 2005, 2010; Kapeta et al., 2010).

Δεδομένης της ικανότητας του μεταβολίτη DBTO να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα τόσο *in vitro*, όσο και *in cellulo*, ελέγξαμε την επίδραση της χορήγησής του στην εξέλιξη της γήρανσης πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. Για το συγκεκριμένο πείραμα, νεαροί HFL-1 ινοβλάστες (CPD 27) εκτέθηκαν καθ' όλη τη

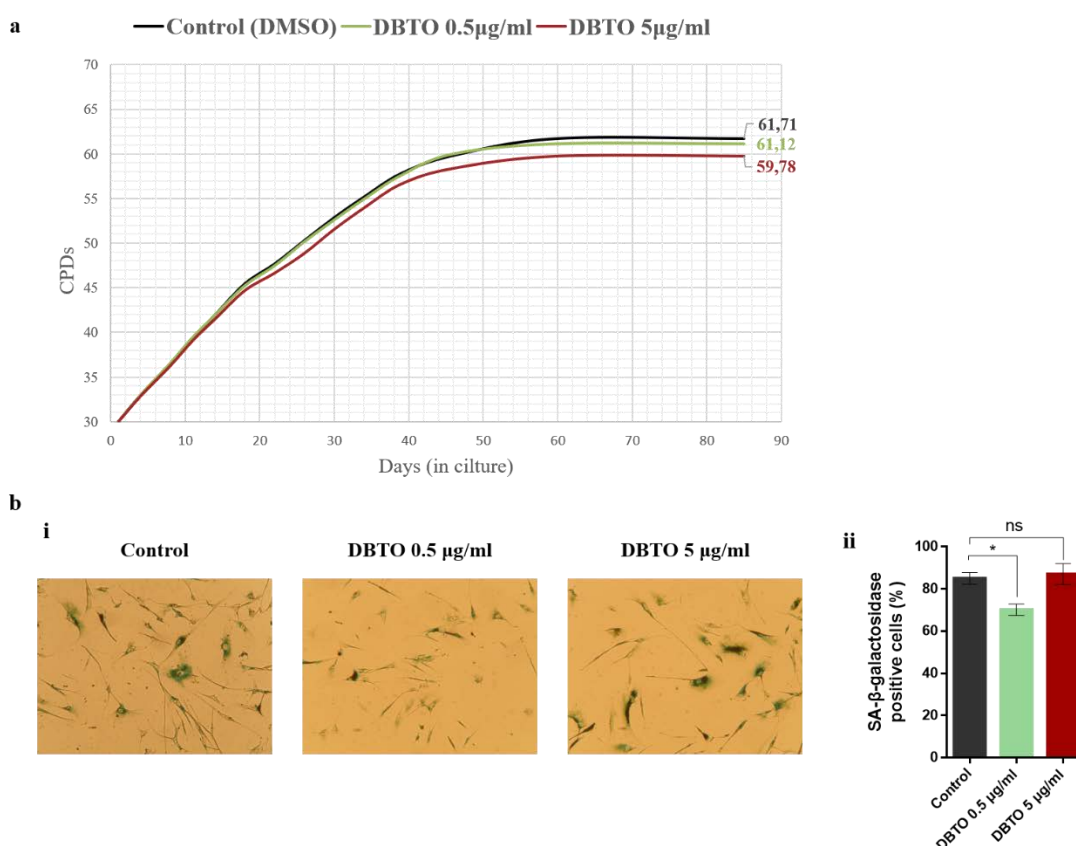
διάρκεια της ζωής τους στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) για να αποτιμηθεί η αντιγηραντική δράση της ουσίας *in vitro*. Η συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  επιλέχθηκε καθώς ήταν αυτή που προκάλεσε την αύξηση και των τριών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος *in cellulo*. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνα 3.12 a**, η χορήγηση του μεταβολίτη DBTO στη συγκέντρωση αυτή δεν καθυστέρησε στατιστικά σημαντικά τη γήρανση των κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στο διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του DBTO πραγματοποίησαν  $64.42 \pm 0.15$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $64.68 \pm 0.12$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p = 0.22$ ). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής ούτε κατά τη χορήγηση του DBTO στις συγκεντρώσεις 0.5 και 5  $\mu\text{g/ml}$  που ελέγχθηκαν (**Εικόνα 3.12**). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση 0.5 και 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO πραγματοποίησαν  $61.12 \pm 0.27$  ( $p = 0.19$ ) και  $59.78 \pm 0.28$  ( $p < 0.0001$ ) κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $61.54 \pm 0.28$  κυτταρικές διαιρέσεις. Εντούτοις, τα κύτταρα που δέχθηκαν τη συνεχόμενη επίδραση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO κατά τη διάρκεια της ζωής τους, παρουσίασαν καθυστέρηση στην εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου διατηρώντας τη νεανική τους μορφολογία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο DMSO (control), υποδηλώνοντας πως η παρουσία του μεταβολίτη DBTO βελτιώνει την κυτταρική ευζωία (healthspan).

Θέλοντας να το διερευνήσουμε περαιτέρω, προχωρήσαμε στον έλεγχο ορισμένων δεικτών κυτταρικής ευζωίας. Πράγματι, η χορήγηση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO στους HFL-1 ινοβλάστες, οδήγησε σε μειωμένο ποσοστό κυττάρων θετικών στη χρώση σχετιζόμενη με την αναδιπλασιαστική γήρανση  $\beta$  γαλακτοσιδάση (SA- $\beta$ -gal) σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στο διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (ημέρα 28 και 60) (**Εικόνα 3.13 b, c**). Πιο συγκεκριμένα, την 28<sup>η</sup> ημέρα, και ενώ τα κύτταρα δεχόντουσαν για περίπου ένα μήνα τη συνεχόμενη επίδραση του DBTO ή του DMSO, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε DBTO είναι  $0.250 \pm 0.011$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.356 \pm 0.034$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO· διαφορά στατιστικά σημαντική ( $p = 0.04$ ). Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε και την 60<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας των HFL-1 εμβρυικών ινοβλαστών, όπου ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε DBTO είναι  $0.812 \pm 0.016$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.929 \pm 0.010$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.0004$ ).

Στα ίδια χρονικά σημεία (ημέρα 28 και 60) πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία scratch assay (C.-C. Liang et al., 2007). Στη δοκιμασία αυτή δημιουργείται μία «τεχνητή πληγή» και παρακολουθείται το κλείσιμο αυτής μέσω της μετανάστευσης των κυττάρων. Το κενό που έχει δημιουργηθεί φωτογραφίζεται από την αρχή και ανά τακτά

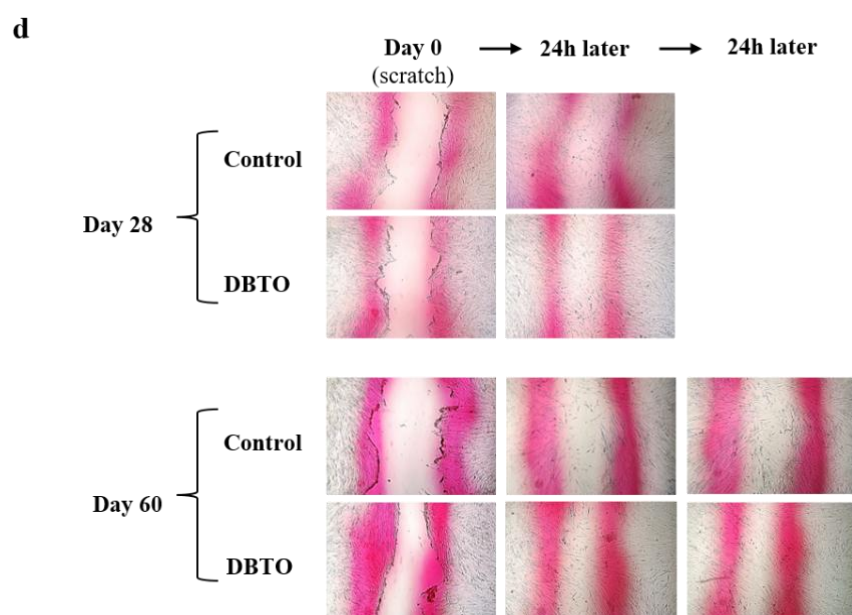
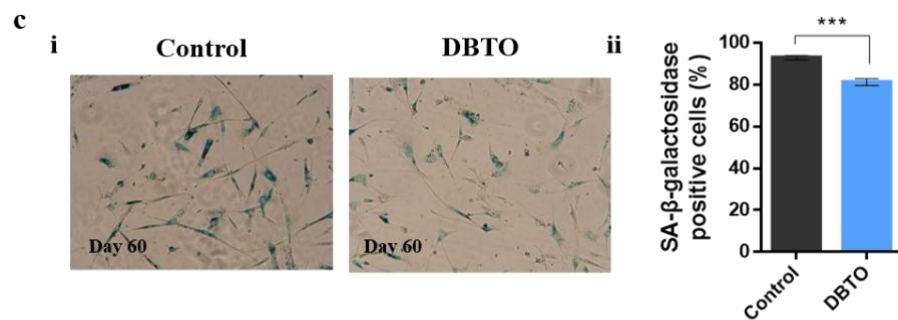
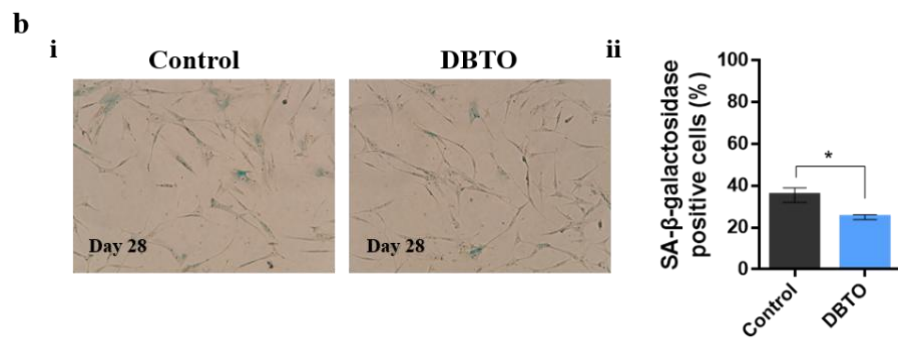
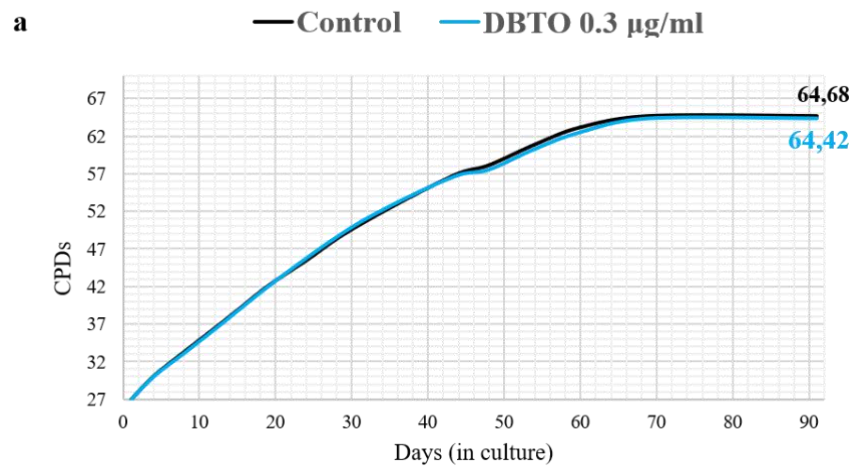
χρονικά διαστήματα έως ότου αυτό κλείσει από κάποιον από τους πληθυσμούς των κυττάρων-μελέτης. Η χορήγηση του DBTO στους HFL-1 ινοβλάστες για 28 συνεχόμενες ημέρες επιτάχυνε το «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρήθηκε και την 60<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων (**Εικόνα 3.13 d**). Οι δύο αυτές παρατηρήσεις συνάδουν με το μειωμένο αριθμό κυττάρων θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης που δέχθηκαν την επίδραση του μεταβολίτη DBTO στις δύο αυτές χρονικές στιγμές, υποδηλώνοντας το αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

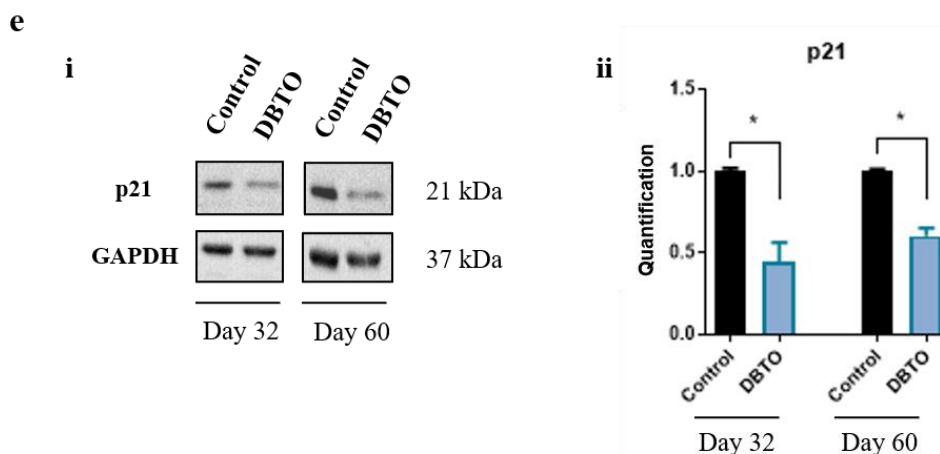
Τέλος, σύμφωνα με την προοδευτική αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p21<sup>CIP1/WAF1</sup> κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης (GH et al., 1999), τα μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της p21 που παρατηρήθηκαν στις 28 και 60 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης του μεταβολίτη DBTO στους HFL-1 ινοβλάστες σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) (**Εικόνα 3.13 e**), ενισχύουν την παρατήρηση πως η παρουσία του μεταβολίτη DBTO βελτιώνει την κυτταρική ευζωία.



**Εικόνα 3.12: Αποτίμηση της αντιγηραντικής δράσης του μεταβολίτη DBTO στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.** (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (*cumulative population doublings, cpd*) των πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 0.5 μg/ml και 5 μg/ml DBTO και στο διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε

συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 85 συνεχόμενες μέρες. (b) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 0.5  $\mu\text{g/ml}$  και 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και στο διαλύτη DMSO (control) για 46 συνεχόμενες ημέρες. Τα *p-value* προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t-test*.





**Εικόνα 3.13: Η ένωση DBTO βελτιώνει την ευζωία (healthspan) στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.** (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 91 συνεχόμενες μέρες. (b, c) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και στο διαλύτη DMSO (control) για (b) 28 και (c) 60 συνεχόμενες μέρες. (d) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του κλεισίματος της «τεχνητής πληγής» HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και στο διαλύτη DMSO (control) για 28 και 60 συνεχόμενες μέρες. Οι κόκκινες γραμμές εσωκλείουν την περιοχή της «τεχνητής πληγής». (e) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και στο διαλύτη DMSO (control) για 32 και 60 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης της p21 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από το ανοσοαποτύπωμα. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

### 3.1.5 Ο μεταβολίτης DBTO δεν επηρεάζει βασικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου

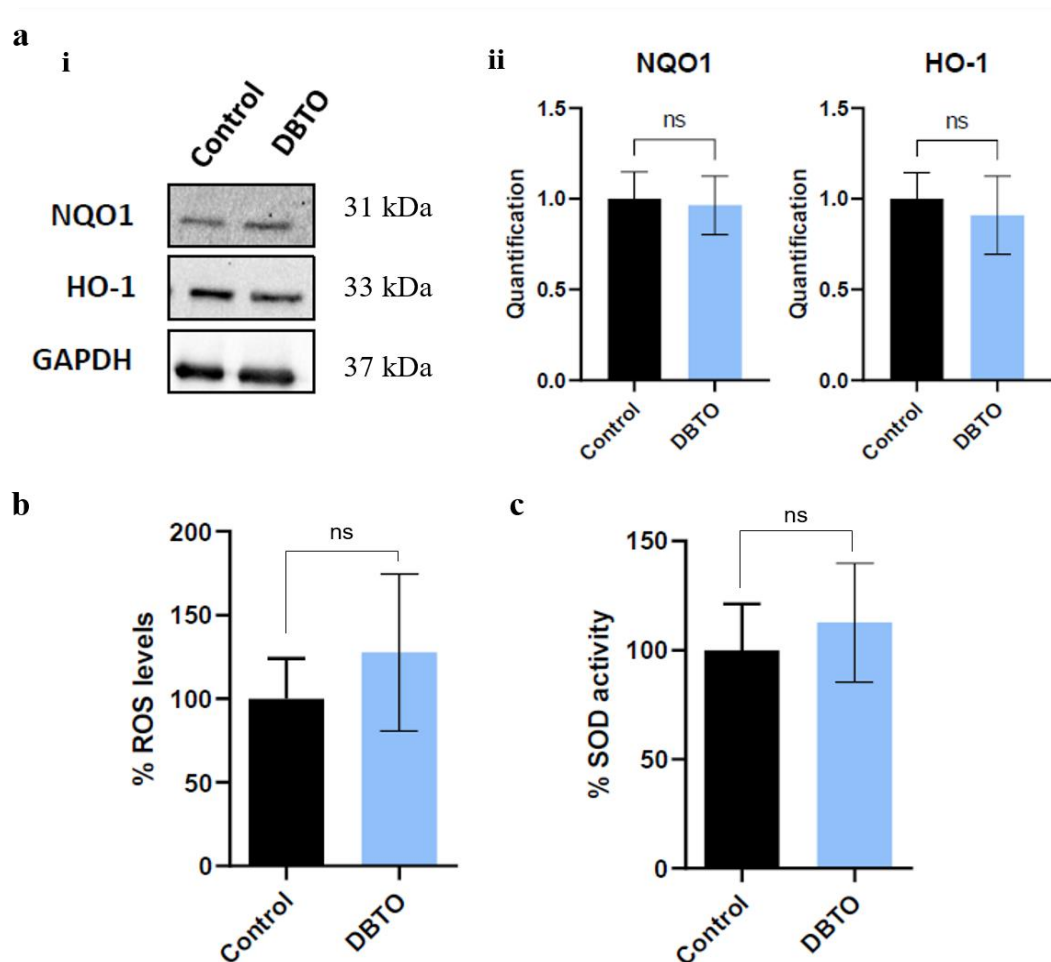
Καθώς ο Nrf2 είναι ένας από τους βασικότερους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση υπομονάδων του πρωτεασώματος, κυρίως σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Budenholzer et al., 2017; Kapetanou et al., 2022; Pajares et al., 2017), ελέγξαμε εάν η πρωτεασωμική ενεργοποίηση που παρατηρείται παρουσία του μεταβολίτη DBTO συνδέεται με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Για το σκοπό αυτό, μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση δύο εκ των κυριότερων γονιδίων-στόχων του Nrf2, την οξειδοαναγωγή της NAD(P)H κινάσης (NQO1) και την οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.14 a**, η δίωρη έκθεση νεαρών HFL-1 ινοβλαστών στη συγκέντρωση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική διαφορά στα

επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης των NQO1 και HO-1 μεταξύ των κυττάρων-ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με την απουσία μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των πρωτεασωμικών υπομονάδων (*Εικόνα 3.11*), υποδεικνύει πως ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 δεν ενεργοποιείται υπό την παρουσία του DBTO (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Στη συνέχεια, θέλαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω εάν το DBTO επηρεάζει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου που ευθύνονται για τα θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν *in vitro*. Για το λόγο αυτό, νεαροί HFL-1 ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν παρουσία 0.3 μg/ml DBTO ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) για 2 ώρες και έπειτα μετρήθηκαν τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην *Εικόνα 3.14 b*, παρουσία του μεταβολίτη DBTO δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα των ROS (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Τέλος, προχωρήσαμε στον προσδιορισμό της ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), ενός από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που αποτελεί το πρώτο αμυντικό σύστημα έναντι των ανιόντων σουπεροξειδίου (McCord & Fridovich, 1969). Έπειτα από τη χορήγηση του DBTO είτε του διαλύτη DMSO (control) σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες για 2 ώρες δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ενεργότητα της SOD μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου (*Εικόνα 3.14 c*) (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος παρουσία του μεταβολίτη DBTO *in vitro*, αποτελεί τον κύριο αντιοξειδωτικό μηχανισμό του κυττάρου. Εντούτοις, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την εμπλοκή κάποιων από τους υπόλοιπους κυτταρικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που δεν έχουμε ελέγξει στην παρούσα μελέτη (όπως π.χ. η καταλάση ή ο μεταγραφικός παράγοντας HSF-1), και οι οποίοι μπορεί να ευθύνονται για τις θετικές επιδράσεις του μεταβολίτη DBTO που έχουμε περιγράψει *in vitro* (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).



**Εικόνα 3.14: Απουσία ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μηχανισμών παρουσία του μεταβολίτη DBTO.** (a) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα) και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων του Nrf2, NQO1 και HO-1, σε HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε 0.3 µg/ml DBTO ή στο διαλύτη DMSO (control) για 2 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των NQO1 και HO-1 στους ανθρώπινους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) για 2 ώρες τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από κάθε ανοσοαποτύπωμα. (b) Επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (%) και ποσοστό (%) ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης SOD σε HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε 0.3 µg/ml DBTO ή στο διαλύτη DMSO (control) για 2 ώρες. Η μέση τιμή των επιπέδων ROS και της ενεργότητας του SOD στα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν ως 100%. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

### 3.1.6 Ο μεταβολίτης DBTO αυξάνει την ανθεκτικότητα στην πρωτοετοξικότητα που προκαλείται από το Αβ πεπτίδιο σε κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου, μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος

Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος είτε μέσω γενετικής παρέμβασης είτε μέσω φυσικών ουσιών έχει δειχθεί να δρα ανασταλτικά στην εξέλιξη της AD (Papaevgeniou & Chondrogianni, 2016; M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022). Δεδομένου ότι ταυτοποιήσαμε το μεταβολίτη DBTO ως ενεργοποιητή του πρωτεασώματος, προχωρήσαμε στη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής του δράσης. Αρχικά,

θέλαμε να διερευνήσουμε την ικανότητα του DBTO να καταστέλλει την τοξικότητα που προκαλείται από το Αβ πεπτίδιο σε ανθρώπινα κύτταρα *in vitro*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα νευρικής προέλευσης και συγκεκριμένα καλλιέργειες νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου.

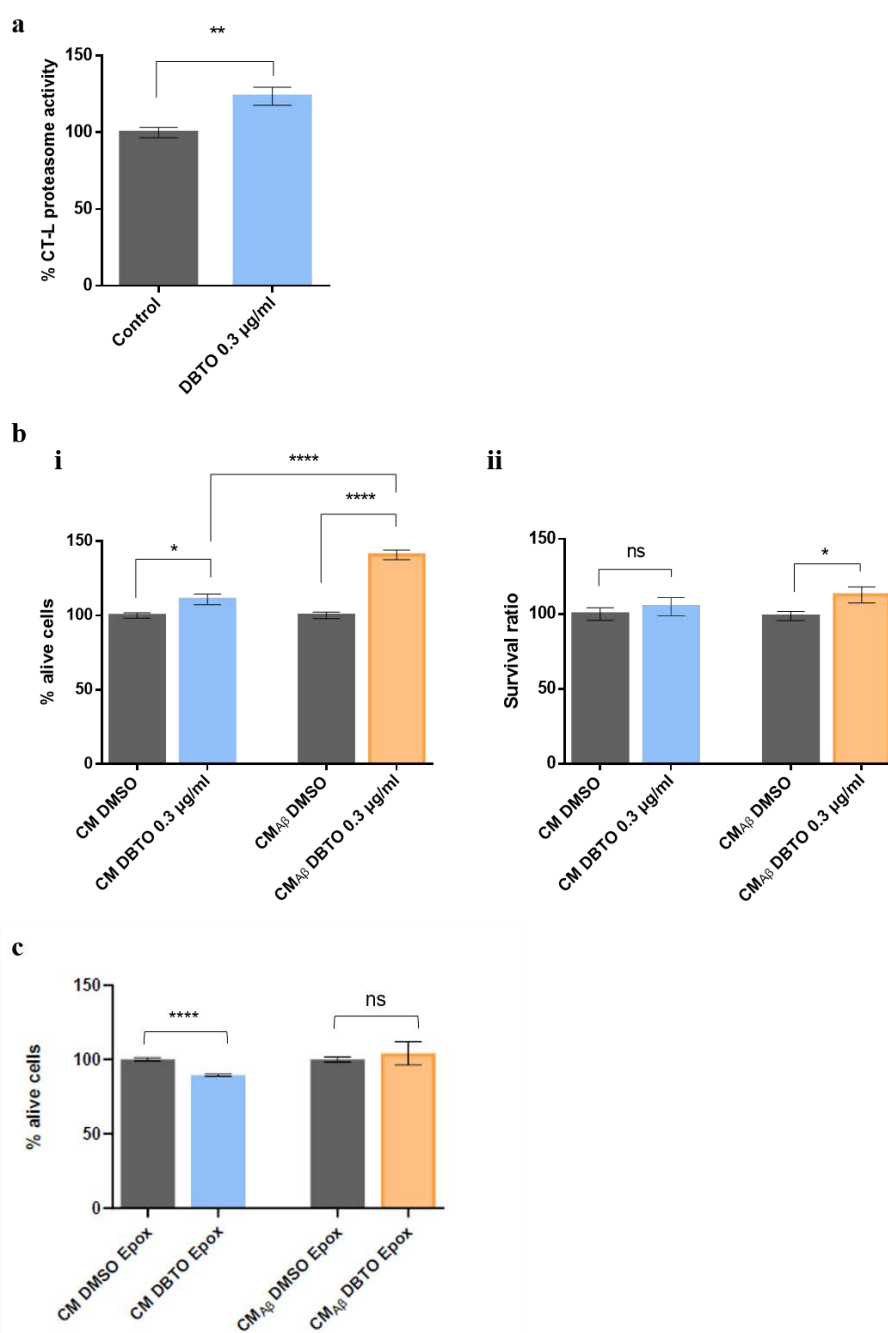
Αρχικά, θέλοντας να εξετάσουμε εάν ο μεταβολίτης DBTO προκαλεί αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y, μετρήσαμε την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος παρουσία 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες. Πράγματι, η έκθεση των κυττάρων στο DBTO για 24 ώρες προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της CT-L ενεργότητας του πρωτεασώματος (*Εικόνα 3.15*) σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control).

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε πειράματα ώστε να επιβεβαιώσουμε την κυτταρική τοξικότητα που προκαλείται από την έκθεση στο Αβ πεπτίδιο σε καλλιέργειες των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y. Έτσι, προχωρήσαμε σε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων SH-SY5Y μετά από την εικοσιτετράωρη έκθεσή τους στο μέσο καλλιέργειας από μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές από ωοθήκες Κινέζικου Χάμστερ (*Cricetulus griseus*) οι οποίες υπερεκφράζουν την αγρίου τύπου, πρόδρομη αμυλοειδική-β πρωτεΐνη, βAPP, που φέρει τη μετάλλαξη Val717Phe (CHO-7PA2) (CM<sub>Αβ</sub>) και στο μέσο καλλιέργειας από μη-μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές από ωοθήκες Κινέζικου Χάμστερ που εκφράζουν ενδογενώς χαμηλά επίπεδα της βAPP (CHO) (CM). Πράγματι, η ζωτικότητα των SH-SY5Y κυττάρων που εκτίθενται στο CM<sub>Αβ</sub> (που περιέχει Αβ πεπτίδια) μειώνεται στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτίθενται στο αντίστοιχο control, CM (δεν περιέχει Αβ πεπτίδια) (μέσος όρος αριθμού κυττάρων SH-SY5Y στο CM:  $860950 \pm 8775$ , μέσος όρος αριθμού κυττάρων SH-SY5Y στο CM<sub>Αβ</sub>:  $677100 \pm 15954$ ,  $p < 0.0001$ ) (*Εικόνα 6.1*).

Στη συνέχεια, χορηγήσαμε 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή το διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες στα κύτταρα SH-SY5Y με επακόλουθη εικοσιτετράωρη έκθεσή τους στα μέσα CM ή CM<sub>Αβ</sub> και ταυτόχρονη χορήγηση 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή DMSO. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της *Εικόνα 3.15 b, i*, η χορήγηση του DBTO στα κύτταρα SH-SY5Y που εκτέθηκαν στο CM (δεν περιέχει Αβ πεπτίδια), αύξησε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων. Στην περίπτωση όπου τα κύτταρα SH-SY5Y εκτέθηκαν στο CM<sub>Αβ</sub> (που περιέχει Αβ πεπτίδια), η ταυτόχρονη χορήγηση του DBTO προστάτησε στατιστικά σημαντικά τα κύτταρα από την τοξικότητα που προκαλεί το Αβ πεπτίδιο μειώνοντας τον κυτταρικό θάνατο σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Χρώση Crystal violet χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της κυτταρικής επιβίωσης υπό την παρουσία του μεταβολίτη DBTO (*Εικόνα 3.15 b, ii*).

Για να διαπιστωθεί εάν τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν κυρίως από την ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας που προκαλείται μέσω του μεταβολίτη DBTO, επαναλάβουμε το πείραμα υπό την παρουσία 20 nM εποξομισίνης. Η εποξομισίνη αποτελεί αναστολέα του πρωτεασώματος με υψηλή ειδικότητα και μη αντιστρέψιμη δράση (Sin et al., 1999) και η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε είναι

ικανή να εμποδίσει την πρωτεασωματική ενεργοποίηση που πιθανά προκαλείται μέσω του DBTO, χωρίς ωστόσο να προκαλέσει εκτενή κυτταρικό θάνατο. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.15 c**, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προστατευτική δράση του DBTO έναντι του κυτταρικού θανάτου στα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου που έχουν εκτεθεί στο Αβ πεπτιδίιο χάθηκε παρουσία του πρωτεασωμικού αναστολέα. Εν κατακλείδι, επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος παρουσία DBTO στα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου είναι αυτή που κατά κύριο λόγο ευθύνεται για τη μείωση του κυτταρικού θανάτου που προέρχεται από την τοξικότητα που προκαλείται από την παρουσία του Αβ πεπτιδίου (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

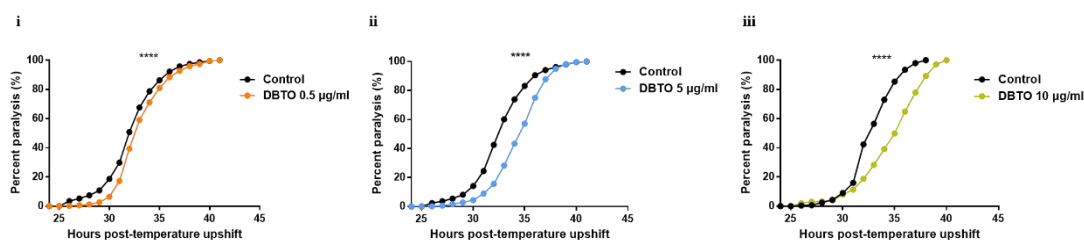


**Εικόνα 3.15: Η χορήγηση του μεταβολίτη DBTO βελτιώνει την επιβίωση των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου που επιβαρύνονται από την έκθεση στο Αβ πεπτιδίο μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος.** (a) Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος στα κύτταρα SH-SY5Y που τους χορηγήθηκε 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή ο διαλύτης (DMSO) για 24 ώρες. Η έκθεση αυτή προκάλεσε αύξηση της CT-L ενεργότητας του πρωτεασώματος σε ποσοστό  $123.6 \pm 5.97$ . (b) (i) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) της κυτταρικής επιβίωσης και (ii) η αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων έπειτα από χρώση με Crystal violet των κυττάρων SH-SY5Y που τους χορηγήθηκε 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή ο διαλύτης (DMSO) για 24 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε μέσο που περιείχε ανθρώπινο Αβ πεπτιδίο ( $CM_{AB}$ ) ή το αντίστοιχο control (CM) με ταυτόχρονη παρουσία DMSO ή 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO. Η μέση τιμή (i) των ζωντανών κυττάρων και (ii) της απορρόφησης στις καλλιέργειες ελέγχου (CM DMSO και  $CM_{AB}$  DMSO) τέθηκαν ως 100%. (c) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) της κυτταρικής επιβίωσης των κυττάρων SH-SY5Y που τους χορηγήθηκε 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή ο διαλύτης (DMSO) και 20 nM εποξομυσίνη για 24 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε μέσο που περιείχε ανθρώπινο Αβ πεπτιδίο ( $CM_{AB}$ ) ή το αντίστοιχο control (CM) με ταυτόχρονη παρουσία DMSO ή 0.3  $\mu\text{g/ml}$  DBTO και 20 nM εποξομυσίνη. Η μέση τιμή των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες ελέγχου (CM DMSO Erox και  $CM_{AB}$  DMSO Erox) τέθηκαν ως 100%. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

### 3.1.7 Ο μεταβολίτης DBTO προστατεύει έναντι της Αβ-τοξικότητας σε οργανισμικό επίπεδο

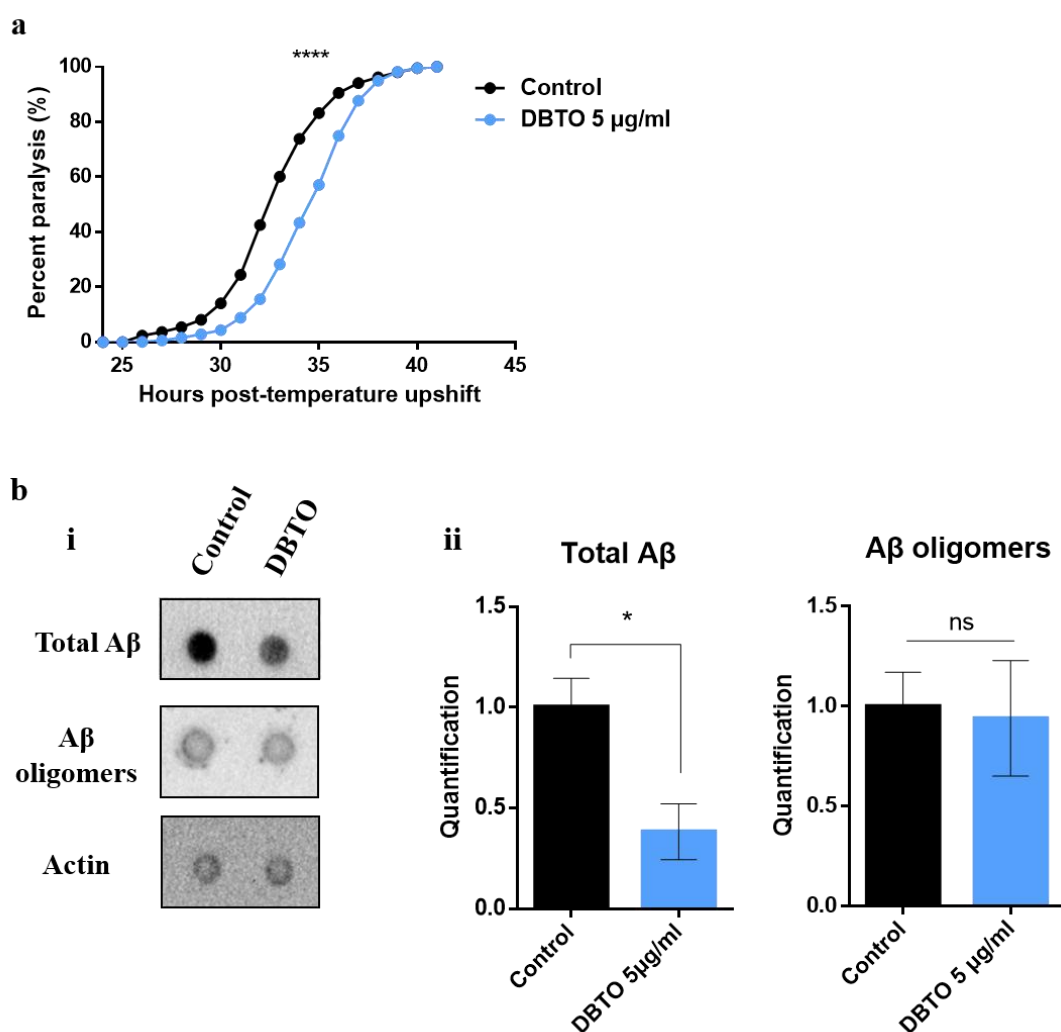
Λαμβάνοντας υπόψη τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε σχέση με τη νευροπροστατευτική δράση του μεταβολίτη DBTO *in vitro* σε καλλιέργειες νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου, θέλαμε να προχωρήσουμε στη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατικής δράσης του DBTO *in vivo* στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε ένα από τα στελέχη-μοντέλα για την AD στο νηματώδη σκώληκα, CL4176, μέσω του οποίου πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες παράλυσης. Τα ζώα που ανήκουν στο στέλεχος αυτό εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίο στα μυϊκά τους κύτταρα μόνο κατόπιν θερμικής επαγωγής. Η υπερέκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου οδηγεί σε δημιουργία β αμυλοειδών δομών, γεγονός το οποίο επακόλουθα οδηγεί σε σταδιακή παράλυση των σκωλήκων (Link et al., 2003).

Στο παραπάνω γενετικά τροποποιημένο στέλεχος, μελετήθηκε η επίδραση 0.5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  DBTO. Κατά την επίδραση του DBTO αποκαλύφθηκε ότι η ουσία επιβραδύνει στατιστικά σημαντικά τόσο την έναρξη, όσο και το ρυθμό παράλυσης των σκουληκιών σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) και στις τρεις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (Εικόνα 3.16). Ωστόσο, οι υπόλοιπες επαναλήψεις συνεχίστηκαν με τη συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO, καθώς αυτή κρίθηκε ως βέλτιστη (καλύτερη και μικρότερη αποτελεσματική συγκέντρωση).



**Εικόνα 3.16:** Η έκθεση του στελέχους CL4176 στο μεταβολίτη DBTO επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. (i) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $32.00 \pm 0.17$  (N=1322/1329) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 0.5 μg/ml DBTO παρέλυσε στις  $32.61 \pm 0.17$  (N=1426/1433) ώρες. (ii) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $32.42 \pm 0.18$  (N=2537/2552) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml DBTO παρέλυσε στις  $34.45 \pm 0.18$  (N=2732/2749) ώρες. (iii) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $32.61 \pm 0.18$  (N=411/413) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 10 μg/ml DBTO παρέλυσε στις  $34.95 \pm 0.22$  (N=492/494) ώρες. (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

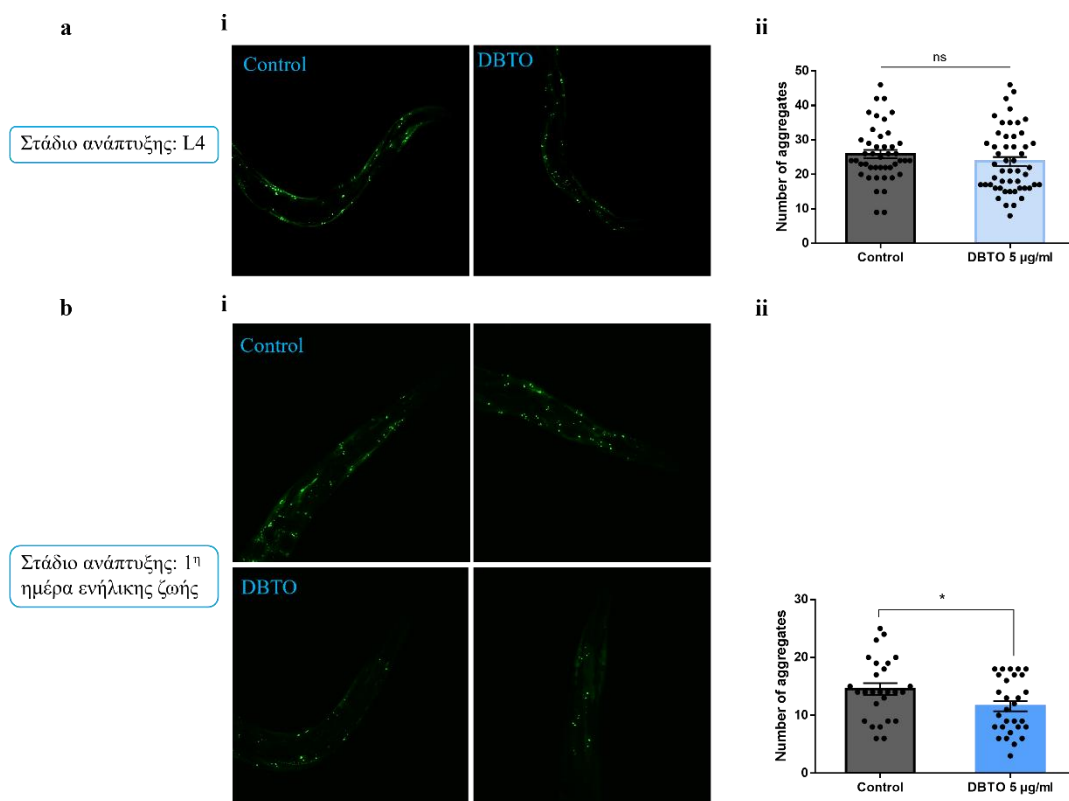
Αυτή η θετική επίδραση του DBTO **Εικόνα 3.17 a**, συνοδεύεται από στατιστικά σημαντική μείωση κατά περίπου 50% των συνολικών επιπέδων του Αβ πεπτιδίου στους σκώληκες που τους χορηγήθηκε DBTO, σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες (**Εικόνα 3.17 b**). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε μικρή μείωση των επιπέδων των ολιγομερών του Αβ πεπτιδίου στους σκώληκες που δέχθηκαν την επίδραση του DBTO σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες, χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (**Εικόνα 3.17 b**).



**Εικόνα 3.17:** Ο μεταβολίτης DBTO επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου μειώνοντας τα συνολικά επίπεδα του Αβ πεπτιδίου στο διαγονιδιακό στέλεχος CL4176. (a) Παρουσιάζεται η καμπύλη παράλυσης του στελέχους CL4176 που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $32.42 \pm 0.18$  (N=2537/2552) ώρες μετά την θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5 µg/ml DBTO παρέλυσε στις  $34.45 \pm 0.18$  (N=2732/2749) ώρες. (b) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες και (ii) ποσοτικοποίηση ανάλυσης dot blot των συνολικών επιπέδων Αβ πεπτιδίου και των επιπέδων των Αβ ολιγομερών σε CL4176 σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 µg/ml DBTO ή στο διαλύτη DMSO (control). Τα ζώα συλλέχθηκαν όταν το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων από το γράφημα (a) είχε παραλύσει. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των Αβ συνολικών πεπτιδίων και ολιγομερών των σκωλήκων που εκτέθηκαν στο DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Για να εκτιμηθεί η κατάσταση της συσσωμάτωσης του Αβ πεπτιδίου *in vivo*, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος CL2331, στο οποίο εκφράζεται ύστερα από αύξηση της θερμοκρασίας το ανθρώπινο Αβ<sub>3-42</sub> πεπτίδιο συζευγμένο με GFP στα μυϊκά κύτταρα των ζώων. Με τον τρόπο αυτό, μπορούμε να οπτικοποιήσουμε τα Αβ συσσωματώματα *in vivo* με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης (Link et al., 2008).

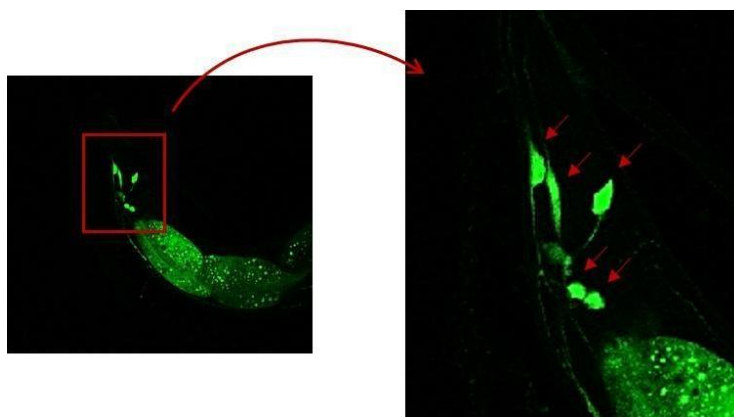
Σε αυτό το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος, μελετήθηκε η επίδραση 5 µg/ml DBTO. Πιο συγκεκριμένα, οι σκώληκες δέχτηκαν την επίδραση 5 µg/ml DBTO είτε του διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4 stage) είτε έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης ώστε να αποκαλυφθεί η επίδραση του μεταβολίτη στη συσσωμάτωση του Αβ πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου στους σκώληκες και των δύο αναπτυξιακών σταδίων (L4 **Εικόνα 3.18 a**, Day 1 of adulthood, **Εικόνα 3.18 b**) παρουσία του μεταβολίτη DBTO σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control). Ωστόσο, στατιστικά σημαντική μείωση της εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση που οι σκώληκες εκτέθηκαν σε DBTO έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (**Εικόνα 3.18 b, ii**). Η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο σταδίων ανάπτυξης, L4 και Day 1 of adulthood, πιθανά οφείλεται στη μεγαλύτερη διάρκεια έκθεσης των διαγονιδιακών σκωλήκων της δεύτερης αναπτυξιακά ομάδας στο μεταβολίτη DBTO.



**Εικόνα 3.18: Ο μεταβολίτης DBTO μειώνει την εναπόθεση των συσσωματωμάτων του  $A\beta_{3-42}$  πεπτιδίου στους μυς του διαγονιδιακού στελέχους CL2331.** (a) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες σκωλήκων που εκφράζουν το ανθρώπινο  $A\beta_{3-42}$  πεπτίδιο συζευγμένο με GFP που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) είτε σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4). Τα συσσωματώματα του  $A\beta_{3-42}$  πεπτιδίου απεικονίζονται ως πράσινες κουκίδες. (ii) Ο μέσος αριθμός των  $A\beta$  συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4) είναι  $25.89 \pm 1.21$  ( $N=44$ ), ενώ ο μέσος αριθμός των  $A\beta$  συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO είναι  $23.76 \pm 1.29$  ( $N=51$ ). (b) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες σκωλήκων που εκφράζουν το ανθρώπινο  $A\beta_{3-42}$  πεπτίδιο συζευγμένο με GFP που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) είτε σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood). (ii) Ο μέσος αριθμός των  $A\beta$  συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη μέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) είναι  $14.56 \pm 1.01$  ( $N=27$ ), ενώ ο μέσος αριθμός των  $A\beta$  συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO είναι  $11.59 \pm 0.88$  ( $N=29$ ) (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022)

Οι γλουταματεργικοί νευρώνες έχει δείχθει να επηρεάζονται αρνητικά από την τοξικότητα που προκαλείται από το  $A\beta$  πεπτίδιο και σταδιακά εκφυλίζονται κατά την εξέλιξη της AD. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε ένα στέλεχος-μοντέλο για την εκτίμηση της  $A\beta$  νευροτοξικότητας στο νηματώδη σκώληκα, το UA198 (Griffin et al., 2018, 2019). Πιο συγκεκριμένα, τα ζώα που ανήκουν στο στέλεχος αυτό εκφράζουν το ανθρώπινο  $A\beta_{1-42}$  πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς νευρώνες τους. Οι πέντε (5) γλουταματεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στην οπίσθια περιοχή και συγκεκριμένα στην ουρά (Εικόνα 3.19) των διαγονιδιακών αυτών ζώων μετρούνται για την εκτίμηση

του νευροεκφυλισμού που προκαλείται λόγω της ύπαρξης του Αβ πεπτιδίου. Οι 5 οπίσθιοι γλουταματεργικοί νευρώνες έχουν επιλεγθεί μεταξύ των υπολοίπων καθώς είναι ανατομικά διακριτοί, μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν και να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης, ενώ επίσης αρχίζουν να παρουσιάζουν σταδιακό εκφυλισμό νωρίς στη ζωή των διαγονιδιακών αυτών σκωλήκων.

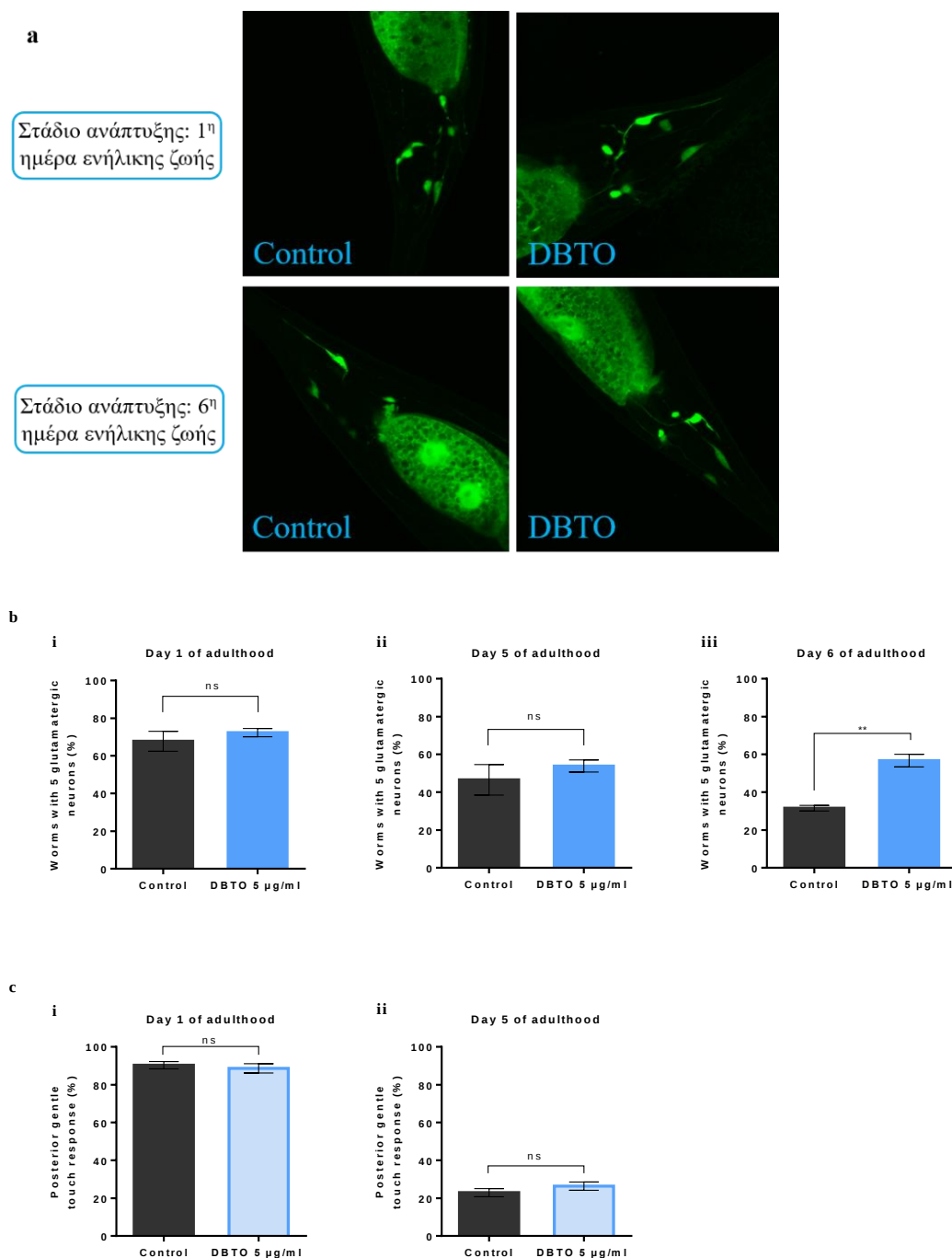


**Εικόνα 3.19:** Αντιπροσωπευτική φωτογραφία νηματώδη σκώληκα του διαγονιδιακού στελέχους *UA198* που εκφράζει το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο συζευγμένο με GFP στους γλουταματεργικούς νευρώνες. Στη φωτογραφία απεικονίζονται οι πέντε (5) γλουταματεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στην οπίσθια περιοχή και συγκεκριμένα στην ουρά των διαγονιδιακών σκωλήκων. Οι νευρώνες αυτοί μετρήθηκαν για να εκτιμηθεί ο νευροεκφυλισμός που υφίστανται εξαιτίας της ύπαρξης του Αβ πεπτιδίου με την πάροδο του χρόνου. Τα βέλη υποδεικνύουν τους φυσιολογικούς νευρώνες.

Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα της **Εικόνα 3.20 b**, περίπου το 70% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη (1<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) εμφανίζουν και τους πέντε οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες, ενώ την πέμπτη (5<sup>η</sup>) (Day 5 of adulthood) και την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα (Day 5 of adulthood) της ενήλικης ζωής, μόλις το 46 και 32% του πληθυσμού των σκωλήκων-μαρτύρων εκφράζει το φυσιολογικό αριθμό νευρώνων, αντίστοιχα. Οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml DBTO εμφανίζουν και τους πέντε οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους σε ποσοστό ίδιο με τους σκώληκες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) ( $p = 0.46$ ) (**Εικόνα 3.20 b, i**). Αντίθετα, την πέμπτη και έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής, οι σκώληκες που τους χορηγήθηκε ο μεταβολίτης DBTO εμφάνισαν περίπου 7% ( $p = 0.43$ ) (**Εικόνα 3.20 b, ii**) και 25% ( $p = 0.02$ ) (**Εικόνα 3.20 b, iii**) λιγότερο νευροεκφυλισμό, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες.

Επιπροσθέτως, η έκφραση του ανθρώπινου Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου στους γλουταματεργικούς νευρώνες των διαγονιδιακών αυτών σκωλήκων επηρεάζει αρνητικά την ευαισθησία των ζώων στα μηχανικά ερεθίσματα (Griffin et al., 2019). Θέλοντας να το διερευνήσουμε στην περίπτωση χορήγησης του DBTO, εκθέσαμε σκώληκες είτε σε 5 μg/ml DBTO είτε στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) και εκτιμήθηκε η

ανταπόκρισή τους σε εξωτερικό μηχανικό ερέθισμα την πρώτη και πέμπτη μέρα της ενήλικης ζωής τους. Πιο συγκεκριμένα, οι σκώληκες αγγίζονται ελαφρώς με τη χρήση μιας βλεφαρίδας στην οπίσθια πλευρά τους και συγκεκριμένα στην περιοχή της ουράς κοντά στην έδρα, και εκτιμάται η αντίδρασή τους στο ερέθισμα από το εάν θα μετακινηθούν έμπροσθεν. Τα αποτελέσματα της *Εικόνα 3.20 c*, επιβεβαιώνουν τη μείωση της ευαισθησίας των διαγονιδιακών σκωλήκων στα μηχανικά ερεθίσματα καθώς οι σκώληκες γηράσκουν, εντούτοις η χορήγηση DBTO δεν βελτίωσε στατιστικά σημαντικά την ανταπόκριση στο ερέθισμα την πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες.

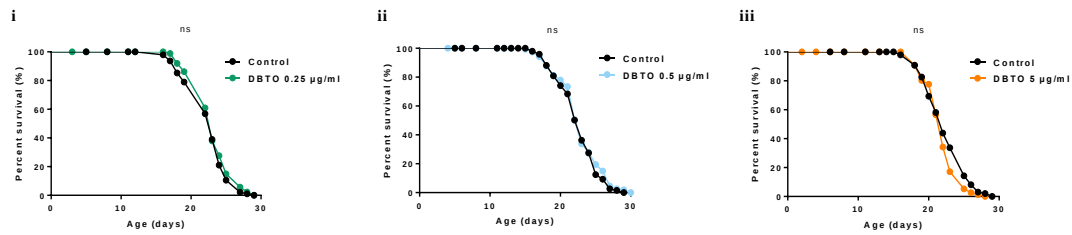


**Εικόνα 3.20: Ο μεταβολίτης DBTO προστατεύει από το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198.** (a) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες όπου απεικονίζονται οι πέντε (5) γλουταματεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στην οπίσθια περιοχή και συγκεκριμένα στην ουρά των διαγονιδιακών UA198 σκωλήκων που εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο συζευγμένο με GFP. (b) (i) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό  $67.76 \pm 5.31\%$ , ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO σε ποσοστό  $72.36 \pm 2.19\%$ . (ii) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 5 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό  $46.53 \pm 8.0 \%$ , ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO σε ποσοστό  $53.83 \pm 3.2\%$ . (iii) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 6 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό  $31.53 \pm 1.53\%$ , ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO σε ποσοστό  $56.67 \pm 3.33\%$ . (c) (i) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) ανταποκρίθηκαν στο μηχανικό ερέθισμα που τους προκλήθηκε στην οπίσθια πλευρά τους σε ποσοστό  $90.33 \pm 1.93\%$ , ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ανταποκρίθηκαν σε ποσοστό  $88.67 \pm 2.44\%$ . (ii) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 5 of adulthood) ανταποκρίθηκαν στο μηχανικό ερέθισμα που τους προκλήθηκε στην οπίσθια πλευρά τους σε ποσοστό  $22.92 \pm 2.15\%$ , ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ανταποκρίθηκαν σε ποσοστό  $26.37 \pm 2.18\%$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

Συνολικά, η χορήγηση του μεταβολίτη DBTO στα διαγονιδιακά για την AD στελέχη του *C. elegans* (CL4176, CL2331 και UA198) προστατεύει τους σκώληκες από την τοξικότητα που προκαλείται από το Αβ πεπτίδιο, καθυστερώντας την έναρξη και το ρυθμό παράλυσης, μειώνοντας την εναπόθεση των Αβ συσσωματωμάτων και περιορίζοντας τον νευροεκφυλισμό των γλουταματεργικών νευρώνων, σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες.

### 3.1.8 Ο μεταβολίτης DBTO βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε οργανισμικό επίπεδο χωρίς παρουσία τοξικότητας

Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος έχει δειχθεί να αυξάνει το προσδόκιμο ζωής οργανισμών-μοντέλων (Chondrogianni, Georgila, et al., 2015; Kruegel et al., 2011; Nguyen et al., 2019; Panagiotidou et al., 2023) προχωρήσαμε στη χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων του DBTO (0.25, 0.5 και 5  $\mu\text{g/ml}$ ) σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους για να αποτιμηθεί η αντιγηραντική δράση του μεταβολίτη σε επίπεδο ενός πολυκύτταρου οργανισμού *in vivo*. Οι σκώληκες μάρτυρες εκτέθηκαν σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις του οργανικού διαλύτη DMSO (control). Όπως παρουσιάζονται και στα γραφήματα της Εικόνα 3.21, δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική θετική επίδραση των συγκεντρώσεων στο προσδόκιμο ζωής των σκουληκιών, παρόλο που παρατηρήθηκε μια τάση στις συγκεντρώσεις 0.25 και 0.5  $\mu\text{g/ml}$ .



**Εικόνα 3.21: Ο μεταβολίτης DBTO δεν αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans*.** Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης των αγρίων τύπου σκωλήκων (N2) που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μεταβολίτη DBTO και σε αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO (control). (i) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 23 (N=98/138) ημέρες και ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκε κατά τη διάρκεια της ζωής τους στον μεταβολίτη DBTO σε συγκέντρωση 0.25 µg/ml είναι 23 (N=87/138) ημέρες. (ii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $22.05 \pm 0.19$  (N=193/282) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκε κατά τη διάρκεια της ζωής τους στον μεταβολίτη DBTO σε συγκέντρωση 0.5 µg/ml είναι  $22.07 \pm 0.18$  (N=154/253) ημέρες. (iii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 22 (N=98/144) ημέρες και ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκε κατά τη διάρκεια της ζωής τους στον μεταβολίτη DBTO σε συγκέντρωση 5 µg/ml είναι 22 (N=76/137) ημέρες (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Δεδομένου ότι μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στην ανάπτυξη φαρμάκων είναι η αξιολόγηση της τοξικότητας των ενώσεων/φαρμάκων σε οργανισμικό επίπεδο (Szymański et al., 2012), θέλαμε να προχωρήσουμε στην εκτίμηση της τοξικότητας του μεταβολίτη DBTO. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε το νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, καθώς αποτελεί έναν πολυκύτταρο οργανισμό μοντέλο που χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια σε δοκιμασίες τοξικότητας (J. Choi, 2008; Hunt, 2017). Πιο συγκεκριμένα, αγρίου τύπου σκώληκες (N2) εκτέθηκαν σε 5 µg/ml DBTO (βέλτιστη συγκέντρωση που προσδίδει νευροπροστατευτική δράση στα μοντέλα *C. elegans* για την AD) ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) και εκτιμήθηκαν η συμπεριφορά σίτισης (καταμέτρηση φαρυγγικού παλμού και καταμέτρηση του ρυθμού κενώσεων), ο αναπτυξιακός ρυθμός των ζώων (καταμέτρηση του χρόνου από την εκκόλαψη των αυγών μέχρι το τέταρτο προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης, L4), η γονιμότητα (καταμέτρηση αριθμού απογόνων), καθώς και ο αριθμός των σκωλήκων που μεταβαίνουν στη dauer προνύμφη (μορφή διάπαυσης λόγω έλλειψης τροφής ή συνθηκών στρες).

Όπως φαίνεται στα δεδομένα του **Πίνακα 3-2**, σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε τρεις δείκτες τοξικότητας. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στη συμπεριφορά σίτισης, ο φαρυγγικός παλμός που καταγράφηκε την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων που δέχθηκαν την επίδραση του DBTO αυξήθηκε, ενώ η διάρκεια μεταξύ δύο διαδοχικών κενώσεων μειώθηκε, σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες. Αναλύοντας κάθε δείκτη ξεχωριστά, οι ρυθμικές συσπάσεις που υφίστανται ο φάρυγγας, οι οποίες επιτρέπουν τη σίτιση των σκωλήκων, έχουν δείχθει να είναι ηλικιο-εξαρτώμενες και να μειώνονται με την πάροδο του χρόνου, αντανakλώντας τη δομή και τη λειτουργία των μυών του φάρυγγα κατά τη γήρανση των σκωλήκων (D. K. Chow et al., 2006; Saul et al., 2021). Αντίθετα, αυξημένος

ρυθμός φαρυγγικού παλμού που καταμετράται από την πρώτη κιάλας ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, γεγονός που παρατηρήθηκε στους σκωλήκες παρουσία του DBTO, έχει συσχετισθεί με αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ζώων (Dhawan et al., 1999), αλλά και με βελτίωση της ευζωίας των σκωλήκων (Cao et al., 2007). Επιπροσθέτως, μειωμένος φαρυγγικός παλμός συνδέεται με την ύπαρξη τοξινών στο περιβάλλον των σκωλήκων καθώς το φαινόμενο αυτό έχει καταγραφεί σε περιπτώσεις όπου οι σκωλήκες εκτέθηκαν σε τοξίνες (Aitlhadj & Stürzenbaum, 2013; Hunt, 2017). Κατά τη διαδικασία της γήρανσης, ο χρόνος μεταξύ των δύο διαδοχικών κενώσεων στους σκωλήκες αυξάνεται (J. J. Collins et al., 2008; Croll et al., 1977). Η μείωση της διάρκειας μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων που καταγράφηκε στους σκωλήκες την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους παρουσία του DBTO μπορεί να μεταφραστεί ως ενίσχυση του τρόπου απομάκρυνσης από τον οργανισμό των επιβλαβών ουσιών (Lieke et al., 2018), υποδηλώνοντας βελτίωση της κατάστασης υγείας των σκωλήκων (C. Huang et al., 2004). Ο συνδυασμός του αυξημένου φαρυγγικού παλμού και της αύξησης του ρυθμού των κενώσεων αντικατοπτρίζει τη συνολική βελτίωση της μεταβολικής κατάστασης των σκωλήκων παρουσία του DBTO. Επίσης, ο αναπτυξιακός ρυθμός των σκωλήκων που τους χορηγήθηκε DBTO παρουσιάστηκε αυξημένος σε σύγκριση με τους σκωλήκες που τους χορηγήθηκε ο οργανικός διαλύτης DMSO (control), χαρακτηριστικό που έχει καταγραφεί σε μακρόβια ζώα (Gao et al., 2024; C. Huang et al., 2004; Marchionni et al., 2020; Rollins et al., 2017). Η γονιμότητα των ζώων, καθώς και ο αριθμός των σκωλήκων που μετέβησαν στην προνύμφη dauer δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων-ελέγχου, υποδηλώνοντας τη μη τοξική δράση του DBTO, καθώς οι δείκτες αυτοί παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και έντονη μεταβλητότητα παρουσία τοξινών (Dhawan et al., 1999; Hunt, 2017; Xiong et al., 2017).

Οι δείκτες τοξικότητας που μελετήθηκαν επιβεβαιώνουν τη μη τοξική δράση του μεταβολίτη DBTO στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων προβλέπει αύξηση των ημερών ευζωίας στους αγρίου τύπου σκωλήκες (N2) κατά τη διαδικασία της γήρανσης παρουσία του DBTO, αφού παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται σε μακρόβια ζώα (C. Huang et al., 2004). Εντούτοις, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε έπειτα από τη συνεχόμενη έκθεση των σκωλήκων στο DBTO καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, παρόλο που καταγράφηκε μια τάση αύξησης του προσδόκιμου ζωής στις δύο από τις τρεις συγκεντρώσεις που ελέγξαμε (0.25 και 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Περισσότερη διερεύνηση χρειάζεται για να αποσαφηνιστεί η επίδραση του DBTO στο προσδόκιμο ζωής *in vivo*.

**Πίνακας 3-2: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  DBTO ή σε DMSO.**

|                                           | Φαρυγγικός<br>παλμός <sup>a, **</sup> | Χρόνος<br>μεταξύ δύο<br>διαδοχικών<br>κενώσεων <sup>β</sup><br>**** | Αναπτυξιακός<br>ρυθμός <sup>γ, *</sup> | Γονιμότητα<br><sup>δ, ns</sup> | Αριθμός<br>σκωλήκων<br>που<br>μεταβαίνουν<br>στη dauer<br>μορφή <sup>ε, ns</sup> |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Control</b>                            | 280.3±2.42                            | 46.54±0.54                                                          | 54.94±0.31                             | 290.8±6.89                     | 0                                                                                |
| <b>DBTO 5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> | 290.4±2.18                            | 42.12±0.45                                                          | 56.69±0.29                             | 300.1±4.38                     | 0                                                                                |

<sup>a</sup> Φαρυγγικός παλμός που καταγράφηκε σε 1 min στην πρώτη μέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων.

<sup>β</sup> Χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών κενώσεων σε seconds.

<sup>γ</sup> Χρόνος από την εκκόλαψη των αυγών έως το τέταρτο στάδιο ανάπτυξης των σκωλήκων.

<sup>δ</sup> Αριθμός απογόνων ανά σκώληκα. 12 ζώα εκτέθηκαν στην ένωση DBTO 5  $\mu\text{g/ml}$  και 13 σκώληκες-μάρτυρες εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control).

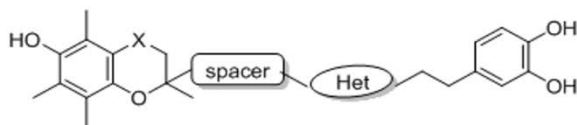
<sup>ε</sup> Αριθμός σκωλήκων που μετέβησαν στην προνύμφη dauer στους 27 °C. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

### 3.2 Συνθετικές ενώσεις

Το δεύτερο μέρος της διδακτορικής διατριβής, αφορά στη μελέτη υβριδικών ενώσεων υδροξυτυροσόλης με ανάλογα χρωμανίου και βιοϊσοστερών του, ως εν δυνάμει ενεργοποιητών του πρωτεασώματος. Η υδροξυτυροσόλη αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική πολυφαινολική ένωση του ελαιολάδου. Απαντάται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς και είναι, μεταξύ άλλων ενώσεων, δευτερογενής μεταβολίτης της ελαιοευρωπαϊνης όταν αυτή υφίσταται ενζυμική υδρόλυση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ελιών (Bertelli et al., 2020; Robles-Almazan et al., 2018). Η υδροξυτυροσόλη έχει χαρακτηριστεί κυρίως για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, ενώ πληθώρα μελετών έχουν αναδείξει τη νευροπροστατευτική, την αντιφλεγμονώδη, την αντικαρκινική και την αντιμικροβιακή της δράση μεταξύ άλλων (Bertelli et al., 2020; Marković et al., 2019; Micheli et al., 2023; Robles-Almazan et al., 2018). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η ελαιοευρωπαϊνή έχει χαρακτηριστεί ως ενεργοποιητής του πρωτεασώματος αυξάνοντας και τις τρεις πρωτεολυτικές του ενεργότητες και επιβραδύνοντας την κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινους, πρωτογενείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες (Katsiki et al., 2007). Το χρωμάνιο είναι μια ετεροκυκλική οργανική ένωση με μοριακό τύπο  $C_9H_{10}O$  που περιέχει άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο. Οι χρωμανικοί δακτύλιοι απαντώνται σε δομές πολύπλοκων ενώσεων, όπως για παράδειγμα η βιταμίνη E. Επιπροσθέτως, ενώσεις οι οποίες περιλαμβάνουν το χρωμανικό δακτύλιο, δηλαδή τη φαρμακοφόρο ομάδα της βιταμίνης E, έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και τη νευροπροστατευτική και αντιγηραντική τους δράση (Koufaki et al., 2011, 2014). Με τον όρο φαρμακοφόρο ομάδα εννοούμε τη διάταξη των χαρακτηριστικών ενός μορίου που ευθύνονται για τη βιολογική του δράση (Tiwari & Singh, 2021). Έτσι, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν από το εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υβριδικές ενώσεις οι οποίες συνδυάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά της υδροξυτυροσόλης και της φαρμακοφόρου ομάδας της βιταμίνης E ή βιοϊσοστερών της, σε ένα μόριο ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητά τους να ενεργοποιούν δομικά το 20S πρωτεάσωμα μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Για τη σύνθεση αυτών των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, Trolox. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν υβριδικές ενώσεις στις οποίες το Trolox και η υδροξυτυροσόλη συνδέθηκαν μέσω τριαζολικού δακτυλίου. Ο τριαζολικός δακτύλιος είναι μια ετεροκυκλική ένωση (Het) που περιέχει έναν πενταμελή ακόρεστο δακτύλιο δύο ατόμων άνθρακα και τριών ατόμων αζώτου. Στα πλαίσια προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών μελετήθηκαν και άλλοι ετερόκυκλοι, όπως το ισοξαζόλιο (αζόλη με άτομο οξυγόνου δίπλα στο αζώτο) (Koufaki et al., 2011, 2014). Η χημική δομή των νέων υβριδικών ενώσεων, που αποτελούν υποψήφιους ενεργοποιητές του πρωτεασώματος, παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.22**.

Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητο να αναφερθούμε στη σημασία του όρου «βιοϊσοστερές». Τα βιοϊσοστερή αποτελούν μια στρατηγική στη

φαρμακευτική χημεία με σκοπό την τροποποίηση ενώσεων-οδηγών στοχεύοντας σε καλύτερη και πιο αποτελεσματική βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα και απλοποιημένη σύνθεση. Πρόκειται, δηλαδή, για ενώσεις που φέρουν χημικές αντικαταστάσεις του αρχικού μοριακού σκελετού, διατηρώντας την ίδια βιολογική δράση (Ciapetti & Giethlen, 2008).



X: CH<sub>2</sub>, S

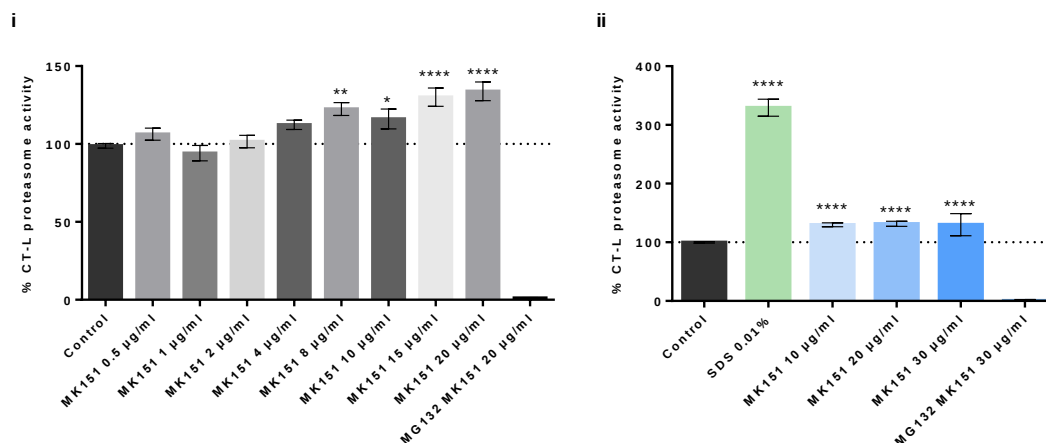
Spacer (Συνδέτης): (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, n = 0-3 ή CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>

Het: 5μελής ακόρεστος ετεροκυκλικός δακτύλιος με τουλάχιστον 1 ετεροάτομο, όπως άζωτο, οξυγόνο ή θείο

**Εικόνα 3.22:** Χημική δομή των νέων υβριδικών ενώσεων.

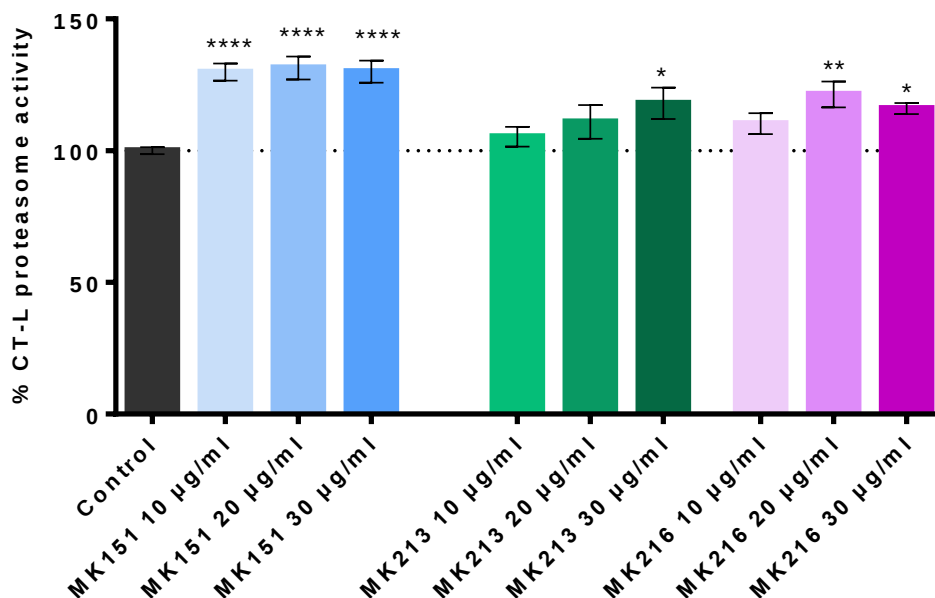
### 3.2.1 Η υβριδική ένωση MK151 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος

Η πρώτη υβριδική ένωση που μελετήσαμε για την ικανότητά της να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα μέσω απευθείας στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό ονομάζεται MK151 (MW 409.48 g/mol). Ελέγχθηκαν συνολικά οκτώ (8) συγκεντρώσεις της MK151 και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DMSO, που αποτελεί και το δείγμα-μάρτυρα (control, έκθεση σε DMSO). Σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.23 i**, η υβριδική ένωση MK151 ενεργοποιεί δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά 1.3 φορές μετά από επώαση του καθαρού 20S πρωτεασώματος με την ένωση σε συγκέντρωση 20 µg/ml (48.84 µM). Σε συνέχεια των ανωτέρω αποτελεσμάτων, ελέγχθηκαν ξανά δύο (2) από τις καλύτερες συγκεντρώσεις (10 και 20 µg/ml) της MK151 που έχουμε δείξει να ενεργοποιούν το καθαρό πρωτεάσωμα απουσία κυτταρικών λυμάτων, καθώς και η συγκέντρωση 30 µg/ml ώστε να διαλευκανθεί η μέγιστη αποδοτική συγκέντρωση της ένωσης. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην **Εικόνα 3.23 ii** έδειξαν ότι η ένωση MK151 ενεργοποιεί δομικά το πρωτεάσωμα με υψηλότερη αποδοτική συγκέντρωση την 20 µg/ml.



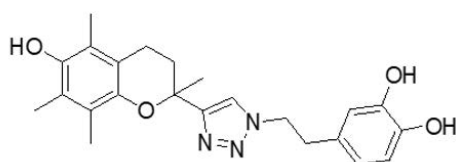
**Εικόνα 3.23: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK151 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος.** Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης MK151. (i) Στη συγκέντρωση 8 µg/ml (πρώτη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $122.5 \pm 4.1$ , στη συγκέντρωση 10 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $116.1 \pm 6.32$ , στη συγκέντρωση 15 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $130.0 \pm 5.85$  και στη συγκέντρωση 20 µg/ml (μέγιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $133.8 \pm 6.01$ . (ii) Στη συγκέντρωση 10 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $129.8 \pm 3.21$ , στη συγκέντρωση 20 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $131.4 \pm 4.33$  και στη συγκέντρωση 30 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $130.0 \pm 4.18$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της διαμόρφωσης της ένωσης MK151 στη δράση, συντέθηκαν τα ισομερή της, R και S (Εικόνα 3.25), μέσω των εμπορικά διαθέσιμων R και S ισομερών του Trolox. Έτσι, για να εξετάσαμε εάν η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος που προκαλείται από την MK151 οφείλεται στην R- ή στην S-ισομορφή της [ενώσεις με ονόματα-κωδικούς MK213 (MW 409.48 g/mol) και MK216 (MW 409.48 g/mol), αντίστοιχα], απομονωμένο, καθαρό ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα επωάστηκε με τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών, καθώς και το αντίστοιχο δείγμα-μάρτυρα όπου το καθαρό πρωτεάσωμα επωάστηκε με το διαλύτη (DMSO). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.24, η ενεργοποίηση που προκαλείται από την ένωση MK151 δεν οφείλεται αποκλειστικά σε μία από τις δύο ισομορφές της, αλλά σε συνδυασμό αυτών, αν και στη συγκέντρωση 20 µg/ml φαίνεται πως η S-ισομορφή (MK216) ίσως να συμβάλει περισσότερο στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος από ότι η R-ισομορφή (MK213).

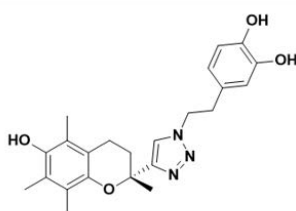


**Εικόνα 3.24:** Η ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK151 με το απομονωμένο, καθαρό ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος οφείλεται στο συνδυασμό των R- και S-ισομερών. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη (DMSO) και στις συγκεντρώσεις 10, 20 και 30 µg/ml των ενώσεων MK151, MK213 και MK216. Στη συγκέντρωση 20 µg/ml, μέγιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση από την ένωση MK151, το ποσοστό ενεργοποίησης της MK151 είναι  $131.4 \pm 4.33$ , της MK213 (R-ισομερές) είναι  $110.9 \pm 6.41$  και της MK216 (S-ισομερές) είναι  $121.3 \pm 4.92$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Συμπερασματικά, η υβριδική ένωση MK151 αυξάνει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του καθαρού ανθρώπινου 20S πρωτεασώματος ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος, υποδεικνύοντας την πιθανή στερεοχημική αλληλεπίδραση της MK151 με το 20S πρωτεάσωμα, καθιστώντας την δομικό ενεργοποιητή αυτού.

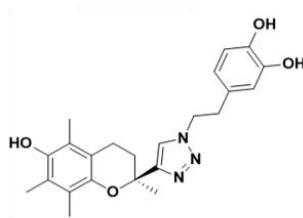


**MK151**



**MK213**

R-ισομερές



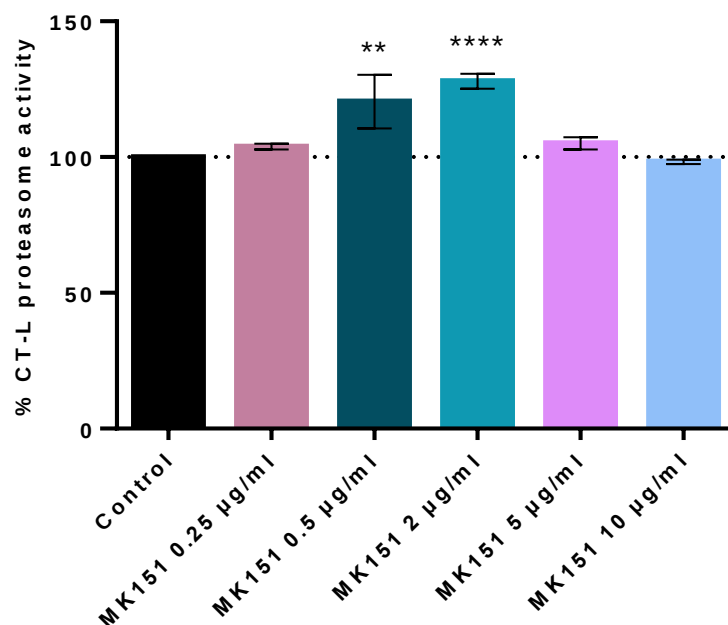
**MK216**

S-ισομερές

**Εικόνα 3.25:** Η χημική δομή της ένωσης MK151 και των ισομερών της, MK213 (R-ισομερές) και MK216 (S-ισομερές).

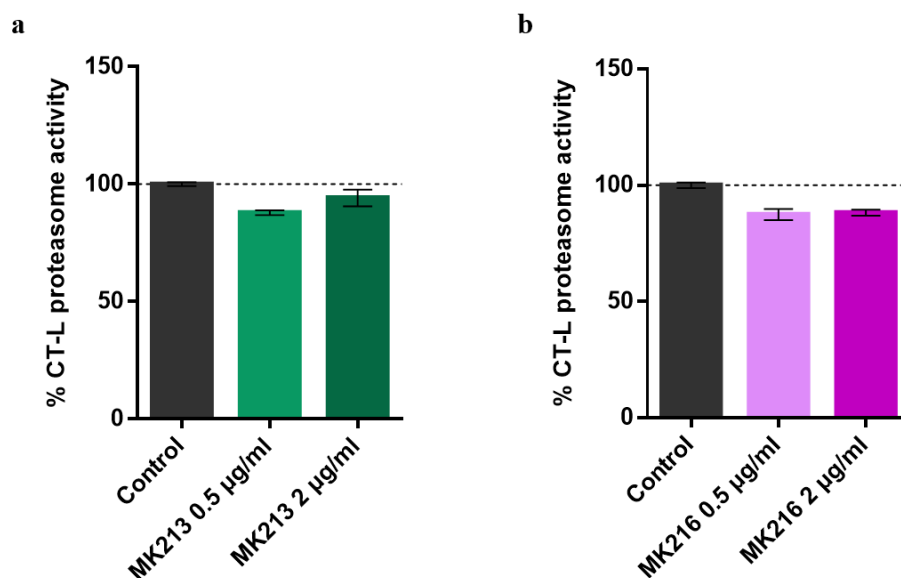
### 3.2.2 Η ένωση MK151 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα σε πρωτογενείς, εμβρυικούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η πρωτεασωμική ενεργοποίηση μπορεί να επιτευχθεί και έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης MK151 στα κύτταρα HFL-1 για αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης *in cellulo*. Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της MK151 για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) αυξάνεται στατιστικά σημαντικά στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  (1.22 και 4.88  $\mu\text{M}$ , αντίστοιχα) σε σύγκριση με εκείνους που εκτέθηκαν μόνο στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) (**Εικόνα 3.26**).



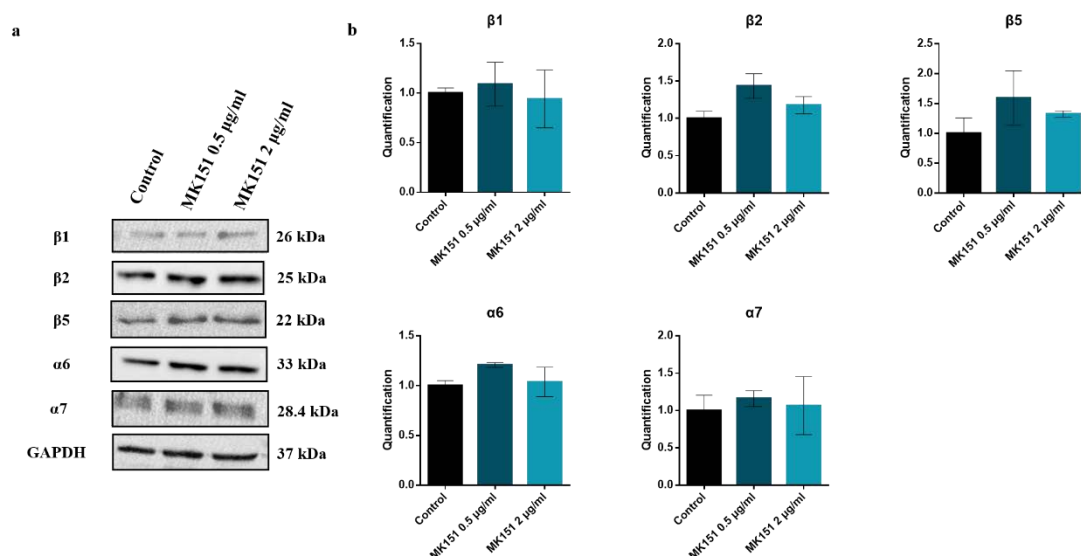
**Εικόνα 3.26:** Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση MK151. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε η ένωση MK151 στις συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 2, 5 και 10 µg/ml για 24 ώρες. Η έκθεση των κυττάρων στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $120.4 \pm 9.91$  και στη συγκέντρωση 2 µg/ml προκάλεσε αύξηση σε ποσοστό  $128.0 \pm 2.75$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Θέλοντας να εξετάσουμε εάν η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος που παρατηρείται έπειτα από τη χορήγηση της MK151 στους HFL-1 ινοβλάστες οφείλεται στην R- ή στην S- ισομορφή της ένωσης, χορηγήσαμε τις MK213 (R-ισομερές) και MK216 (S-ισομερές) στα κύτταρα. Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των δύο ενώσεων στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 µg/ml (συγκεντρώσεις όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας παρουσία της MK151) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.27**, δείχνουν ότι η παρουσία των ενώσεων MK213 και MK216 δεν επηρέασε την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος, υποδηλώνοντας πως η ενεργοποίηση που προκαλείται από την ένωση MK151 δεν οφείλεται αποκλειστικά σε μία από τις δύο ισομορφές της αλλά σε συνδυασμό αυτών, ενισχύοντας παράλληλα τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τα πειράματα με τη χρήση απομονωμένου, καθαρού, ανθρώπινου 20S πρωτεασώματος.



**Εικόνα 3.27:** Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση MK151 οφείλεται στο συνδυασμό των R- και S-ισομερών. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε η ένωση (a) MK213 (R-ισομερές) και (b) MK216 (R-ισομερές) στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 µg/ml για 24 ώρες. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της MK151 σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης του πρωτεασώματος στους HFL-1 ινοβλάστες, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των καταλυτικών β-υπομονάδων ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_5$ ), καθώς και των  $\alpha_6$  και  $\alpha_7$  ρυθμιστικών υπομονάδων του πρωτεασώματος για τις δύο συγκεντρώσεις (0.5 και 2 µg/ml) όπου η χορήγηση της MK151 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος. Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων που εξετάστηκαν (Εικόνα 3.28), υποδηλώνοντας ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στις πρωτεασωμικές ενεργότητες δεν προκύπτουν από αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος και κατ' επέκταση από διαφορές στα επίπεδα του πρωτεασώματος μεταξύ των ομάδων ελέγχου.

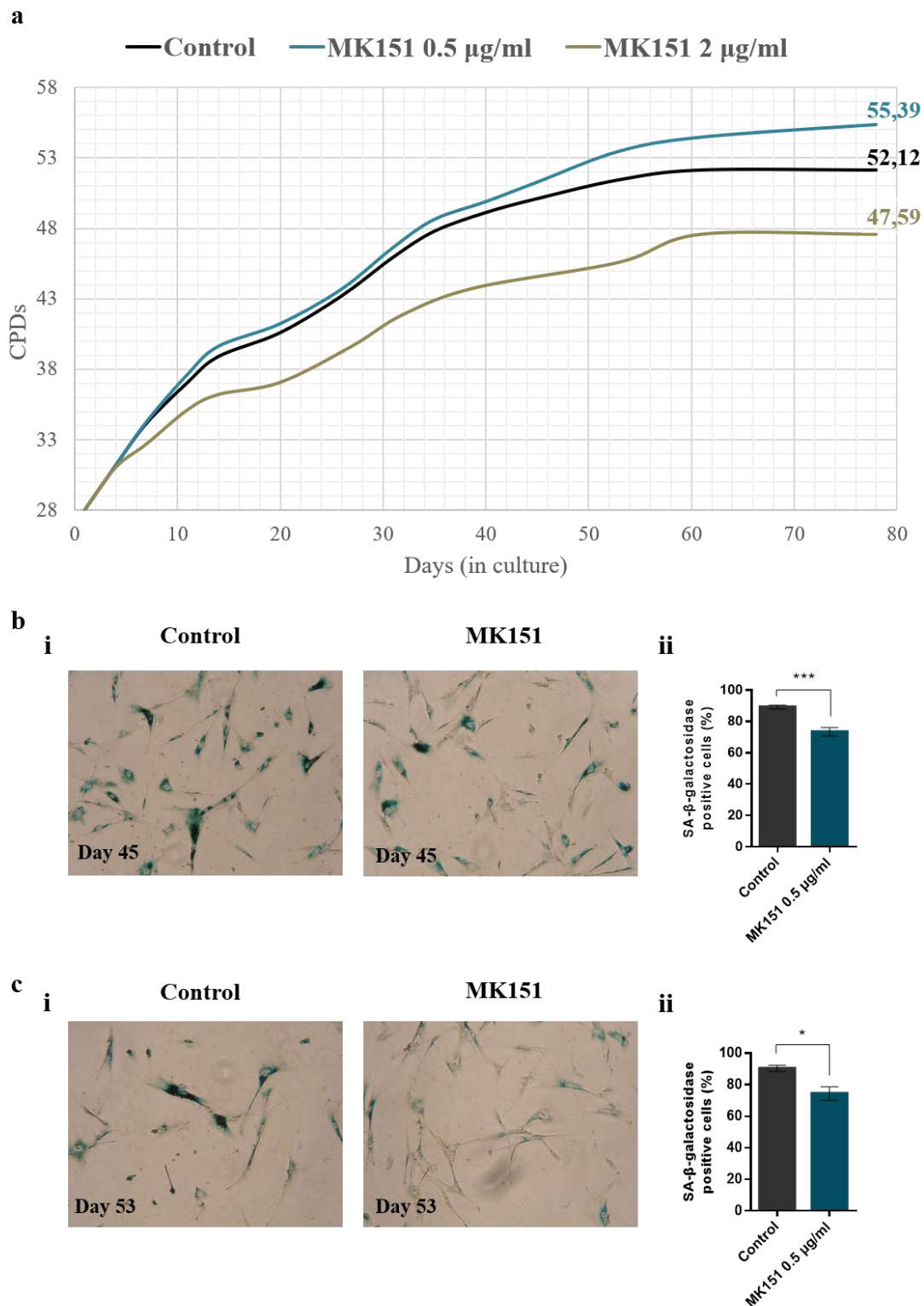


**Εικόνα 3.28:** Η χορήγηση της ένωσης MK151 δε μεταβάλλει την πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος *in cellulo*. (a) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα) και (b) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β2, β5, α6 και α7 σε HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε 0.5 και 2 μg/ml MK151 ή στο διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των υπομονάδων του πρωτεασώματος στα κύτταρα HFL-1 που εκτέθηκαν στο DMSO για 24 ώρες τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από κάθε ανοσοαποτύπωμα. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t*-test.

### 3.2.3 Η ένωση MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Δεδομένης της ικανότητας της ένωσης MK151 να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα τόσο *in vitro*, όσο και *in cellulo*, το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε την επίδραση της χορήγησής της στην εξέλιξη της γήρανσης των HFL-1 ινοβλαστών. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα HFL-1 (CPD 28) εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 μg/ml και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) για να αποτιμηθεί η αντιγηραντική δράση της ουσίας *in vitro*. Οι δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνες που παρουσίασαν αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε κυτταρικό επίπεδο έπειτα από την εικοσιτετράωρη χορήγηση της ένωσης στα ίδια κύτταρα. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνα 3.29 a**, η χορήγηση 0.5 μg/ml MK151 προκάλεσε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τη χορήγηση του διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5 μg/ml MK151 πραγματοποίησαν  $55.39 \pm 0.79$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $52.12 \pm 0.20$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p = 0.001$ ). Αντίθετα, η χορήγηση 2 μg/ml MK151 μείωσε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων, όπου τα κύτταρα πραγματοποίησαν  $47.59 \pm 0.22$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.0001$ ).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης στα κύτταρα που δέχθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους 0.5 µg/ml MK151 είτε το διαλύτη DMSO (control) στο χρονικό σημείο όπου τα κύτταρα-μάρτυρες εμφάνισαν δραματική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (ημέρα 45). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόλο το γεγονός ότι τα κύτταρα που δέχονταν την επίδραση της MK151 είχαν πραγματοποιήσει ήδη περισσότερους διπλασιασμούς από τα κύτταρα-μάρτυρες (MK151 0.5 µg/ml/CPD 51.29, Control/CPD 50.08) παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες που παρουσίασαν σχεδόν εξ' ολοκλήρου θετική χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης (*Εικόνα 3.29 b*). Πιο συγκεκριμένα, την 45<sup>η</sup> ημέρα, και ενώ τα κύτταρα δεχόντουσαν για περίπου ενάμιση μήνα τη συνεχόμενη επίδραση της MK151 ή του DMSO, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάση κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK151 είναι  $0.73 \pm 0.02$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.89 \pm 0.01$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO· διαφορά στατιστικά σημαντική ( $p = 0.0003$ ). Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε και την 53<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας των HFL-1 ινοβλαστών (*Εικόνα 3.29 c*), όπου ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάση κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK151 είναι  $0.74 \pm 0.04$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.90 \pm 0.02$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.01$ ). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η συνεχόμενη επίδραση 0.5 µg/ml MK151 διατηρεί το νεαρό φαινότυπο των κυττάρων και την καλύτερη μορφολογία τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.



**Εικόνα 3.29:** Η ένωση MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των πρωτογενών εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ένωση ή στο διαλύτη για 78

συνεχόμενες ημέρες. (b, c) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 μg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για (b) 45 και (c) 53 συνεχόμενες ημέρες. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

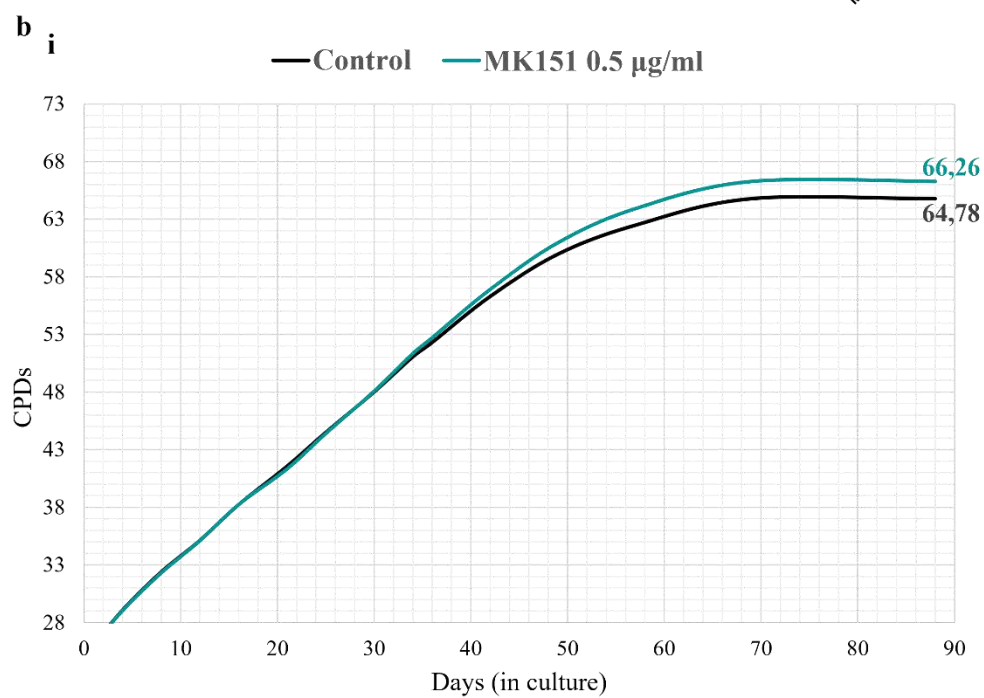
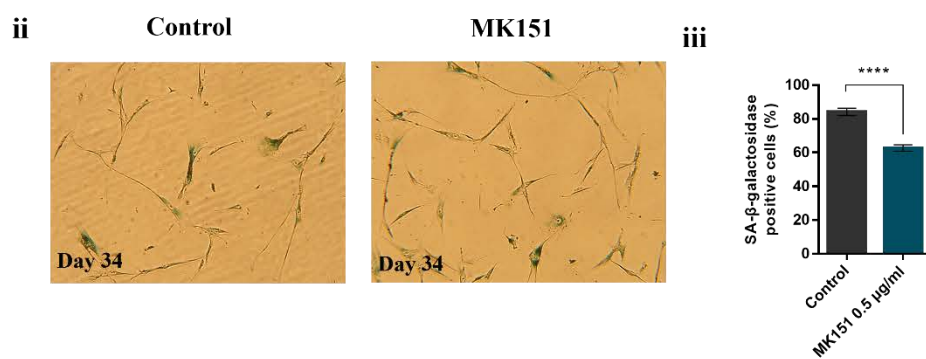
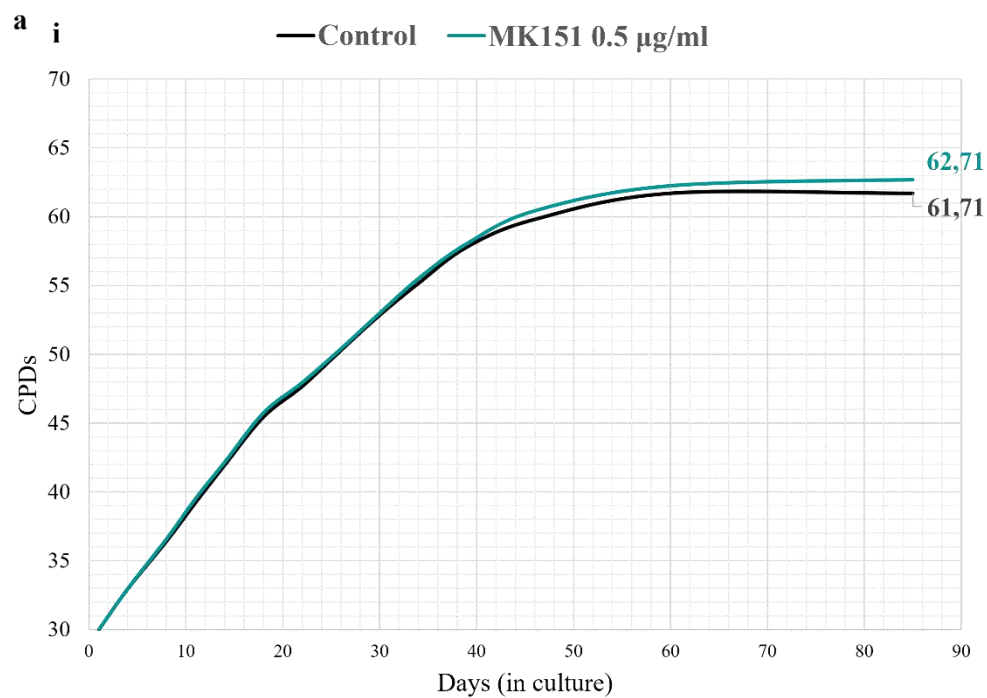
Παράλληλα, θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τη θετική επίδραση της χορήγησης της ένωσης MK151 στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, επαναλάβουμε το παραπάνω πείραμα προχωρώντας σε χορήγηση 0.5 μg/ml MK151 σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους έως ότου ολοκληρώσουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.30**, επιβεβαίωσαν ότι η παρουσία της ένωσης MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής κατά μερικούς κυτταρικούς διπλασιασμούς [ $\sim 1$  διπλασιασμός (**Εικόνα 3.30 a, i**) και  $\sim 2$  διπλασιασμοί (**Εικόνα 3.30 b, i**)]. Πιο συγκεκριμένα, στο γράφημα της **Εικόνα 3.30 a, i**, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5 μg/ml MK151 πραγματοποίησαν  $62.71 \pm 0.12$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $61.54 \pm 0.16$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p = 0.019$ ). Επιπροσθέτως, όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.30 b, i**, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5 μg/ml MK151 πραγματοποίησαν  $66.26 \pm 0.13$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $64.78 \pm 0.08$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.0001$ ). Αν και η διαφορά στον αριθμό των κυτταρικών διπλασιασμών μεταξύ των ομάδων ελέγχου δεν είναι πολύ μεγάλη, είναι ξεκάθαρο πως οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων διαφοροποιούνται εξ' αρχής και πως τα κύτταρα παρουσία της MK151 πολλαπλασιάζονται καλύτερα από τα κύτταρα-μάρτυρες σε κάθε χρονικό σημείο από την πρώτη στιγμή που εμφανίζουν διαφορές.

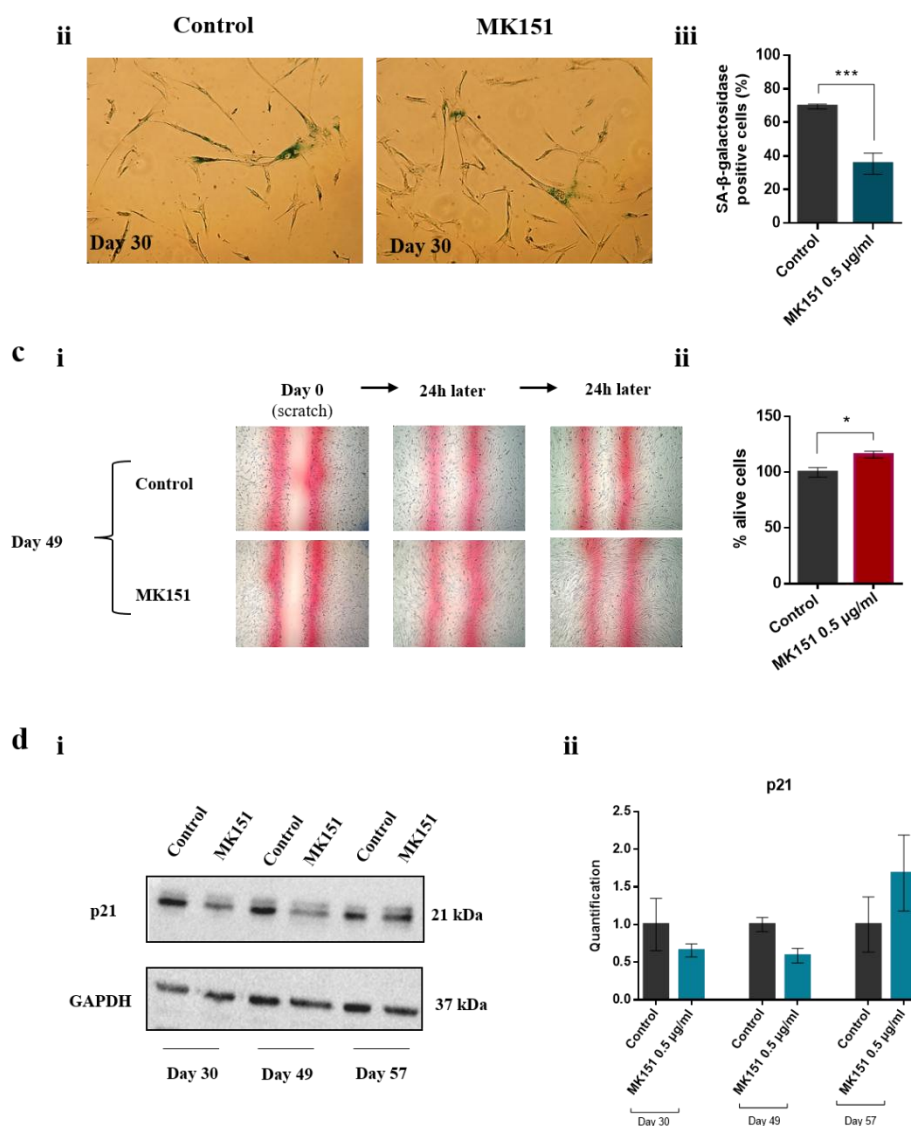
Θέλοντας να το διερευνήσουμε περαιτέρω, προχωρήσαμε στον έλεγχο ορισμένων δεικτών κυτταρικής ευζωίας (healthspan). Αρχικά, πραγματοποιήσαμε τη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς κυττάρων (παρουσία MK151 και παρουσία του διαλύτη DMSO) στο χρονικό σημείο όπου τα κύτταρα-μάρτυρες άρχιζαν να εμφανίζουν μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόλο το γεγονός ότι τα κύτταρα που δέχονταν την επίδραση της MK151 είχαν πραγματοποιήσει τους ίδιους διπλασιασμούς με τα κύτταρα μάρτυρες [Control/CPD 55.17, MK151/CPD 55.52 (**Εικόνα 3.30 a, ii**), Control/CPD 48.00, MK151/CPD 48.06 (**Εικόνα 3.30 b, ii**)] παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, την 34<sup>η</sup> ημέρα, και ενώ τα κύτταρα δεχόντουσαν την επίδραση της MK151 ή του DMSO για περίπου ένα μήνα, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK151 είναι  $0.62 \pm 0.01$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.84 \pm 0.02$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p < 0.0001$ ) (**Εικόνα 3.30 a ii, iii**). Η διαφορά αυτή επαναλήφθηκε, όπου έπειτα από χορήγηση της MK151 για 30 συνεχόμενες ημέρες, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK151 είναι  $0.35 \pm 0.06$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.69 \pm 0.01$  των κυττάρων που

τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.0008$ ) (*Εικόνα 3.30 b ii, iii*). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως τα κύτταρα που δέχονται την επίδραση της MK151 διατηρούν το νεαρό τους φαινότυπο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία scratch assay (C.-C. Liang et al., 2007). Η χορήγηση της MK151 στους HFL-1 ινοβλάστες για 49 συνεχόμενες ημέρες επιτάχυνε το «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (*Εικόνα 3.30 c, i*). Το γεγονός αυτό, επαληθεύεται και από τον στατιστικά σημαντικά ενισχυμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που καταγράφηκε έπειτα από τη χρώση Crystal violet στα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση της MK151 σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες την ίδια χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκε το scratch assay (ημέρα 49) (*Εικόνα 3.30 c, ii*). Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με το μειωμένο αριθμό κυττάρων θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης παρουσία της MK151, υποδηλώνουν πως η χορήγηση της MK151 οδηγεί σε διατήρηση του νεανικού φαινοτύπου των κυττάρων καθώς και του πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα που τους χορηγήθηκε ο διαλύτης DMSO.

Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση της πρωτεΐνης p21<sup>CIP1/WAF1</sup> κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Σύμφωνα με την *Εικόνα 3.30 d*, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της p21 έπειτα από 30 και 49 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης της ένωσης MK151 στους HFL-1 ινοβλάστες, σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στον οργανικό διαλύτη DMSO (control). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το μειωμένο ποσοστό θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων καθώς και το ενισχυμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων, υποδεικνύει πως η παρουσία της MK151 καθυστερεί την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου. Η αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p21 που παρατηρείται την 57<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία της MK151, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα κύτταρα εισέρχονται στο σημείο της μη αντιστρεπτής παύσης του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού. Την 88<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας των κυττάρων, η έκφραση της πρωτεΐνης p21 εμφανίζεται μειωμένη και στους δύο πληθυσμούς κυττάρων (*Εικόνα 6.2*), αφού η παύση του κυτταρικού κύκλου κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση έχει επιτευχθεί.





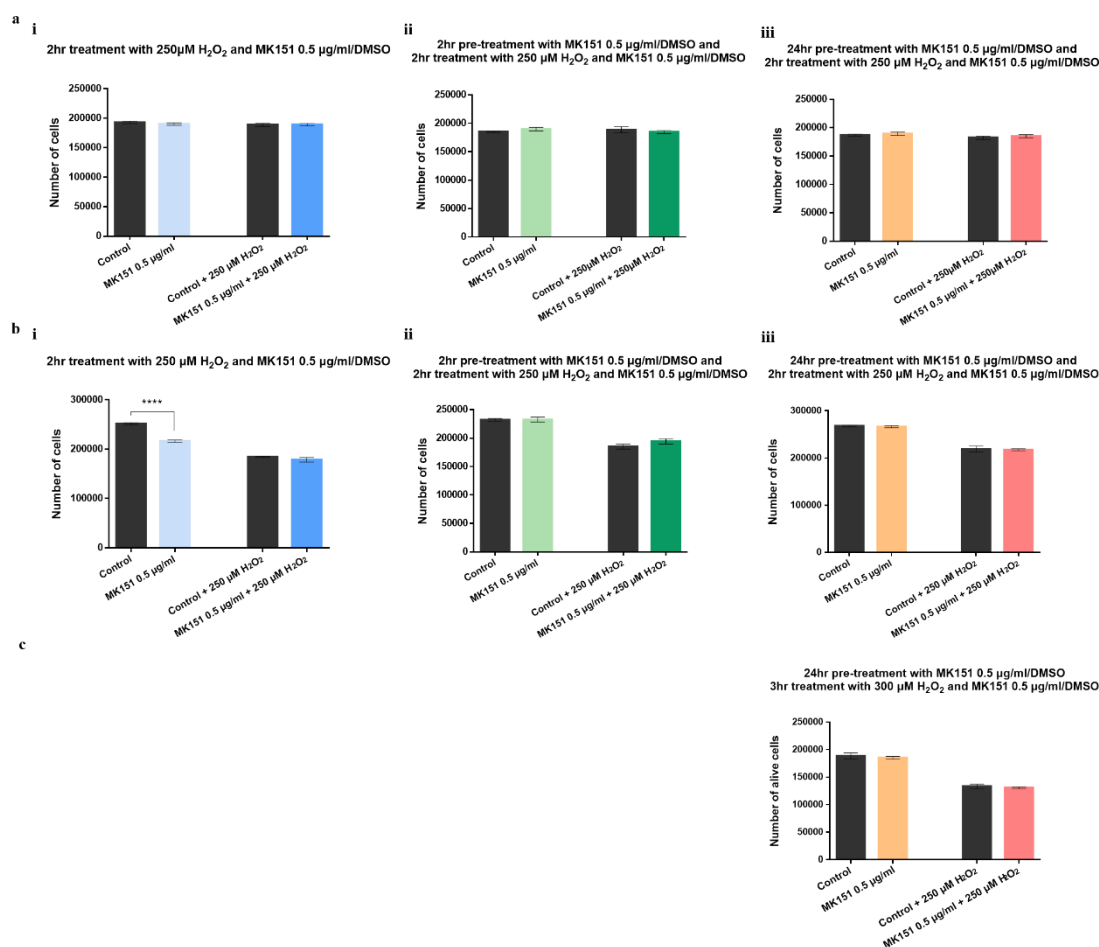
**Εικόνα 3.30: Η ένωση MK151 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου.** (a) (i) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 85 συνεχόμενες ημέρες. (ii) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (iii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για 34 συνεχόμενες ημέρες. (b) (i) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 88 συνεχόμενες ημέρες. (ii) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (iii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για 30 συνεχόμενες ημέρες. (c) (i) Αντιπροσωπευτικές

φωτογραφίες του κλεισίματος της «τεχνητής πληγής» HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για 49 συνεχόμενες ημέρες. Οι κόκκινες γραμμές εσωκλείουν την περιοχή της «τεχνητής πληγής». (ii) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) των ζωντανών κυττάρων έπειτα από χρώση με Crystal violet των HFL-1 ινοβλαστών που τους χορηγήθηκε 0.5 µg/ml MK151 ή ο διαλύτης DMSO (control) για 49 συνεχόμενες ημέρες. Η μέση τιμή της απορρόφησης των κυττάρων που δέχθηκαν τον διαλύτη DMSO (control) τέθηκε αυθαίρετα ως 100%. (d) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για 30, 49 και 57 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης της p21 στους ανθρώπινους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από το ανοσοαποτύπωμα. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

### 3.2.4 Η ένωση MK151 δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση *in vitro*

Δεδομένου ότι το πρωτεάσωμα αποτελεί έναν από τους βασικότερους κυτταρικούς μηχανισμούς απόκρισης στο οξειδωτικό στρες (Pickering & Davies, 2012; Raynes et al., 2016) θέλαμε να ελέγξουμε εάν η πρωτεασωμική ενεργοποίηση που προκαλείται παρουσία της ένωσης MK151 είναι ικανή να προστατεύσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία οξειδωτικού στρες. Για το σκοπό αυτό, νεαροί HFL-1 ινοβλάστες εκτέθηκαν σε διάφορες δόσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η κυτταρική επιβίωση μέσω της μέτρησης των ζωντανών κυττάρων.

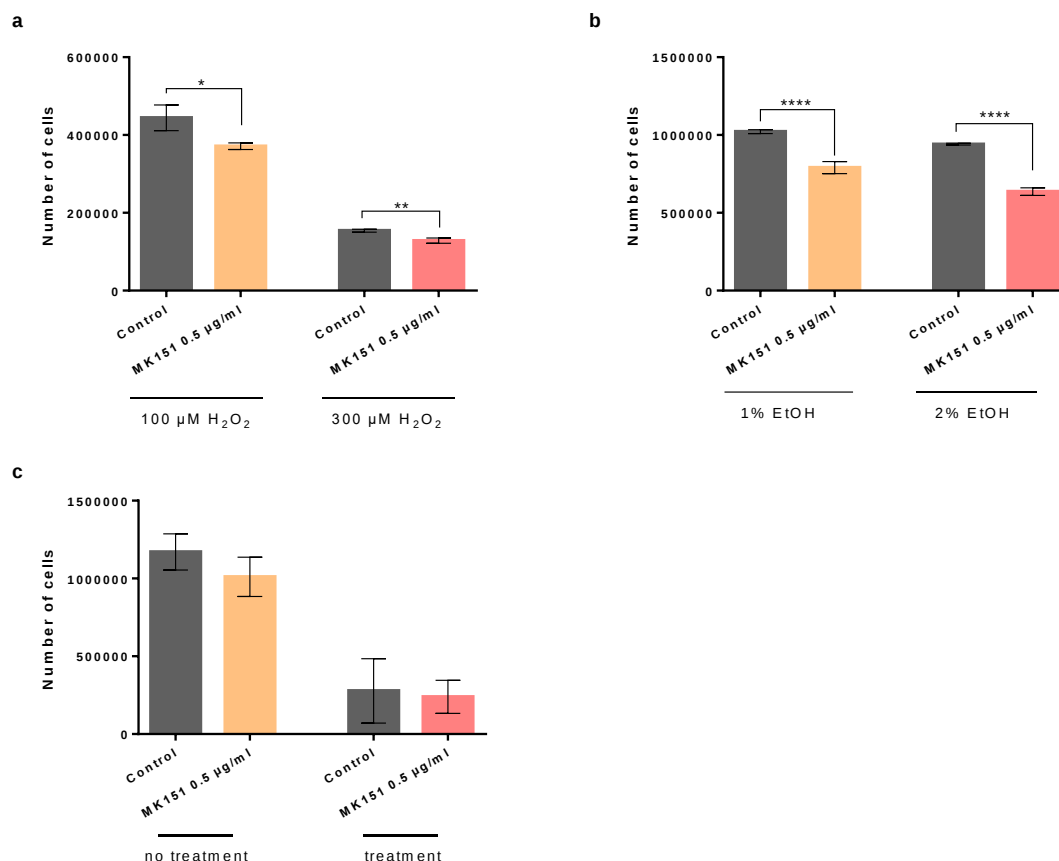
Ειδικότερα, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml MK151 ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για 0, 2 ή 24 ώρες και στη συνέχεια δέχτηκαν την επίδραση 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για δύο (2) ώρες με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας 0.5 µg/ml MK151 ή DMSO (control). Μετά το πέρας των 2 ωρών, μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.31 a**, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων-ελέγχου. Στη συνέχεια, το πείραμα επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι ακολούθησε εικοσιτετράωρη περίοδος ανάκαμψης των κυττάρων παρουσία 0.5 µg/ml MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) έπειτα από την επίδραση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.31 b**, δεν παρατηρήθηκε και πάλι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων-ελέγχου. Τέλος, HFL-1 ινοβλάστες εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml MK151 ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες και στη συνέχεια δέχτηκαν την επίδραση 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για τρεις (3) ώρες με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας 0.5 µg/ml MK151 ή διαλύτη DMSO (control). Ακολούθησε εικοσιτετράωρη περίοδος ανάκαμψης των κυττάρων από την επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όπου τους χορηγήθηκε 0.5 µg/ml MK151 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control) και ύστερα μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων για την εκτίμηση της κυτταρικής επιβίωσης. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσία της MK151 (**Εικόνα 3.31 c**).



**Εικόνα 3.31:** Η χορήγηση της ένωσης MK151 δεν επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση των πρωτογενών, εμβρυικών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου έπειτα από την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml MK151 ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για (i) 0, (ii) 2 ή (iii) 24 ώρες και στη συνέχεια δέχτηκαν την επίδραση 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για δύο (2) ώρες με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας 0.5 µg/ml MK151 ή διαλύτη DMSO (control). Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο αριθμός των κυττάρων που επιβίωσαν και πολλαπλασιάστηκαν (a) αμέσως μετά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και (b) ύστερα από εικοσιτετράωρη ανάκαμψη παρουσία 0.5 µg/ml MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control). (c) Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml MK151 ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες και στη συνέχεια δέχτηκαν την επίδραση 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για τρεις (3) ώρες με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας 0.5 µg/ml MK151 ή διαλύτη DMSO (control). Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο αριθμός των κυττάρων που επιβίωσαν και πολλαπλασιάστηκαν ύστερα από εικοσιτετράωρη ανάκαμψη παρουσία 0.5 µg/ml MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control). Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα HFL-1 εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml MK151 ή στο διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες και έπειτα δέχτηκαν την επίδραση διαφορετικών μορφών οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, δέχτηκαν την επίδραση 100 ή 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Εικόνα 3.32 a), 1 ή 2% αιθανόλη (EtOH) (Εικόνα 3.32 b) ή της οξείδωσης που καταλύεται από μέταλλα (metal catalyzed oxidation) (Εικόνα 3.32 c) για δύο μισή ώρα με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας 0.5 µg/ml MK151 ή του διαλύτη DMSO (control). Μετά το πέρας των δύο μισή ωρών, ακολούθησε επταήμερη περίοδος

ανάκαμψης των κυττάρων από την επίδραση του οξειδωτικού στρες με παρουσία 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) στο μέσο καλλιέργειας. Εντούτοις, όπως φαίνεται και στα γραφήματα της **Εικόνα 3.32**, η χορήγηση της ένωσης MK151 δεν προστάτευσε στατιστικά σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα.

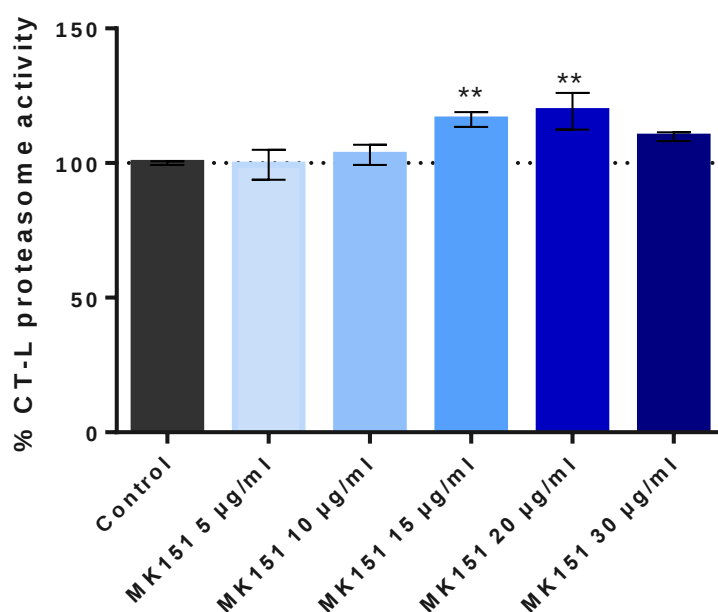


**Εικόνα 3.32:** Η χορήγηση της ένωσης MK151 δεν προστατεύει τους πρωτογενείς, εμβρυικούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου έπειτα από την επίδραση με παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες και στη συνέχεια δέχτηκαν την επίδραση (a) 100 ή 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (b) 1 ή 2% αιθανόλη (EtOH) και (c) οξείδωση που καταλύεται από μέταλλα για δύομιση ώρες με ταυτόχρονη παρουσία στο μέσο καλλιέργειας 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή διαλύτη DMSO (control) και ύστερα από επτάήμερη ανάκαμψη παρουσία 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) εκτιμήθηκε η κυτταρική επιβίωση μέσω της μέτρησης των ζωντανών κυττάρων. Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο αριθμός των κυττάρων που επιβίωσαν και πολλαπλασιάστηκαν ύστερα από επτάήμερη ανάκαμψη παρουσία 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control). Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

Συνολικά, παρόλο που η ένωση MK151 ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα τόσο *in vitro* όσο και *in cellulo*, η παρουσία της στις δοκιμές οξειδωτικού στρες που πραγματοποιήσαμε δεν φαίνεται να προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.

### 3.2.5 Η ένωση MK151 βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε οργανισμικό επίπεδο χωρίς παρουσία τοξικότητας

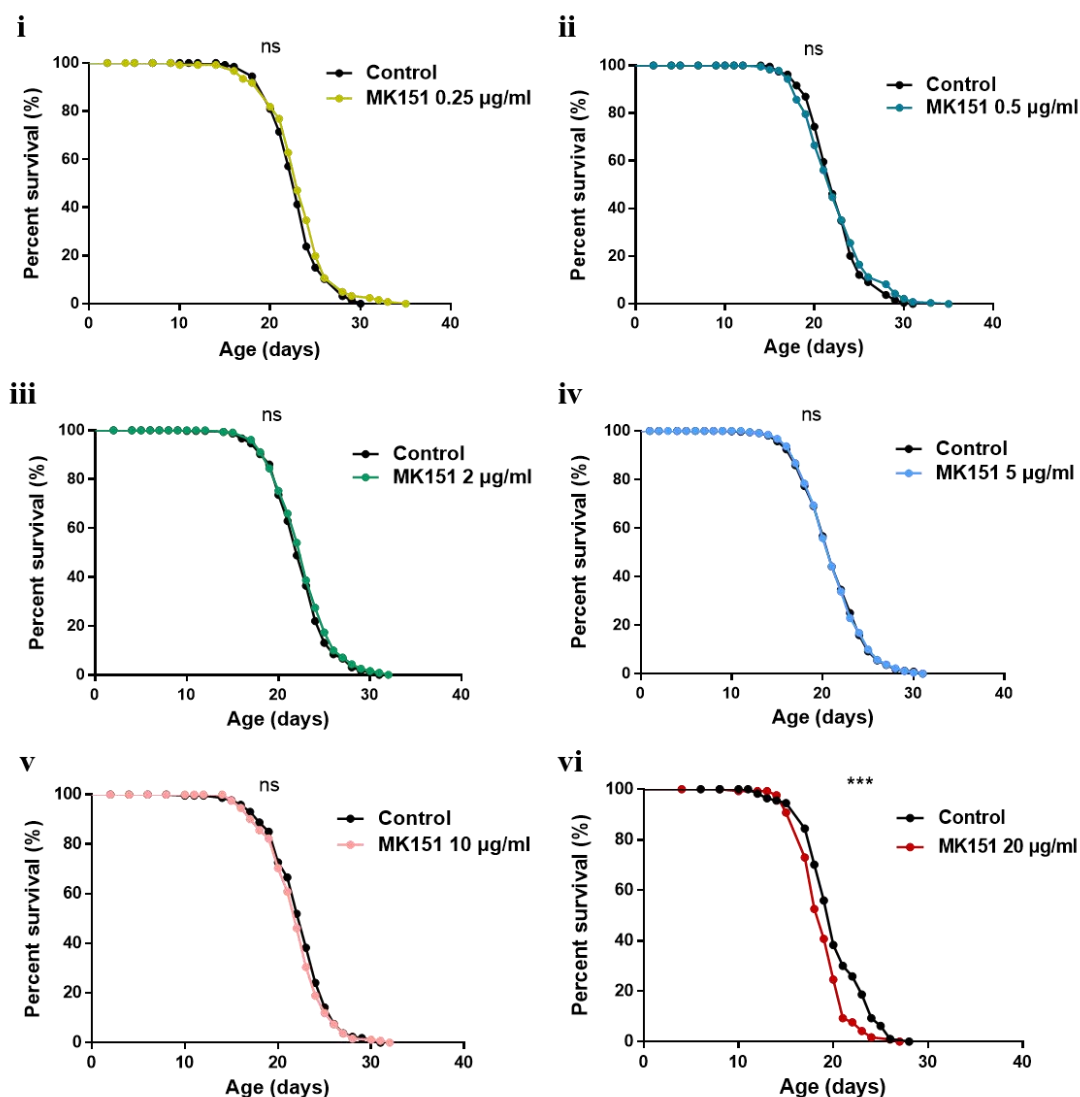
Στη συνέχεια, θέλαμε να εξετάσουμε εάν η ένωση MK151 μπορεί να επάγει πρωτεασωματική ενεργοποίηση στον πολυκύτταρο οργανισμό *C. elegans in vivo*. Χρησιμοποιήσαμε νηματώδεις σκώληκες αγρίου τύπου (N2) στους οποίους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης MK151. Οι σκώληκες δέχτηκαν την επίδραση 5, 10, 15, 20 και 30  $\mu\text{g/ml}$  MK151 από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την πρώτη (1<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους και συλλέχθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών και αποτίμηση της πρωτεασωματικής ενεργότητας. Αντίστοιχα, οι σκώληκες-μάρτυρες εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεασωματική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) αυξάνεται στατιστικά σημαντικά περίπου κατά 1.2 φορές στους σκώληκες που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες που είχαν εκτεθεί μόνο στο διαλύτη DMSO (control). Μάλιστα, η ενεργοποίηση φτάνει το μέγιστο ποσοστό στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$ , ενώ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από αυτή (30  $\mu\text{g/ml}$ ) η ενεργοποίηση εμφανίστηκε μειωμένη (**Εικόνα 3.33**).



**Εικόνα 3.33: Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* μετά από έκθεση στην ένωση MK151.** Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε αγρίου τύπου σκώληκες (N2) που τους χορηγήθηκε η MK151 στις συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20 και 30  $\mu\text{g/ml}$ . Η έκθεση των ζώων στη συγκέντρωση 15  $\mu\text{g/ml}$  προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $116.2 \pm 2.71$ , ενώ η έκθεση στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $119.3 \pm 6.79$ . Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Έπειτα, προχωρήσαμε στη χορήγηση της καλύτερης, όσον αφορά στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, συγκέντρωσης (20  $\mu\text{g/ml}$ ) στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* ώστε να ελέγξουμε την επίδραση της ένωσης στη διάρκεια ζωής των ζώων. Για το

σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου στέλεχος (N2). Όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα της **Εικόνα 3.34 vi**, το προσδόκιμο ζωής του *C. elegans* επηρεάστηκε αρνητικά παρουσία 20 µg/ml MK151 (48.84 µM), και μάλιστα το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό. Επειδή οι σκώληκες που χρησιμοποιούνται για να εκτιμηθεί η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος *in vivo* συλλέγονται σε πολύ πρώιμο στάδιο (νεαρά άτομα που μόλις έχουν φθάσει στην 1<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής τους), η έκθεσή τους σε 20 µg/ml MK151 πιθανά να είναι επαρκής ώστε να φανεί η επίδραση της ένωσης στη δραστικότητα του πρωτεασώματος, ωστόσο η συγκέντρωση αυτή να είναι πολύ μεγάλη για τον παρατεταμένο χρόνο έκθεσης των σκωλήκων κατά την ανάλυση του προσδόκιμου ζωής. Προκειμένου, λοιπόν, να αποτιμηθεί περαιτέρω η αντιγηραντική δράση της ένωσης, προχωρήσαμε στη χορήγηση μικρότερων συγκεντρώσεων MK151 σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα γραφήματα της **Εικόνα 3.34**, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική επίδραση των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν στο προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων. Ωστόσο, οι σκώληκες που δέχθηκαν την επίδραση της MK151 στη συγκέντρωση 2 µg/ml (4,88 µM) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, παρουσίασαν πιο νεανική μορφολογία και βελτιωμένη κινητικότητα σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες που είχαν εκτεθεί μόνο στο διαλύτη DMSO. Αυτά τα χαρακτηριστικά παραπέμπουν σε βελτιωμένη ευζωία (healthspan) και για αυτό προχωρήσαμε στην εκτίμηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των σκωλήκων για τη συγκέντρωση αυτή. Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκαν η συμπεριφορά σίτισης (καταμέτρηση φαρυγγικού παλμού και καταμέτρηση του ρυθμού κενώσεων), ο αναπτυξιακός ρυθμός των ζώων (καταμέτρηση του χρόνου από την εκκόλαψη των αυγών μέχρι το τέταρτο προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης, L4), η γονιμότητα (καταμέτρηση αριθμού απογόνων), καθώς και ο αριθμός σκωλήκων που μεταβαίνουν στην προνύμφη dauer (μορφή διάπαυσης λόγω έλλειψης τροφής ή συνθηκών στρες).



**Εικόνα 3.34: Η ένωση MK151 δεν αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans*.** Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης των αγρίων τύπου σκωλήκων (N2) που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης MK151 και σε αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO (control). (i) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 23 (N=126/142) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν κατά τη διάρκεια της ζωής τους στην ένωση MK151 σε συγκέντρωση 0.25 µg/ml είναι 23 ημέρες (N=121/137). (ii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $21.80 \pm 0.17$  (N=238/286) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 σε συγκέντρωση 0.5 µg/ml είναι  $21.59 \pm 0.21$  ημέρες (N=230/278). (iii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $21.95 \pm 0.16$  (N=450/540) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 σε συγκέντρωση 2 µg/ml είναι  $22.19 \pm 0.17$  ημέρες (N=437/524). (iv) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $20.59 \pm 0.19$  (N=590/791) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 σε συγκέντρωση 5 µg/ml είναι  $20.54 \pm 0.19$  ημέρες (N=643/843). (v) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $22.11 \pm 0.18$  (N=212/254) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 σε συγκέντρωση 10 µg/ml είναι  $21.77 \pm 0.18$  ημέρες (N=243/283). (vi) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 20 (N=98/142) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 σε συγκέντρωση 20 µg/ml είναι 19 ημέρες (N=118/142).

Όπως φαίνεται στα δεδομένα του **Πίνακα 3-3**, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αναπτυξιακό ρυθμό των ζώων, στη γονιμότητα και στον αριθμό των σκωλήκων που μεταβαίνουν στη προνύμφη dauer. Οι τρεις αυτοί φαινοτυπικοί δείκτες παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και έντονη μεταβλητότητα όταν παρευρίσκονται τοξίνες στο περιβάλλον των σκωλήκων, γεγονός που υποδηλώνει μη τοξική δράση της ένωσης MK151. Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική αύξηση παρουσιάστηκε στο ρυθμό του φαρυγγικού παλμού και στο χρονικό διάστημα μεταξύ των κενώσεων των σκωλήκων που τους χορηγήθηκε 2 µg/ml MK151 σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες (control). Η αύξηση του ρυθμού του φαρυγγικού παλμού που παρατηρείται από την πρώτη κιόλας ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων έχει συσχετισθεί με αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ζώων (Dhawan et al., 1999; C. Huang et al., 2004) και βελτίωση της ευζωίας των σκωλήκων (Cao et al., 2007). Εντούτοις, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αύξηση του χρονικού διαστήματος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων υποδηλώνει παρουσία τοξινών (Aitlhadj & Stürzenbaum, 2013). Η μικρή αύξηση που παρατηρείται παρουσία της MK151 συνάδει με χαμηλή, αλλά ενδεχόμενη, τοξικότητα. Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω τη συμπεριφορά των συγκεκριμένων δεικτών κατά τη γήρανση, μελετήσαμε το ρυθμό του φαρυγγικού παλμού και τη διάρκεια των διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) την τρίτη (3<sup>η</sup>) και έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους.

**Πίνακας 3-3: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* που εκτέθηκαν σε 2 µg/ml MK151 ή σε DMSO.**

|                          | Φαρυγγικός<br>παλμός <sup>a, **</sup> | Χρόνος<br>μεταξύ δύο<br>διαδοχικών<br>κενώσεων <sup>β</sup><br>**** | Αναπτυξιακός<br>ρυθμός <sup>γ, *</sup> | Γονιμότητα<br><sup>δ, ns</sup> | Αριθμός<br>σκωλήκων<br>που<br>μεταβαίνουν<br>στη dauer<br>μορφή <sup>ε, ns</sup> |
|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Control</b>           | 250.8±2.50                            | 50.70±0.50                                                          | 55.92±0.26                             | 281.1±5.18                     | 0                                                                                |
| <b>MK151<br/>2 µg/ml</b> | 268.8±2.33                            | 53.40±0.89                                                          | 56.08±0.38                             | 276.1±6.04                     | 0                                                                                |

<sup>a</sup> Φαρυγγικός παλμός που καταγράφηκε σε 1 min στην πρώτη μέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων.

<sup>β</sup> Χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών κενώσεων σε seconds.

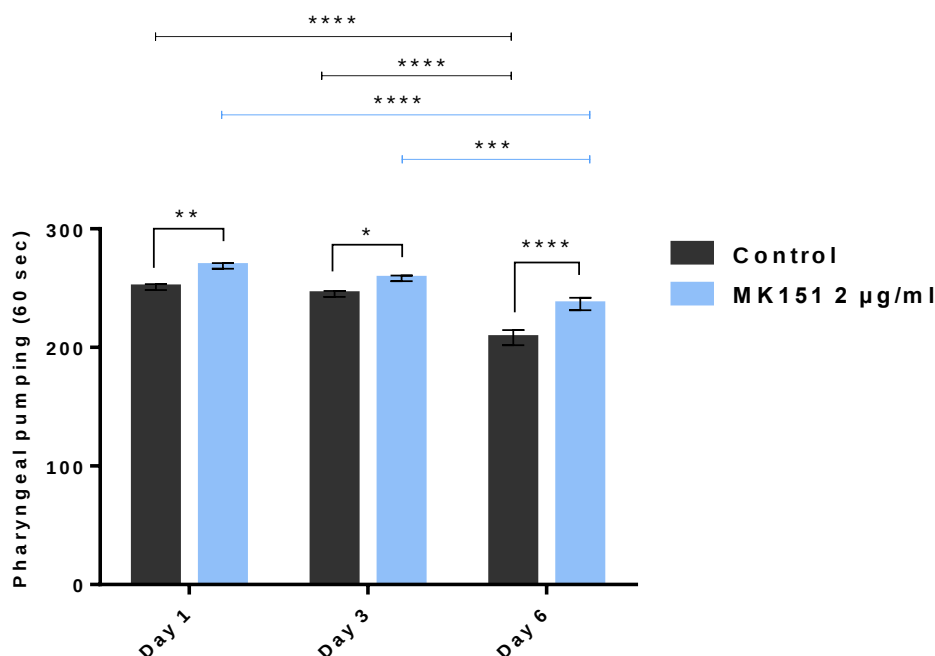
<sup>γ</sup> Χρόνος από την εκκόλαψη των αυγών έως το τέταρτο στάδιο ανάπτυξης των σκωλήκων.

<sup>δ</sup> Αριθμός απογόνων ανά σκώληκα. 14 ζώα εκτέθηκαν στην ένωση MK151 2 µg/ml και 15 σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control).

<sup>ε</sup> Αριθμός σκωλήκων που μετέβησαν στην προνύμφη dauer στους 27 °C. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

Αρχικά, ο φαρυγγικός παλμός των σκωλήκων καθορίζει τη συμπεριφορά σίτισης των ζώων και αντικατοπτρίζει τη γενική κατάσταση της υγείας των σκωλήκων (Sayed et al., 2021). Οι ρυθμικές συσπάσεις που υφίσταται ο φάρυγγας έχουν δειχθεί να είναι ηλικιο-εξαρτώμενες και να μειώνονται με την πάροδο του χρόνου (D. K. Chow et al.,

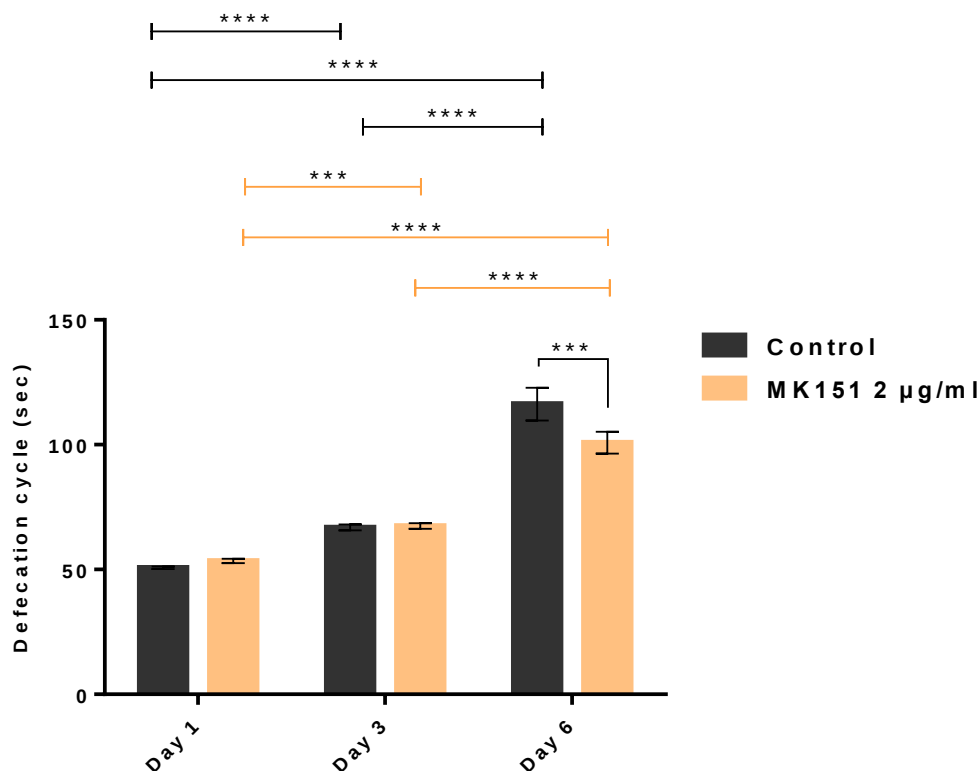
2006; J. J. Collins et al., 2008; C. Huang et al., 2004; Saul et al., 2021). Ειδικότερα, ο φαρυγγικός παλμός σταδιακά μειώνεται από τη δεύτερη (2<sup>η</sup>) έως την έβδομη (7<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, ενώ η μείωση αυτή είναι ραγδαία από την έβδομη (7<sup>η</sup>) έως τη δέκατη (10<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους (C. Huang et al., 2004). Αντίθετα, αύξηση του ρυθμού των φαρυγγικών συσπάσεων έχει συσχετιστεί με αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Dhawan et al., 1999) και βελτίωση της ευζωίας των σκωλήκων (Cao et al., 2007; M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022), αποτελώντας ένα δείκτη βραδύτερης γήρανσης (Sayed et al., 2021). Έτσι, σκώληκες αγρίου τύπου (N2) δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την πρώτη (1<sup>η</sup>), την τρίτη (3<sup>η</sup>) και την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους όπου και μετρήθηκε ο φαρυγγικός τους παλμός. Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.35**, ο ρυθμός των φαρυγγικών συσπάσεων την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων-μαρτύρων (control) ήταν περίπου 250, 245 και 208 παλμοί ανά λεπτό, αντίστοιχα. Η χορήγηση της MK151 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση του φαρυγγικού παλμού και τις τρεις ημέρες, όπου καταγράφηκαν περίπου 268, 258 και 236 παλμοί ανά λεπτό την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, αντίστοιχα. Αύξηση του φαρυγγικού παλμού έχει παρατηρηθεί σε μακρόβια ζώα (C. Huang et al., 2004), ενώ μείωση του φαρυγγικού παλμού έχει καταγραφεί σε περιπτώσεις παρουσίας τοξινών στο περιβάλλον διαβίωσης των σκωλήκων (Aitlhadj & Stürzenbaum, 2013; Hunt, 2017).



**Εικόνα 3.35: Η ένωση MK151 αυξάνει το φαρυγγικό παλμό των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* κατά τη γήρανση.** Παρουσιάζεται ο φαρυγγικός παλμός που καταγράφηκε σε 60 δευτερόλεπτα (second, sec) την πρώτη (Day 1), την τρίτη (Day 3) και την έκτη (Day 6) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) που τους χορηγήθηκε 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Ο μέσος ρυθμός φαρυγγικού παλμού την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής

(Day 1) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $250.8 \pm 2.50$  (N=50), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 είναι  $268.8 \pm 2.33$  (N=50). Ο μέσος ρυθμός φαρυγγικού παλμού την τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 3) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $245.1 \pm 2.38$  (N=50), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 είναι  $258.2 \pm 2.31$  (N=50). Ο μέσος ρυθμός φαρυγγικού παλμού την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 6) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $208.2 \pm 6.44$  (N=50), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 είναι  $236.6 \pm 5.28$  (N=50). Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και post-hoc Dunnett's και Turkey's multiple comparisons test.

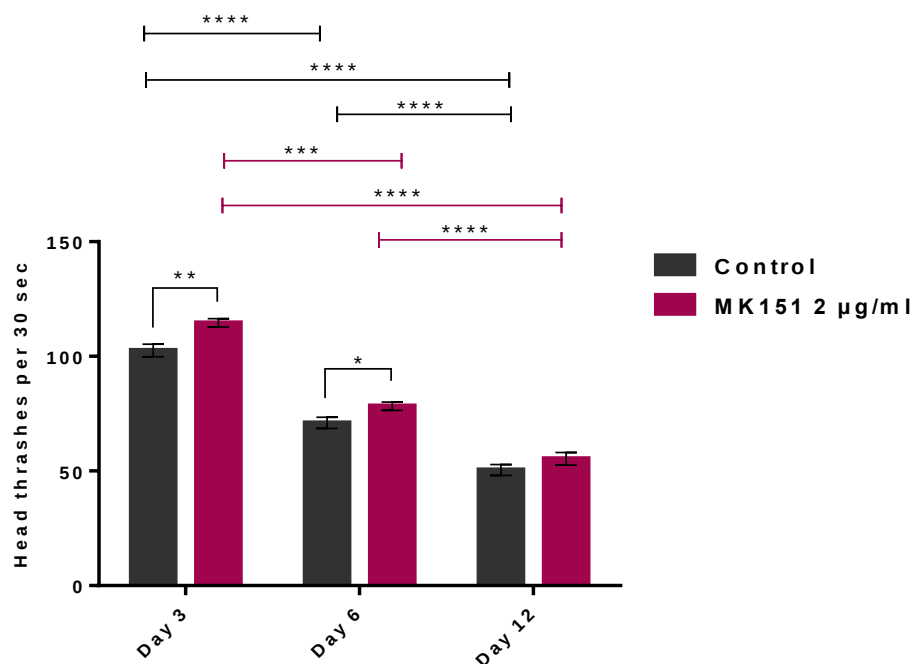
Αντιστρόφως ανάλογα του φαρυγγικού παλμού, ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων στους σκώληκες αγρίου τύπου (N2) σταδιακά αυξάνεται καθώς τα ζώα γηράσκουν, υποδηλώνοντας μια φυσιολογική διαδικασία γήρανσης των σκωλήκων (J. J. Collins et al., 2008; Croll et al., 1977; How et al., 2018; C. Huang et al., 2004). Δεδομένου ότι η κένωση στους σκώληκες ακολουθεί μια ρυθμική συμπεριφορά που αποτελείται από κύκλους των 50 περίπου δευτερολέπτων (seconds, sec) (Gioran et al., 2024; Papaevgeniou et al., 2016; M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022; Zhu et al., 2019), σκώληκες αγρίου τύπου (N2) δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την πρώτη (1<sup>η</sup>), την τρίτη (3<sup>η</sup>) και την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους όπου και καταμετρήθηκε ο ρυθμός των κενώσεων. Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.36**, ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων-μαρτύρων (control) ήταν περίπου 50, 66 και 116 δευτερόλεπτα (sec), αντίστοιχα. Ύστερα από τη συνεχή χορήγηση της MK151, ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων ήταν περίπου 53, 67 και 100 δευτερόλεπτα (sec), αντίστοιχα. Την 1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα, οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου συναρτήσει του χρόνου δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Εντούτοις, στατιστικά σημαντική μείωση καταγράφηκε την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων υπό την επίδραση της MK151, γεγονός που μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια μορφή «αποτοξίνωσης» ενισχύοντας την απομάκρυνση από τον οργανισμό των επιβλαβών ουσιών (Gioran et al., 2024; Lieke et al., 2018; M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022). Επιπροσθέτως, από τις παραπάνω καταγραφές, παρατηρούμε ότι ο χρόνος μεταξύ των δύο διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αυξάνεται καθώς οι σκώληκες γηράσκουν και στις δύο ομάδες ελέγχου, γεγονός που αντικατοπτρίζει, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (How et al., 2018), μια ομαλή διαδικασία γήρανσης τόσο παρουσία του οργανικού διαλύτη DMSO (control) όσο και της ένωσης MK151.



**Εικόνα 3.36:** Η ένωση MK151 μειώνει το χρόνο μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Παρουσιάζεται ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων που καταγράφηκε σε δευτερόλεπτα (second, sec) την πρώτη (Day 1), την τρίτη (Day 3) και την έκτη (Day 6) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) που τους χορηγήθηκε 2 µg/ml MK151 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Ο μέσος χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 1) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $50.70 \pm 0.50$  (N=50), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 είναι  $53.40 \pm 0.89$  (N=50). Ο μέσος χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 3) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $66.86 \pm 1.16$  (N=50), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 είναι  $67.46 \pm 1.10$  (N=50). Ο μέσος χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 6) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $116.3 \pm 6.51$  (N=40), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 είναι  $100.8 \pm 4.34$  (N=40). Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και post-hoc Dunnett's και Turkey's multiple comparisons test.

Τέλος, ένα ακόμη φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που παρουσιάζει αλλαγές νωρίς κατά την πάροδο του χρόνου, είναι αυτό της κίνησης των σκωλήκων (G. Li et al., 2019). Οι σκωλήκες *C. elegans* εμφανίζουν ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση της φυσικής τους δραστηριότητας, η οποία γίνεται εμφανής από τη μειωμένη σωματική τους κίνηση καθώς γηράσκουν (J. J. Collins et al., 2008; Hahm et al., 2015; C. Huang et al., 2004; Restif et al., 2014). Μάλιστα, μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της διατήρησης της ζωηρής κίνησης των σκωλήκων κατά τη διάρκεια της ζωής τους με το προσδόκιμο ζωής (Hahm et al., 2015; C. Huang et al., 2004; G. Li et al., 2019). Έτσι, η εκτίμηση της κίνησης είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που

αντικατοπτρίζει τόσο τη δραστηριότητα των σκωλήκων όσο και την ηλικιακή τους κατάσταση (G. Li et al., 2019). Ένας τρόπος ανάλυσης και εκτίμησης του χαρακτηριστικού αυτού αποτελεί η κίνηση των σκωλήκων όταν βρεθούν σε υγρό στοιχείο (Restif et al., 2014; Sayed et al., 2021), όπου μακρόβια ζώα διατηρούν τις κολυμβητικές τους ικανότητες ακμαίες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με αγρίου τύπου σκώληκες και σκώληκες με σύντομη διάρκεια ζωής (Restif et al., 2014). Θέλοντας να εκτιμήσουμε την επίδραση της ένωσης MK151 στο φαινοτυπικό αυτό χαρακτηριστικό, αγρίου τύπου σκώληκες (N2) δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την τρίτη (3<sup>η</sup>), την έκτη (6<sup>η</sup>) και τη δωδέκατη (12<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής. Τις ημέρες αυτές, ένα-ένα σκουλήκι μεταφερόταν σε μία σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος (M9) ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα κολύμβησής τους μέσω της μέτρησης των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) που πραγματοποιεί το σκουλήκι σε διάστημα τριάντα (30) δευτερολέπτων (second, sec). Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.37**, ο αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού που πραγματοποίησαν οι σκώληκες-μάρτυρες (control) σε διάστημα τριάντα δευτερολέπτων την 3<sup>η</sup>, την 6<sup>η</sup> και την 12<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής τους ήταν περίπου 102, 70 και 50, αντίστοιχα. Ύστερα από τη συνεχόμενη χορήγηση της MK151, ο αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού που πραγματοποίησαν οι σκώληκες ήταν περίπου 114, 78 και 55, αντίστοιχα. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων ήταν στατιστικά σημαντικές, όπου η παρουσία της ένωσης MK151 οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των κινήσεων του κεφαλιού των σκωλήκων σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες καθώς και σε συνολικά ομαλότερη μείωση της κινητικότητας των σκωλήκων κατά τη γήρανση. Τη 12<sup>η</sup> ημέρα, η ένωση MK151 εξακολούθησε να έχει θετική επίδραση στην κίνηση των σκωλήκων σημειώνοντας αύξηση του αριθμού των κινήσεων του κεφαλιού σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπροσθέτως, οι κινήσεις του κεφαλιού που πραγματοποίησαν οι σκώληκες και στις δύο ομάδες ελέγχου μειώνονταν με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία (Hahm et al., 2015; C. Huang et al., 2004; Restif et al., 2014).



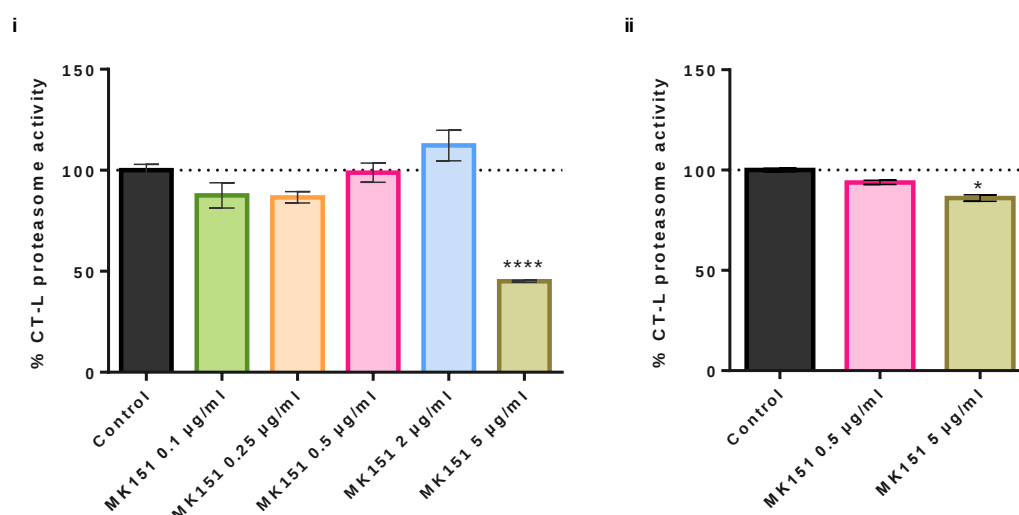
**Εικόνα 3.37:** Η ένωση MK151 αυξάνει την κινητικότητα των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* την τρίτη (3<sup>η</sup>) και έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Παρουσιάζεται ο αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) που πραγματοποίησαν σε διάστημα τριάντα (30) δευτερολέπτων (second, sec) την τρίτη (Day 3), την έκτη (Day 6) και τη δωδέκατη (Day 12) ημέρα της ενήλικης ζωής τους σκωλήκες αγρίου τύπου (N2) που τους χορηγήθηκε 2 µg/ml MK151 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Ο μέσος αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) την τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 3) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $102.60 \pm 2.76$  (N=30), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 είναι  $114.60 \pm 1.80$  (N=30). Ο μέσος αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 6) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $70.97 \pm 2.46$  (N=35), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 είναι  $78.29 \pm 1.82$  (N=35). Ο μέσος αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) τη δωδέκατη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 12) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $50.45 \pm 2.35$  (N=33), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml MK151 είναι  $55.33 \pm 2.78$  (N=33). Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και post-hoc Dunnett's και Turkey's multiple comparisons test.

Συνολικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από την ανάλυση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των σκωλήκων όσο και από την περαιτέρω διερεύνηση χαρακτηριστικών που μεταβάλλονται καθώς οι σκωλήκες γηράσκουν (φαρυγγικός παλμός, ρυθμός κενώσεων και κινητικότητα), επιβεβαιώνουν την αρχική παρατήρηση για βελτιωμένη κατάσταση της ευζωίας των πληθυσμών που εκτέθηκαν στην ένωση MK151 καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Παρόλο που η οργανισμική αύξηση του προσδόκιμου ζωής που καταγράφηκε παρουσία 2 µg/ml MK151 δεν άγγιξε τη στατιστική σημαντικότητα, δεν μπορεί να παραβλέψει κανείς τη θετική επίδραση της ένωσης *in vivo*.

### 3.2.6 Η ένωση MK151 δε βελτιώνει την επιβίωση των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου που εκτίθενται στο Αβ πεπτίδιο

Δεδομένου ότι ταυτοποιήσαμε την ένωση MK151 ως ενεργοποιητή του πρωτεασώματος, προχωρήσαμε στη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής της δράσης. Αρχικά, θέλαμε να διερευνήσουμε την ικανότητα της ένωσης MK151 να καταστέλλει την τοξικότητα που προκαλείται από το Αβ πεπτίδιο σε κύτταρα του ανθρώπου *in vitro*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα νευρικής προέλευσης και συγκεκριμένα καλλιέργειες νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου.

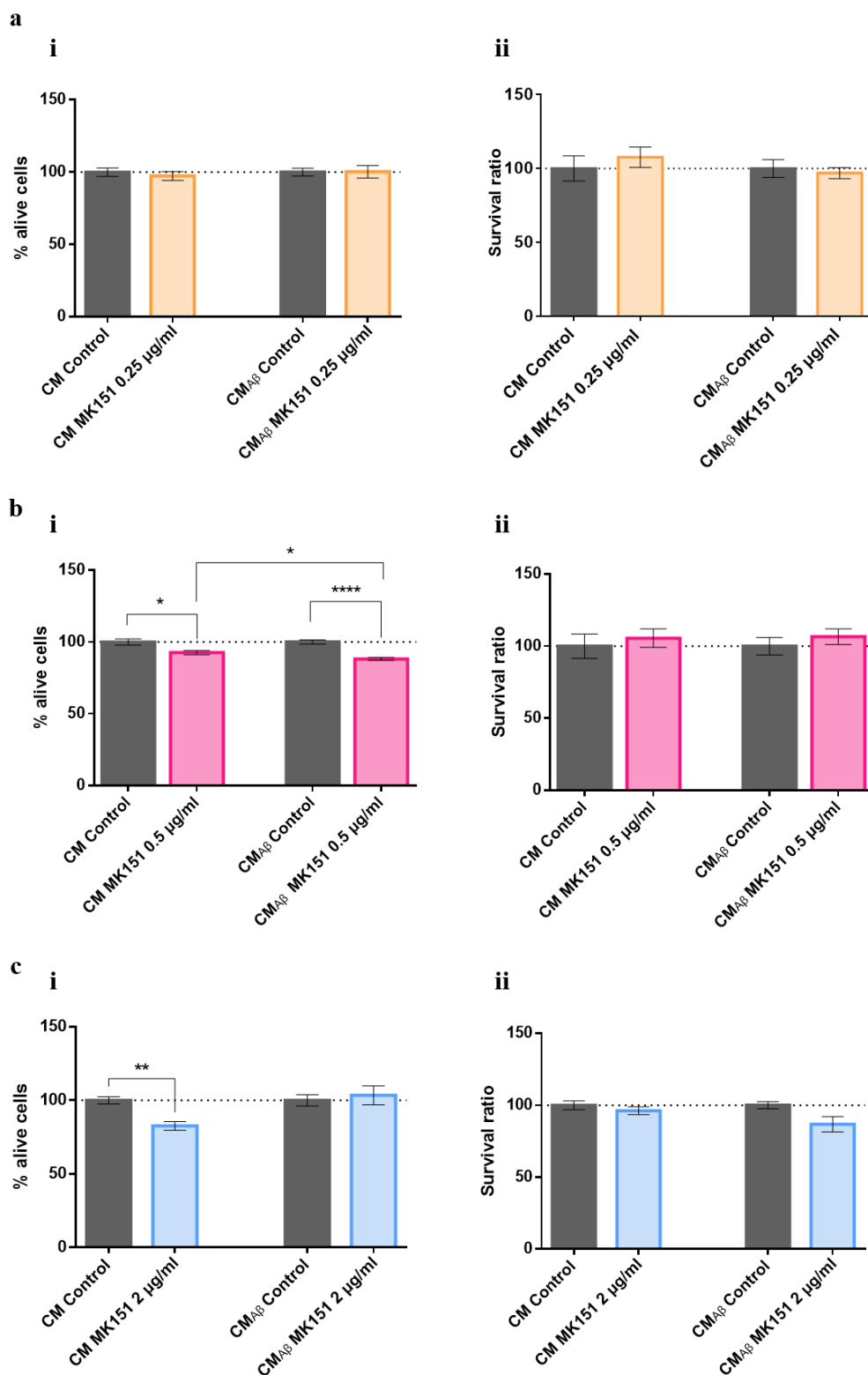
Πρώτο βήμα στη διερεύνηση αυτή, αποτελεί ο έλεγχος της ένωσης MK151 ως ενεργοποιητή του πρωτεασώματος των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y του ανθρώπου. Έτσι, κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1, 0.25, 0.5, 2 και 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνα 3.38 ii**, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν, ενώ παρόλο που η συγκέντρωση 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 παρουσίασε μια μικρή αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L), αυτή δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα. Θέλοντας να ελέγξουμε εάν ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στην ένωση MK151 μεταβάλλει το αποτέλεσμα, 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 χορηγήθηκαν για δύο (2) ώρες στα SH-SY5Y κύτταρα και μετρήθηκε ξανά η ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος. Εντούτοις, η παρουσία της MK151 δεν ήταν ικανή να προκαλέσει αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος (**Εικόνα 3.38 ii**), υποδηλώνοντας πως η δίωρη έκθεση των κυττάρων στην ένωση δεν είναι αρκετή για να επηρεάσει την ενεργότητα του πρωτεασώματος.



**Εικόνα 3.38:** Δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη και δίωρη έκθεση στην ένωση MK151. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y που τους χορηγήθηκε (i) 0.1, 0.25, 0.5, 2 και 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 και (ii) 0.5 ή 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151

ή ο διαλύτης DMSO (control) για 24 ώρες και 2 ώρες, αντίστοιχα. Τα *p-value* προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος στα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y παρουσία της ένωσης MK151, προχωρήσαμε σε πειράματα με τη χρήση των συγκεκριμένων κυττάρων προκειμένου να ελέγξουμε εάν η χορήγηση της ένωσης προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα έναντι της Αβ-πρωτεοτοξικότητας, πιθανά μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού. Χορηγήσαμε 0.25, 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή τον οργανικό διαλύτη DMSO (control) για 24 ώρες σε καλλιέργειες νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y με επακόλουθη εικοσιτετράωρη έκθεσή τους στο μέσο CM (που δεν περιέχει Αβ πεπτίδια) ή CM<sub>Αβ</sub> (που περιέχει Αβ πεπτίδια) και ταυτόχρονη χορήγηση 0.25, 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή DMSO. Όπως φαίνεται και στα γραφήματα της *Εικόνα 3.39*, η χορήγηση της ένωσης MK151 στα κύτταρα SH-SY5Y στις συγκεντρώσεις 0.25 και 2  $\mu\text{g/ml}$  δεν προστάτευσε στατιστικά σημαντικά τα κύτταρα από την τοξικότητα που προκαλεί το Αβ πεπτίδιο. Ειδικότερα για τη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής επιβίωσης υπό την ταυτόχρονη παρουσία της ένωσης και του μέσου CM (που δεν περιέχει Αβ πεπτίδια) σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.



**Εικόνα 3.39: Η χορήγηση της ένωσης MK151 δε βελτιώνει στατιστικά σημαντικά την επιβίωση των νευροβλαστικών κυττάρων SH-SY5Y που επιβαρύνονται από την έκθεση στο Αβ πεπτίδιο.** (i) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) της κυτταρικής επιβίωσης και (ii) η αναλογία (%) των ζωντανών κυττάρων έπειτα από χρώση με Crystal violet των κυττάρων SH-SY5Y που τους χορηγήθηκε (a) 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , (b) 0.5  $\mu\text{g/ml}$  και (c) 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151 ή ο διαλύτης DMSO (control) για 24 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε μέσο που περιέχει ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο ( $\text{CM}_{\text{A}\beta}$ ) ή το αντίστοιχο control

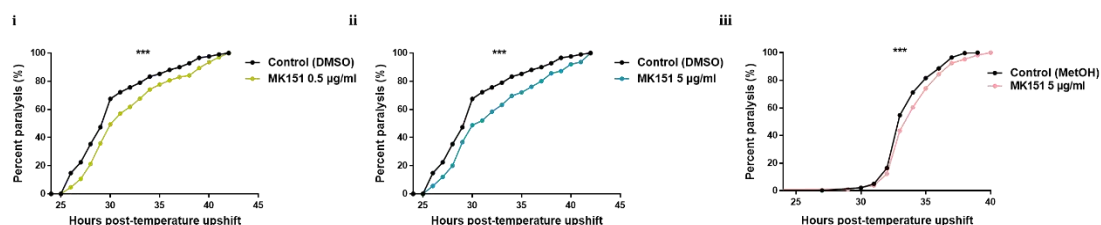
(CM) και ταυτόχρονη παρουσία DMSO ή (a) 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , (b) 0.5  $\mu\text{g/ml}$  και (c) 2  $\mu\text{g/ml}$  MK151. Η μέση τιμή των ζωντανών κυττάρων στις control καλλιέργειες (CM control και CM<sub>AB</sub> control) τέθηκαν ως 100%. Τα p-value προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

Συμπερασματικά, η ένωση MK151 φαίνεται να μην ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα στα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y στις συγκεντρώσεις και στις συνθήκες που ελέγχθηκαν. Παράλληλα, η χορήγηση της ένωσης MK151 δεν προστάτευσε τα κύτταρα από την πρωτεοτοξικότητα που προκαλείται από την παρουσία του Αβ πεπτιδίου στις συνθήκες που μελετήθηκαν. Περισσότερη διερεύνηση χρειάζεται για να αποσαφηνιστεί η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση της MK151 *in vitro*.

### 3.2.7 Η ένωση MK151 προστατεύει έναντι της Αβ-τοξικότητας σε οργανισμικό επίπεδο

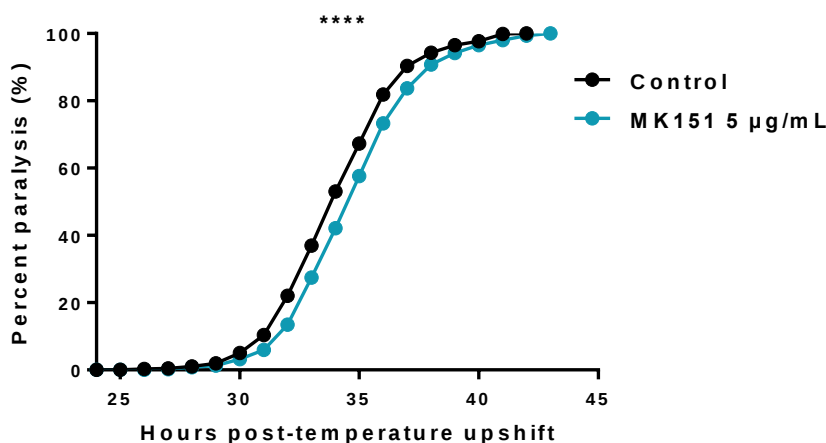
Παρόλο που δεν αποτιμήθηκε η νευροπροστατευτική δράση της ένωσης MK151 *in vitro*, και με δεδομένο ότι ταυτοποιήσαμε την ένωση MK151 ως ενεργοποιητή του πρωτεασώματος τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε οργανισμικό επίπεδο, προχωρήσαμε στη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής της δράσης *in vivo* στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος-μοντέλο CL4176 για την AD στο νηματώδη σκώληκα, μέσω του οποίου πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες παράλυσης.

Σε αυτό το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος, μελετήθηκε η επίδραση 0.5 και 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η MK151 επιβραδύνει στατιστικά σημαντικά το ρυθμό παράλυσης των σκωλήκων σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) και στις δύο συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (Εικόνα 3.40 i, ii). Επειδή η επίδραση της συγκέντρωσης 5  $\mu\text{g/ml}$  (12.21  $\mu\text{M}$ ) είχε καλύτερο αποτέλεσμα στην επιβράδυνση της παράλυσης, οι υπόλοιπες επαναλήψεις συνεχίστηκαν με τη συγκέντρωση αυτή. Το ίδιο ακριβώς πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη τη μεθανόλη (MeOH) και παρατηρήθηκε το ίδιο θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά στην καθυστέρηση της παράλυσης των ζώων, γεγονός που υποδεικνύει τη θετική επίδραση της ουσίας ανεξάρτητα από το διαλύτη (Εικόνα 3.40 iii). Ωστόσο, τα υπόλοιπα πειράματα συνεχίστηκαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη της ένωσης το DMSO. Όπως παρουσιάζεται και στο γράφημα της Εικόνα 3.41, πράγματι, η παρουσία της ένωσης MK151 επιβραδύνει στατιστικά σημαντικά το ρυθμό παράλυσης των διαγονιδιακών σκωλήκων σε σύγκριση με τους σκωλήκες-μάρτυρες.



**Εικόνα 3.40:** Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ουσία MK151 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. (i) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυνε στις 30 (N=209/211) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, ενώ το 50% των σκωλήκων

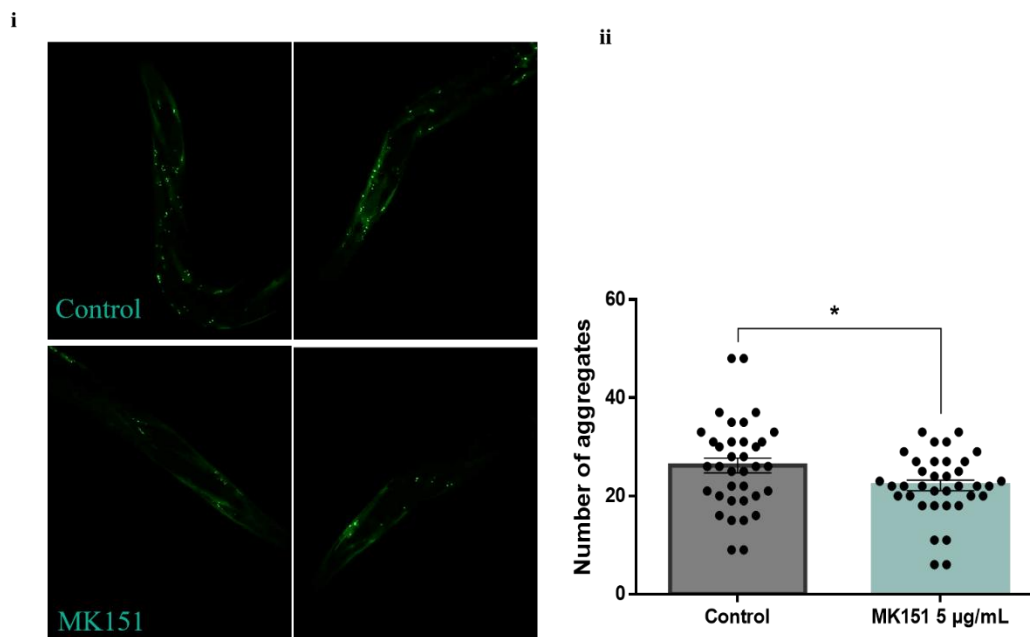
που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 παρέλυσε στις 31 ( $N=170/172$ ) ώρες. (ii) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις 30 ( $N=209/211$ ) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 παρέλυσε στις 31 ( $N=125/127$ ) ώρες. (iii) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη μεθανόλη (MetOH) (control) παρέλυσε στις 33 ( $N=316/318$ ) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 παρέλυσε στις 34 ( $N=359/361$ ) ώρες.



**Εικόνα 3.41:** Η ένωση MK151 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του  $A\beta_{1-42}$  πεπτιδίου στο διαγονιδιακό στέλεχος CL4176. Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $33.86 \pm 0.17$  ( $N=3097/3125$ ) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του  $A\beta$  πεπτιδίου, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 παρέλυσε στις  $34.51 \pm 0.18$  ( $N=2867/2893$ ) ώρες.

Σε συνέχεια των θετικών αποτελεσμάτων της ένωσης MK151 στην επιβράδυνση της παράλυσης στο CL4176 στέλεχος-μοντέλο για την AD στο νηματώδη σκώληκα, προχωρήσαμε σε πειράματα και με άλλα στελέχη-μοντέλα για τη συγκεκριμένη νόσο.

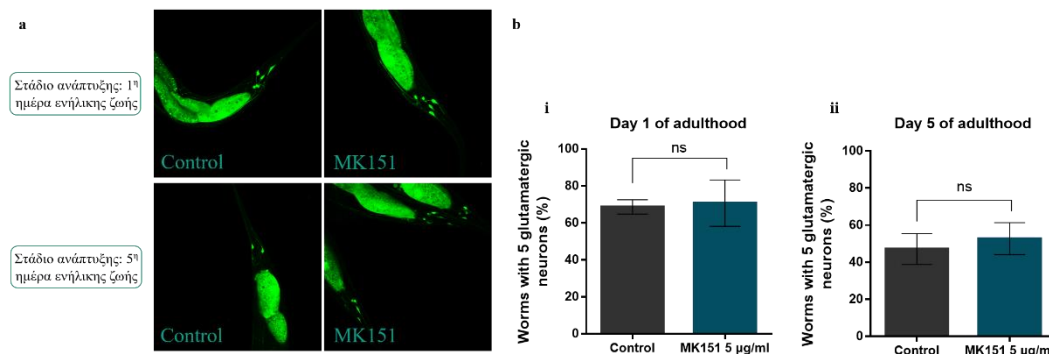
Για να εκτιμηθεί η κατάσταση της συσσωμάτωσης του  $A\beta$  πεπτιδίου *in vivo*, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος CL2331 (Link et al., 2008), στο οποίο μελετήθηκε η επίδραση 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151. Πιο συγκεκριμένα, οι σκώληκες δέχτηκαν την επίδραση 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 είτε του διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4 stage) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης ώστε να αποκαλυφθεί η επίδραση της ουσίας στη συσσωμάτωση του  $A\beta$  πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της εναπόθεσης του  $A\beta$  πεπτιδίου στους σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες (Εικόνα 3.42).



**Εικόνα 3.42:** Η ένωση MK151 μειώνει την εναπόθεση των συσσωματωμάτων του  $A\beta_{3-42}$  πεπτιδίου στους μυς του διαγονιδιακού στελέχους CL2331. (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες σκωλήκων που εκφράζουν το ανθρώπινο  $A\beta_{3-42}$  πεπτίδιο συζευγμένο με GFP που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) είτε σε 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4 stage). Τα συσσωματώματα του  $A\beta_{3-42}$  πεπτιδίου απεικονίζονται ως πράσινες κουκίδες. (ii) Ο μέσος αριθμός των  $A\beta$  συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4 stage) είναι  $26.22 \pm 1.51$  ( $N=36$ ), ενώ ο μέσος αριθμός των  $A\beta$  συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 είναι  $22.17 \pm 1.07$  ( $N=36$ ). Το  $p$ -value προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω  $t$ -test.

Θέλοντας να μελετήσουμε λίγο περισσότερο τη νευροπροστατευτική δράση της ένωσης, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος-μοντέλο για την εκτίμηση της  $A\beta$  νευροτοξικότητας στο νηματώδη σκώληκα, UA198 (Griffin et al., 2018, 2019). Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα της **Εικόνα 3.43 b**, περίπου το 70% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη (1<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) εμφανίζουν και τους πέντε οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες, ενώ την πέμπτη (5<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 5 of adulthood), μόλις το 47% του πληθυσμού των σκωλήκων-μαρτύρων εμφανίζει το φυσιολογικό αριθμό νευρώνων. Οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5  $\mu\text{g/ml}$  MK151 εμφανίζουν και τους πέντε οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους σε ποσοστό ίδιο με τους σκώληκες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) ( $p = 0.87$ ) (**Εικόνα 3.43 b i**). Αντίθετα, την πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής, οι σκώληκες που τους χορηγήθηκε η ένωση MK151 εμφάνισαν περίπου 5% λιγότερο νευροεκφυλισμό σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες. Εντούτοις, τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά ( $p = 0.65$ ). Αναρωτώμενοι για το τι συμβαίνει καθώς οι σκώληκες γηράσκουν, το πείραμα επαναλήφθηκε μετρώντας τον αριθμό των οπίσθιων γλουταματεργικών νευρώνων για

τις ημέρες 6 (Day 6 of adulthood) και 7 (Day 7 of adulthood) της ενήλικης ζωής τους (Εικόνα 6.3). Τα αποτελέσματα είναι πρώιμα και περισσότερα πειράματα χρήζουν για τη διαλεύκανση της προστατευτικής δράσης της MK151 έναντι του Αβ<sub>1-42</sub>-εξαρτώμενου νευροεκφυλισμού στο συγκεκριμένο διαγονιδιακό στέλεχος του *C.elegans*.



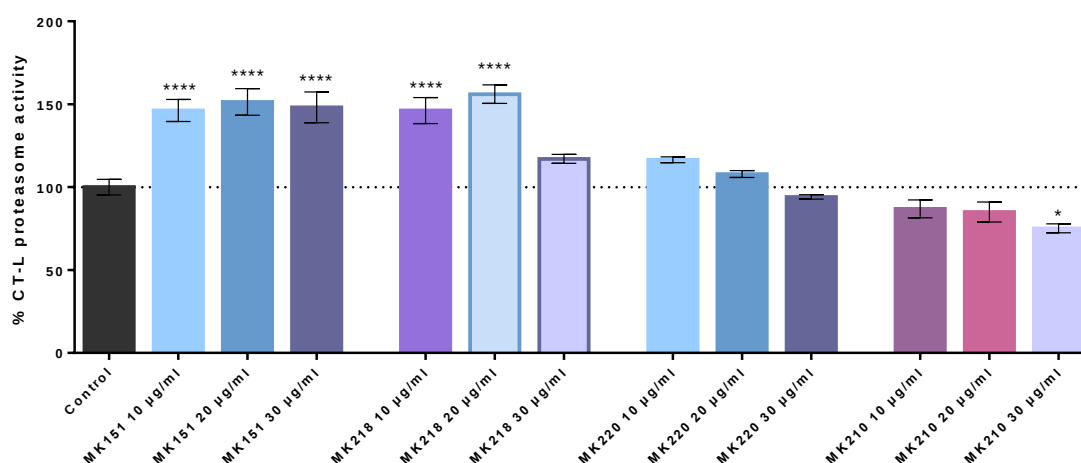
**Εικόνα 3.43: Η ένωση MK151 δε προστατεύει στατιστικά σημαντικά από το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198.** (a) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες όπου απεικονίζονται οι πέντε (5) γλουταματεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στην οπίσθια περιοχή και συγκεκριμένα στην ουρά των διαγονιδιακών UA198 σκωλήκων που εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο συζευγμένο με GFP. (b) (i) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό 70.75 ± 12.52%, ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml MK151 σε ποσοστό 68.68 ± 3.86%. (ii) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 5 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό 47.18 ± 8.27%, ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml MK151 σε ποσοστό 52.74 ± 8.62%. Το *p*-value προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t*-test.

Συνολικά, η χορήγηση της ένωσης MK151 στα διαγονιδιακά για την AD στελέχη του *C. elegans* (CL4176 και CL2331) προστατεύει τους σκώληκες από την τοξικότητα που προκαλείται από το Αβ πεπτίδιο, καθυστερώντας το ρυθμό παράλυσης και μειώνοντας την εναπόθεση των Αβ συσσωματωμάτων σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όσον αφορά στην προστασία έναντι του νευροεκφυλισμού που προκαλείται από την έκφραση του Αβ πεπτιδίου στους γλουταματεργικούς νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198, ωστόσο επιπλέον πειράματα απαιτούνται για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της MK151 σε αυτό το μοντέλο.

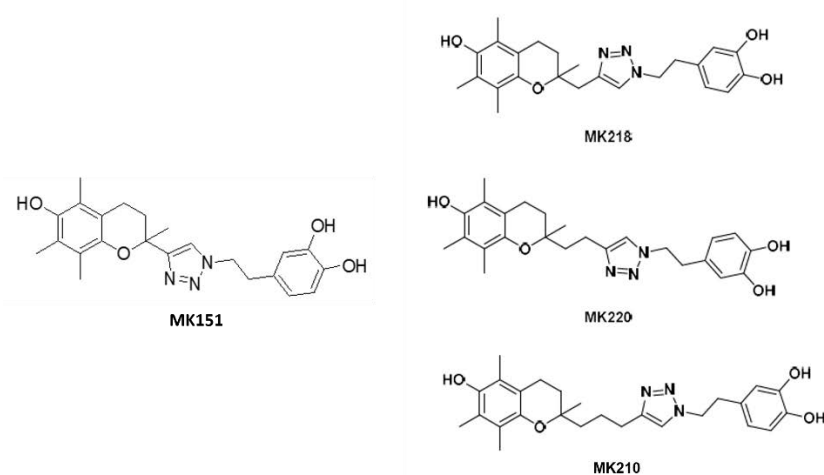
### 3.2.8 Μελέτη της επίδρασης του μήκους του συνδέτη (spacer) στη δράση των υβριδικών ενώσεων

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του μήκους του συνδέτη (spacer) που ενώνει τον τριαζολικό δακτύλιο με τον ετεροκυκλικό δακτύλιο του χρωμανίου στη δράση των υβριδικών ενώσεων ως δομικών ενεργοποιητών του 20S πρωτεασώματος, συντέθηκαν τα παρακάτω συνθετικά ανάλογα της ένωσης MK151: MK218 (MW 423.51 g/mol), MK220 (MW 437.54 g/mol) και MK210 (MW 451.57 g/mol), στα οποία ο τριαζολικός δακτύλιος συνδέεται με το χρωμανικό δακτύλιο μέσω αλυσίδων ενός, δύο ή τριών

ατόμων άνθρακα, αντίστοιχα (*Εικόνα 3.45*). Οι ενώσεις αυτές, αρχικά, ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδραση το πρωτεάσωμα, χρησιμοποιώντας απομονωμένο, καθαρό, ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα. Οι τρεις συγκεντρώσεις των ενώσεων που εξετάστηκαν ήταν οι 10, 20 και 30  $\mu\text{g/ml}$ , καθώς αυτές έχουν κριθεί ως βέλτιστες για την ένωση MK151, με βάση την οποία θα κριθεί η αποτελεσματικότητα των νέων υβριδικών ενώσεων. Σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στην *Εικόνα 3.44*, μόνο η ένωση MK218 ενεργοποιεί δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά 1.4 και 1.5 φορές μετά από επώαση του καθαρού 20S πρωτεασώματος με την ένωση σε συγκέντρωση 10 και 20  $\mu\text{g/ml}$  (23.61 και 47.22  $\mu\text{M}$ ), αντίστοιχα. Μάλιστα παρουσία της MK218 καταγράφηκαν μεγαλύτερα ποσοστά πρωτεασωμικής ενεργοποίησης σε σύγκριση με την MK151. Για τις ενώσεις MK220 και MK210, δεν καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας. Για την ακρίβεια, η ένωση MK210 λειτούργησε ως αναστολέας του πρωτεασώματος, αφού η έκθεση στην ένωση οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στη συγκέντρωση 30  $\mu\text{g/ml}$ .



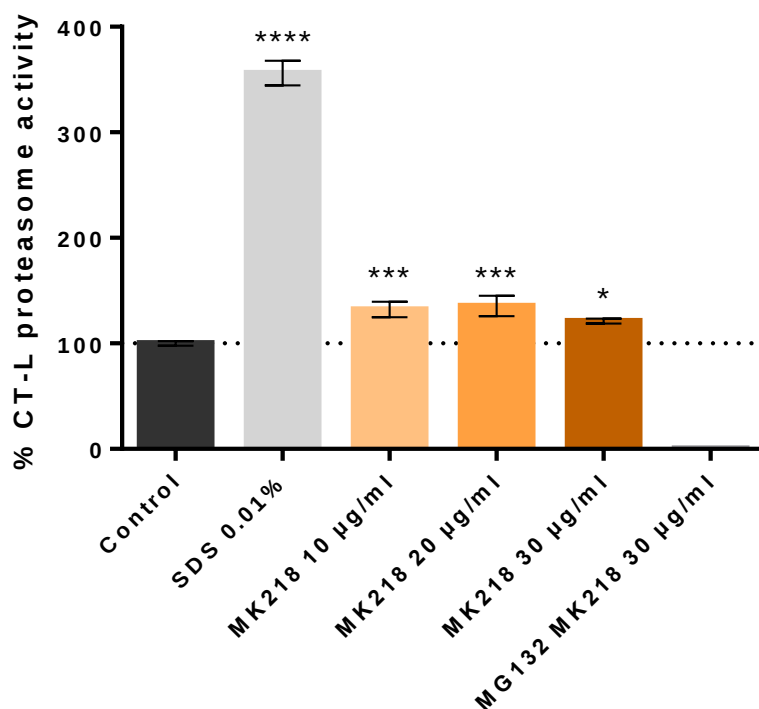
**Εικόνα 3.44:** Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK218, MK220 και MK210 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων MK218, MK220 και MK210. Μόνο η ένωση MK218 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος. Στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $146.2 \pm 7.85$  και στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $156.1 \pm 5.58$ . Τα *p-value* προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA). Η ένωση MK151 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης με τις νέες υβριδικές ενώσεις.



**Εικόνα 3.45:** Χημική δομή της ένωσης MK151 και των συνθετικών αναλόγων MK218, MK220 και MK210.

### 3.2.8.1 Η ένωση MK218 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος

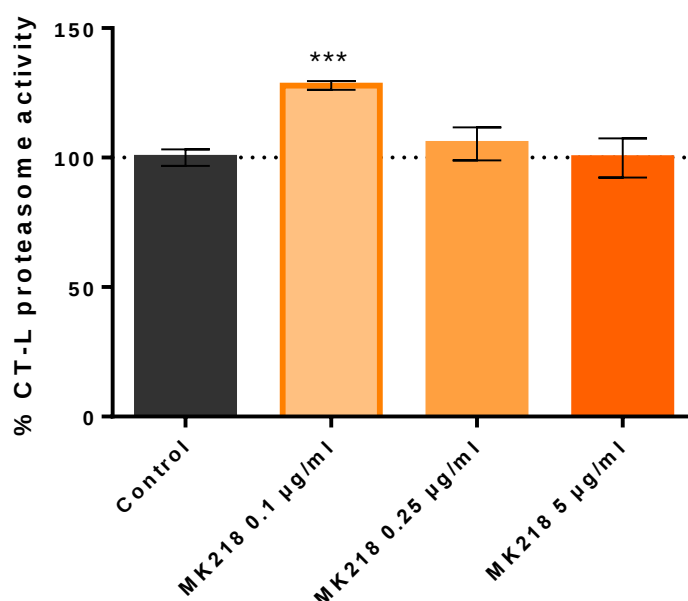
Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, προχωρήσαμε σε επανάληψη του ανωτέρω πειράματος για την ένωση MK218, όπου ελέγχθηκαν ξανά οι τρεις (3) διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.46**, επιβεβαιώνουν ότι η υβριδική ένωση MK218 αυξάνει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του καθαρού πρωτεασώματος ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος, υποδεικνύοντας την πιθανή δράση της MK218 ως δομικό ενεργοποιητή του 20S πρωτεασώματος μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης.



**Εικόνα 3.46:** Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK218 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης MK218. Στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $132.1 \pm 7.41$ , στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $135.4 \pm 9.62$  και στη συγκέντρωση 30  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $121.2 \pm 2.41$ . Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

### 3.2.8.2 Η ένωση MK218 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα σε πρωτογενείς, εμβρυικούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η πρωτεασωμική ενεργοποίηση μπορεί να επιτευχθεί και έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης MK218 σε HFL-1 ινοβλάστες για αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης *in cellulo*. Χρησιμοποιήσαμε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες στους οποίους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) αυξάνεται στατιστικά σημαντικά στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στην ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (0.23  $\mu\text{M}$ ) κατά περίπου 1.3 φορές σε σύγκριση με εκείνους που εκτέθηκαν μόνο στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) (Εικόνα 3.47).



**Εικόνα 3.47:** Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυικούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση MK218. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε η ένωση MK218 στις συγκεντρώσεις 0.1, 0.25 και 5  $\mu\text{g/ml}$  για 24 ώρες. Η έκθεση των κυττάρων στη συγκέντρωση 0.1  $\mu\text{g/ml}$  προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $127.9 \pm 1.67$ . Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

### 3.2.8.3 Η ένωση MK218 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Δεδομένης της ικανότητας της ένωσης MK218 να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα τόσο *in vitro* όσο και *in cellulo*, το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε την επίδραση της χορήγησής της στην εξέλιξη της γήρανσης HFL-1 ινοβλαστών. Για το σκοπό αυτό, HFL-1 ινοβλάστες (CPD 30) εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στη συγκέντρωση 0.1  $\mu\text{g/ml}$  και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) για να αποτιμηθεί η αντιγηραντική δράση της ουσίας *in vitro*. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκείνη που προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος *in cellulo* έπειτα από εικοσιτετράωρη χορήγηση της ένωσης στα ίδια κύτταρα. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνα 3.48 a**, η χορήγηση 0.1  $\mu\text{g/ml}$  MK218 προκάλεσε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τη χορήγηση του διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.1  $\mu\text{g/ml}$  MK218 πραγματοποίησαν  $60.68 \pm 0.29$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $58.31 \pm 0.11$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.001$ ). Όπως είναι εμφανές από το γράφημα της **Εικόνα 3.48 a**, οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων διαφοροποιούνται από τη δέκατη ( $10^{\text{th}}$ ) κιόλας ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων και πως τα κύτταρα παρουσία της MK218 πολλαπλασιάζονται καλύτερα από τα κύτταρα-μάρτυρες σε κάθε χρονικό σημείο από την πρώτη στιγμή που εμφανίζουν διαφορές. Επίσης, παρουσία της MK218 παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα διατηρούν το νεαρό τους φαινότυπο και την καλύτερη μορφολογία τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

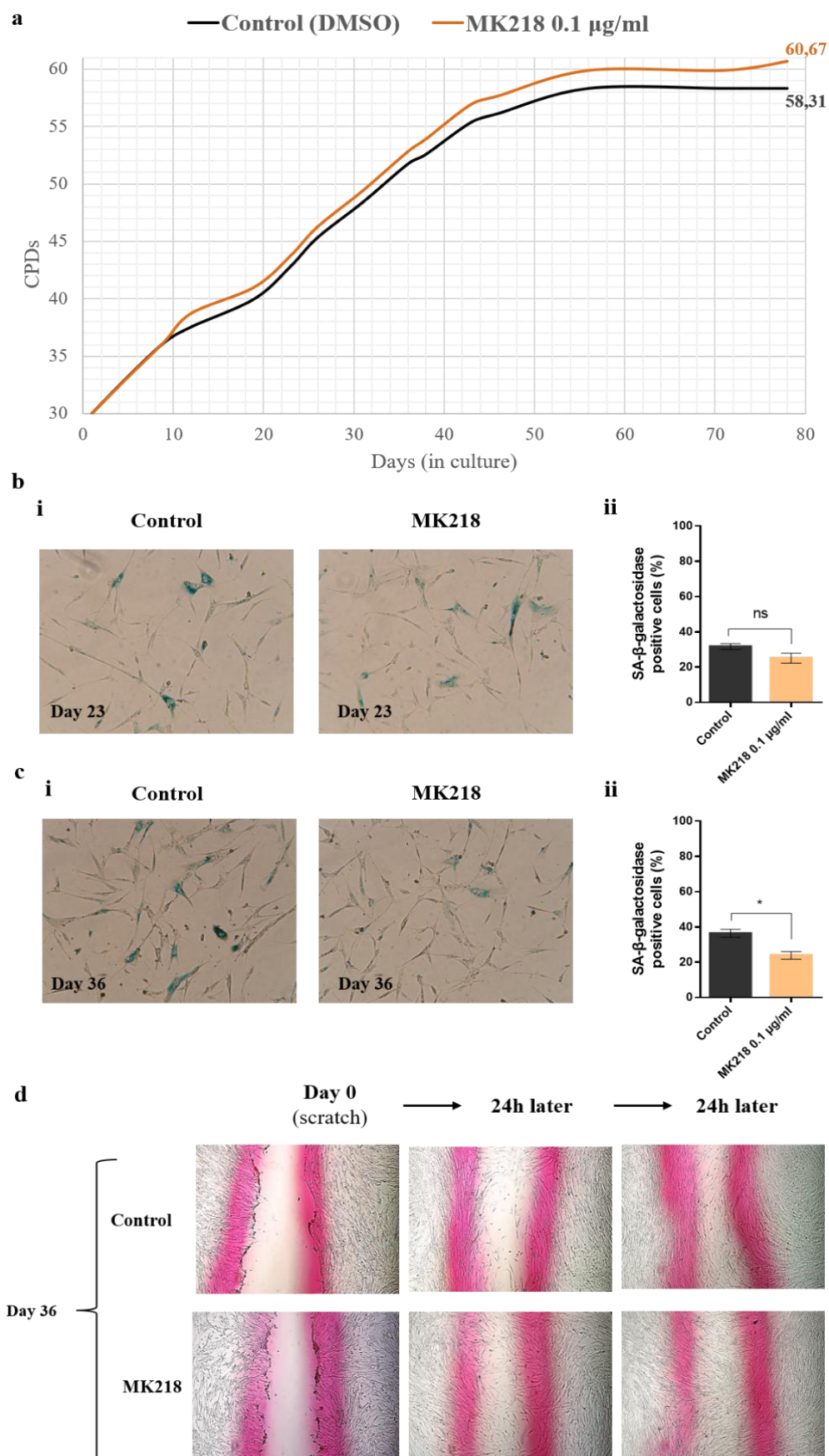
Θέλοντας να το διερευνήσουμε περαιτέρω, προχωρήσαμε στον έλεγχο ορισμένων δεικτών κυτταρικής ευζωίας (healthspan). Αρχικά, πραγματοποιήσαμε τη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς κυττάρων (παρουσία MK218 και παρουσία του διαλύτη DMSO) σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (ημέρα 23 και 36). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόλο το γεγονός ότι τα κύτταρα που δέχονταν την επίδραση της MK218 είχαν πραγματοποιήσει έναν παραπάνω διπλασιασμό σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες [Control/CPD 42.80, MK218/CPD 43.73 (**Εικόνα 3.48 b**), Control/CPD 51.72, MK218/CPD 52.81 (**Εικόνα 3.48 c**)] παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, την 23<sup>η</sup> ημέρα ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK218 είναι  $0.25 \pm 0.02$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.31 \pm 0.01$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.09$ ) (**Εικόνα 3.48 b, ii**). Παρόλο που η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική, επαναλήφθηκε όπου έπειτα από χορήγηση της MK218 για 36 συνεχόμενες ημέρες, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK218 είναι  $0.23 \pm 0.02$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.36 \pm 0.02$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.01$ ) (**Εικόνα 3.48 c, ii**). Τα αποτελέσματά αυτά υποδεικνύουν πως ήδη από τις πρώτες είκοσι ημέρες χορήγησης, τα κύτταρα που

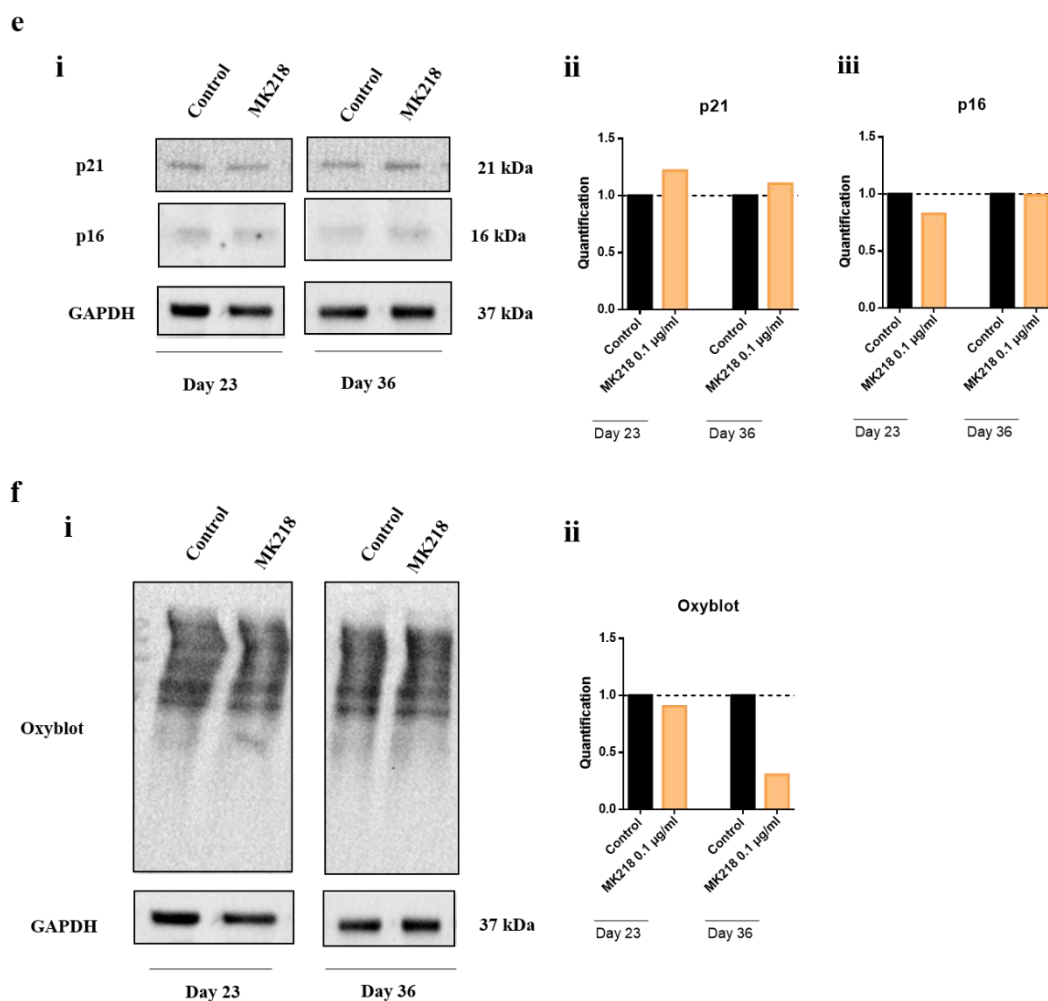
δέχονται την επίδραση της MK218 διατηρούν το νεαρό τους φαινότυπο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία scratch assay τη χρονική στιγμή όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης μεταξύ των δύο πληθυσμών-ελέγχου (ημέρα 36). Η χορήγηση της MK218 στους HFL-1 ινοβλάστες για 36 συνεχόμενες ημέρες επιτάχυνε το «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (*Εικόνα 3.48 d*). Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το μειωμένο αριθμό κυττάρων θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάση παρουσία της MK218, υποδηλώνουν πως η χορήγηση της ένωσης οδηγεί σε διατήρηση του νεανικού φαινοτύπου των κυττάρων καθώς και σε αύξηση του πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα που τους χορηγήθηκε ο διαλύτης DMSO.

Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών p21<sup>CIP1/WAF1</sup> και p16<sup>INK4A</sup> κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Καθώς η έκφραση της πρωτεΐνης p21 ελαττώνεται, η πρωτεϊνική έκφραση της p16 αρχίζει να αυξάνεται ώστε να διατηρηθεί η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης στα γηρασμένα κύτταρα (Shtutman et al., 2017). Σύμφωνα με την *Εικόνα 3.48 e*, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της p21 έπειτα από 23 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης της ένωσης MK218 στους HFL-1 ινοβλάστες, σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στον οργανικό διαλύτη DMSO (control), η οποία στη συνέχεια μειώθηκε την 36<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων. Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης p16, αυτή παρουσιάστηκε μειωμένη ή στα ίδια επίπεδα με τα κύτταρα μάρτυρες την 23<sup>η</sup> και 36<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο, αφού τα κύτταρα και των δύο ομάδων ελέγχου δεν έχουν εισέλθει ακόμα στο στάδιο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, δηλαδή στο σημείο της μη αντιστρεπτής παύσης του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ πρώιμα, και περισσότερες επαναλήψεις χρειάζονται ώστε να επιβεβαιωθούν οι αρχικές αυτές παρατηρήσεις.

Τέλος, δεδομένου ότι το πρωτεάσωμα είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Davies, 2001; Pickering & Davies, 2012), ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών έπειτα από τη συνεχόμενη χορήγηση της ένωσης MK218 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) στις καλλιέργειες των κυττάρων στα ίδια χρονικά σημεία όπου πραγματοποιήθηκαν και τα παραπάνω πειράματα. Κύτταρα συλλέχθηκαν έπειτα από 23 και 36 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης της ένωσης MK218 ή του διαλύτη DMSO (control), απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες και ακολούθησαν αντιδράσεις τροποποίησης των οξειδωμένων πρωτεϊνών πριν την επακόλουθη ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευσή τους. Όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της *Εικόνα 3.48 f*, τα κύτταρα που δέχονται την επίδραση της MK218 για περίπου ένα μήνα παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (control) και στις δύο χρονικές στιγμές που ελέγχθηκαν. Εντούτοις, περισσότερες επαναλήψεις του συγκεκριμένου πειράματος απαιτούνται ώστε να επιβεβαιωθούν οι παραπάνω παρατηρήσεις.





**Εικόνα 3.48:** Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.1 µg/ml επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 0.1 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 78 συνεχόμενες ημέρες. (b, c) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.1 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για (b) 23 και (c) 36 συνεχόμενες ημέρες. (d) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του κλεισίματος της «τεχνητής πληγής» HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.1 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για 36 συνεχόμενες ημέρες. Οι κόκκινες γραμμές εσωκλείουν την περιοχή της «τεχνητής πληγής». (e) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης (ii) p21 και (iii) p16 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.1 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για 23 και 36 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των p21 και p16 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από το ανοσοαποτύπωμα. (f) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.1 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για 23 και 36 συνεχόμενες

ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους ανθρώπινους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t*-test.

Ορμώμενοι των θετικών αποτελεσμάτων της χορήγησης 0.1  $\mu\text{g/ml}$  MK218 στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης και επιθυμώντας την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης στην οποία η ένωση MK218 παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιγηραντική της δράση, χορηγήσαμε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της (0.25, 0.5 και 5  $\mu\text{g/ml}$ ) σε HFL-1 ινοβλάστες ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση που προκαλεί επιβράδυνση της εξέλιξης της γήρανσης *in vitro*.

Αρχικά, νεαροί HFL-1 ινοβλάστες (CPD 30) εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στη συγκέντρωση 0.25  $\mu\text{g/ml}$  (0.59  $\mu\text{M}$ ) και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Η χορήγηση 0.25  $\mu\text{g/ml}$  MK218 προκάλεσε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τη χορήγηση του διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.25  $\mu\text{g/ml}$  MK218 πραγματοποίησαν  $59.60 \pm 0.18$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $58.31 \pm 0.11$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.001$ ). Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.49 a**, οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων διαφοροποιούνται από τη δέκατη ( $10^{\text{η}}$ ) κιόλας ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων και τα κύτταρα παρουσία της MK218 πολλαπλασιάζονται καλύτερα από τα κύτταρα-μάρτυρες σε κάθε χρονικό σημείο από την πρώτη στιγμή που εμφανίζουν διαφορές. Παρόλο που τα κύτταρα παρουσία της MK218 πραγματοποίησαν συνολικά περίπου έναν παραπάνω διπλασιασμό, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα υπό την επίδραση της MK218 διατηρούν το νεαρό τους φαινότυπο και την καλύτερη μορφολογία τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

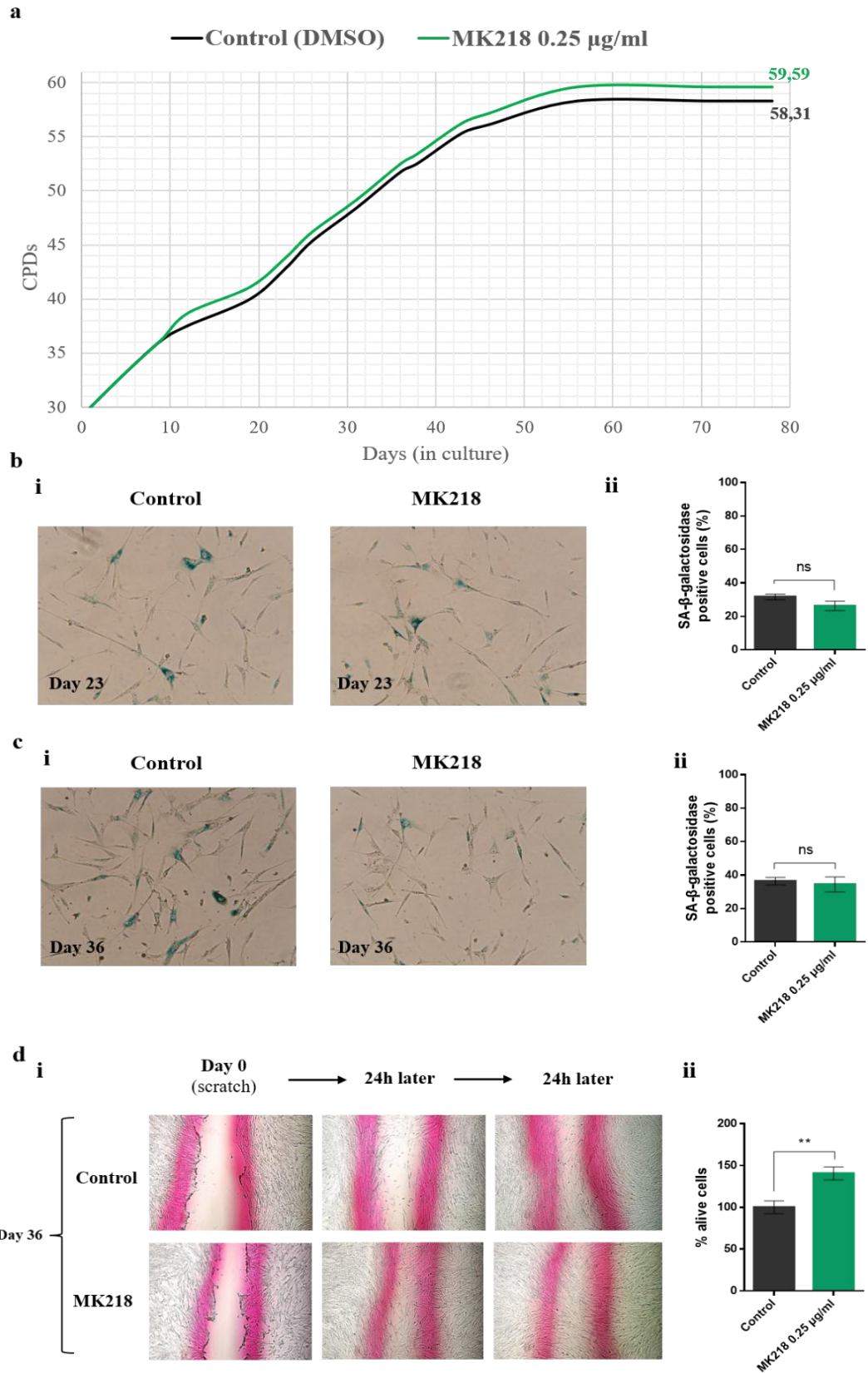
Έτσι, προχωρήσαμε και για αυτή τη συγκέντρωση στον έλεγχο ορισμένων δεικτών κυτταρικής ευζωίας (healthspan). Πραγματοποιήσαμε τη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς κυττάρων (παρουσία MK218 και παρουσία του διαλύτη DMSO) σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (ημέρα 23 και 36). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόλο το γεγονός ότι τα κύτταρα που δέχονταν την επίδραση της MK218 είχαν πραγματοποιήσει έναν παραπάνω διπλασιασμό σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες [Control/CPD 42.80, MK218/CPD 43.78 (**Εικόνα 3.49 b**), Control/CPD 51.72, MK151/CPD 52.46 (**Εικόνα 3.49 c**)] παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, την 23<sup>η</sup> ημέρα ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK218 είναι  $0.26 \pm 0.02$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.31 \pm 0.01$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.14$ ) (**Εικόνα 3.49 b, ii**). Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν άγγιξε τη στατιστική σημαντικότητα. Το πείραμα επαναλήφθηκε έπειτα από 36 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης της MK218, όπου ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους

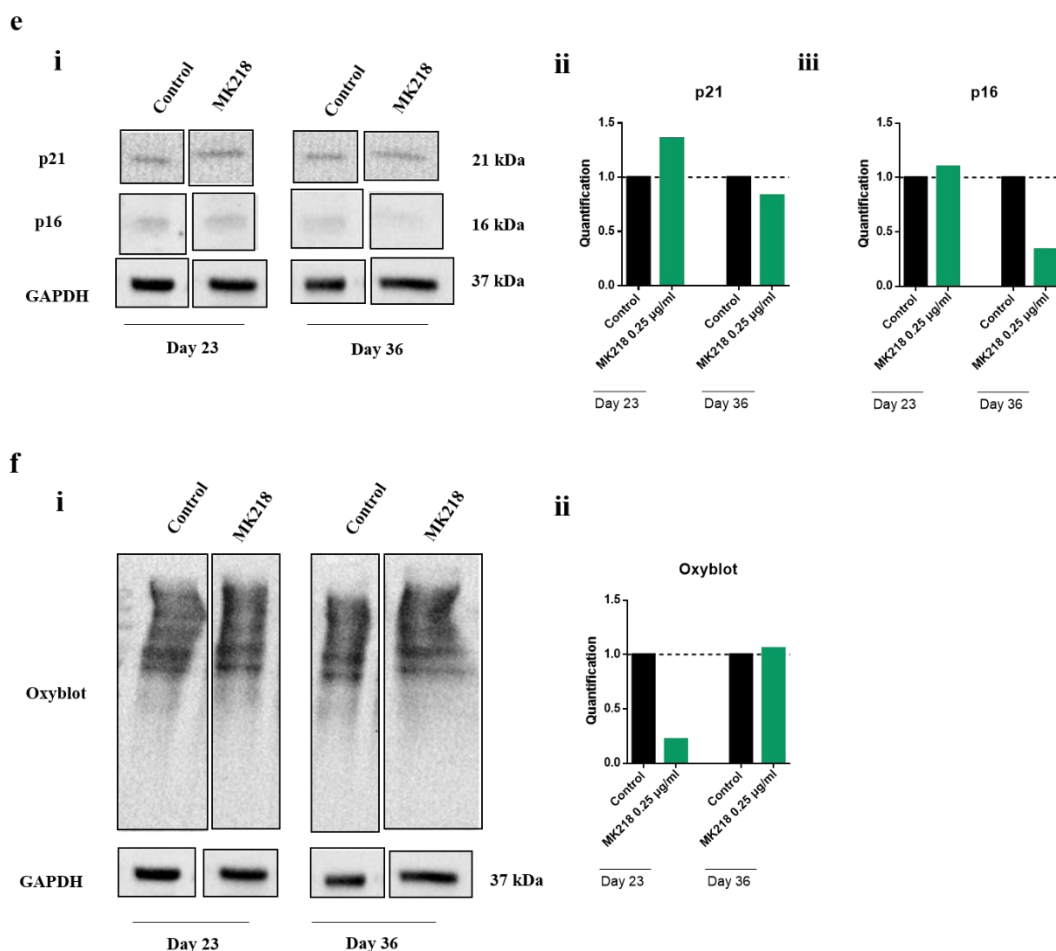
χορηγήθηκε MK218 είναι  $0.34 \pm 0.04$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.36 \pm 0.02$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.74$ ) (*Εικόνα 3.49 c, ii*). Παρόλο που τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, υποδεικνύουν πως ήδη από τις πρώτες είκοσι ημέρες χορήγησης, τα κύτταρα που δέχονται την επίδραση  $0.25 \mu\text{g/ml}$  MK218 διατηρούν το νεαρό τους φαινότυπο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες,

Για να ενισχυθεί η παραπάνω παρατήρηση, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία scratch assay την 36<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων. Η χορήγηση MK218 στους HFL-1 ινοβλάστες για 36 συνεχόμενες ημέρες επιτάχυνε το «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (*Εικόνα 3.49 d, i*). Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το μειωμένο αριθμό κυττάρων θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης και τον ενισχυμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που καταγράφηκε έπειτα από τη χρώση Crystal violet παρουσία της MK218 (*Εικόνα 3.49 d, ii*), υποδηλώνουν πως η χορήγηση της ένωσης οδηγεί σε διατήρηση του νεανικού φαινοτύπου των κυττάρων καθώς και σε αύξηση του πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα που τους χορηγήθηκε ο διαλύτης DMSO.

Ακόμη, μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών p21<sup>CIP1/WAF1</sup> και p16<sup>INK4A</sup> κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Σύμφωνα με την *Εικόνα 3.49 e*, όπως και στη συγκέντρωση  $0.1 \mu\text{g/ml}$ , παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης του p21 έπειτα από 23 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης της ένωσης στους HFL-1 ινοβλάστες, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (control). Η αύξηση αυτή παρουσίασε μείωση την 36<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων. Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης p16, παρουσιάστηκε ελάχιστα αυξημένη και στη συνέχεια μειωμένη την 23<sup>η</sup> και 36<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ πρώιμα, και περισσότερες επαναλήψεις χρειάζονται ώστε να διαλευκανθεί το τι ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση της συγκέντρωσης  $0.25 \mu\text{g/ml}$  MK218.

Τέλος, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών έπειτα από τη συνεχόμενη χορήγηση της ένωσης MK218 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) στις καλλιέργειες των κυττάρων στα ίδια χρονικά σημεία όπου πραγματοποιήθηκαν και τα παραπάνω πειράματα. Όπως παρουσιάζεται στο γράφημα της *Εικόνα 3.49 f*, τα κύτταρα που δέχονται την επίδραση της MK218 για περίπου είκοσι ημέρες παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες (control). Αντίθετα, τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών εμφανίστηκαν ελάχιστα αυξημένα έπειτα από 36 ημέρες συνεχόμενης χορήγησης  $0.25 \mu\text{g/ml}$  MK218. Περισσότερες επαναλήψεις του συγκεκριμένου πειράματος απαιτούνται ώστε να επιβεβαιωθούν οι παραπάνω παρατηρήσεις.





**Εικόνα 3.49:** Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.25 µg/ml επιμηκώνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 0.25 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 78 συνεχόμενες ημέρες. (b, c) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.25 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για (b) 23 και (c) 36 συνεχόμενες ημέρες. (d) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του κλεισίματος της «τεχνητής πληγής» HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.25 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για 36 συνεχόμενες ημέρες. Οι κόκκινες γραμμές εσωκλείουν την περιοχή της «τεχνητής πληγής». (ii) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) των ζωντανών κυττάρων έπειτα από χρώση με Crystal violet των HFL-1 ινοβλαστών που τους χορηγήθηκε 0.25 µg/ml MK218 ή ο διαλύτης DMSO (control) για 36 συνεχόμενες ημέρες. Η μέση τιμή της απορρόφησης των κυττάρων που δέχθηκαν τον διαλύτη DMSO (control) τέθηκε αυθαίρετα ως 100%. (e) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης (ii) p21 και (iii) p16 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.25 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για 23 και 36 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των p21 και p16 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από το

ανοσοαποτόπωμα. (f) (i) Ανοσοαποτόπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.25 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για 23 και 36 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t*-test.

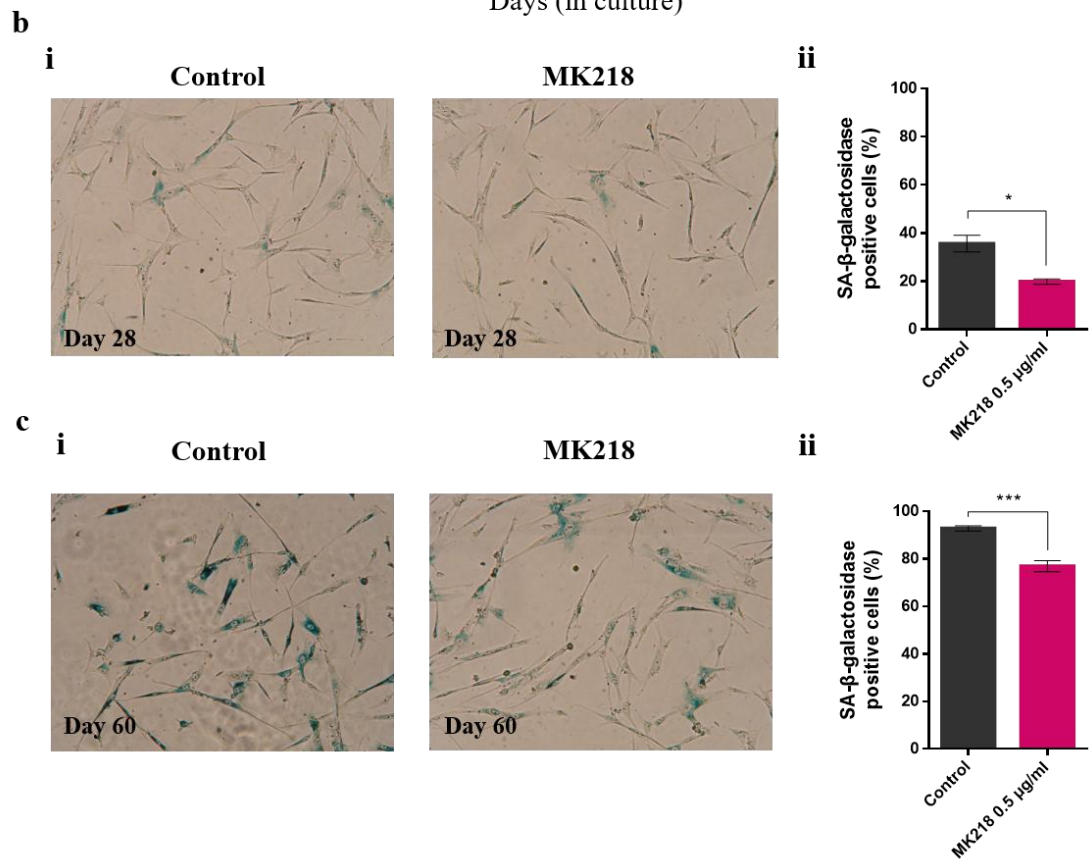
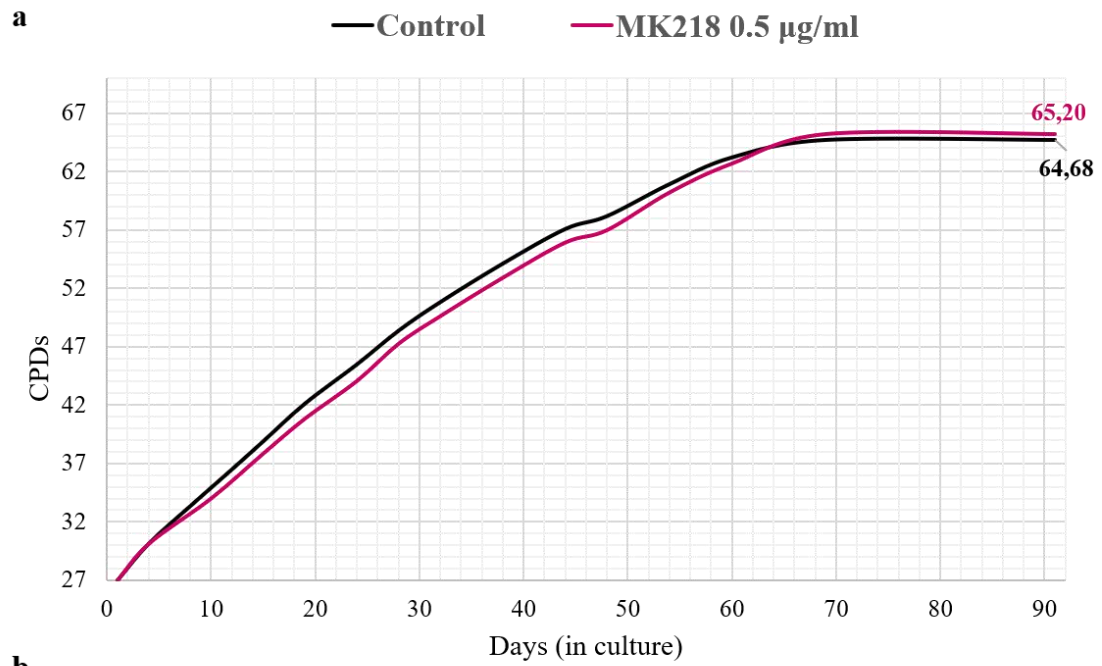
Στη συνέχεια, νεαροί HFL-1 ινοβλάστες (CPD 27) εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις συγκεντρώσεις 0.5 και 5 µg/ml και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.50 a**, η χορήγηση 0.5 µg/ml MK218 (1.18 µM) προκάλεσε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τη χορήγηση του διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5 µg/ml MK218 πραγματοποίησαν  $65.07 \pm 0.13$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $64.68 \pm 0.12$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p = 0.06$ ). Αντίθετα, η χορήγηση 5 µg/ml MK218 (11.80 µM) παρουσίασε κυτταροτοξική δράση *in vitro* μειώνοντας στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων, όπου τα κύτταρα πραγματοποίησαν μόλις  $31.86 \pm 0.27$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.0001$ ) (**Εικόνα 3.51**).

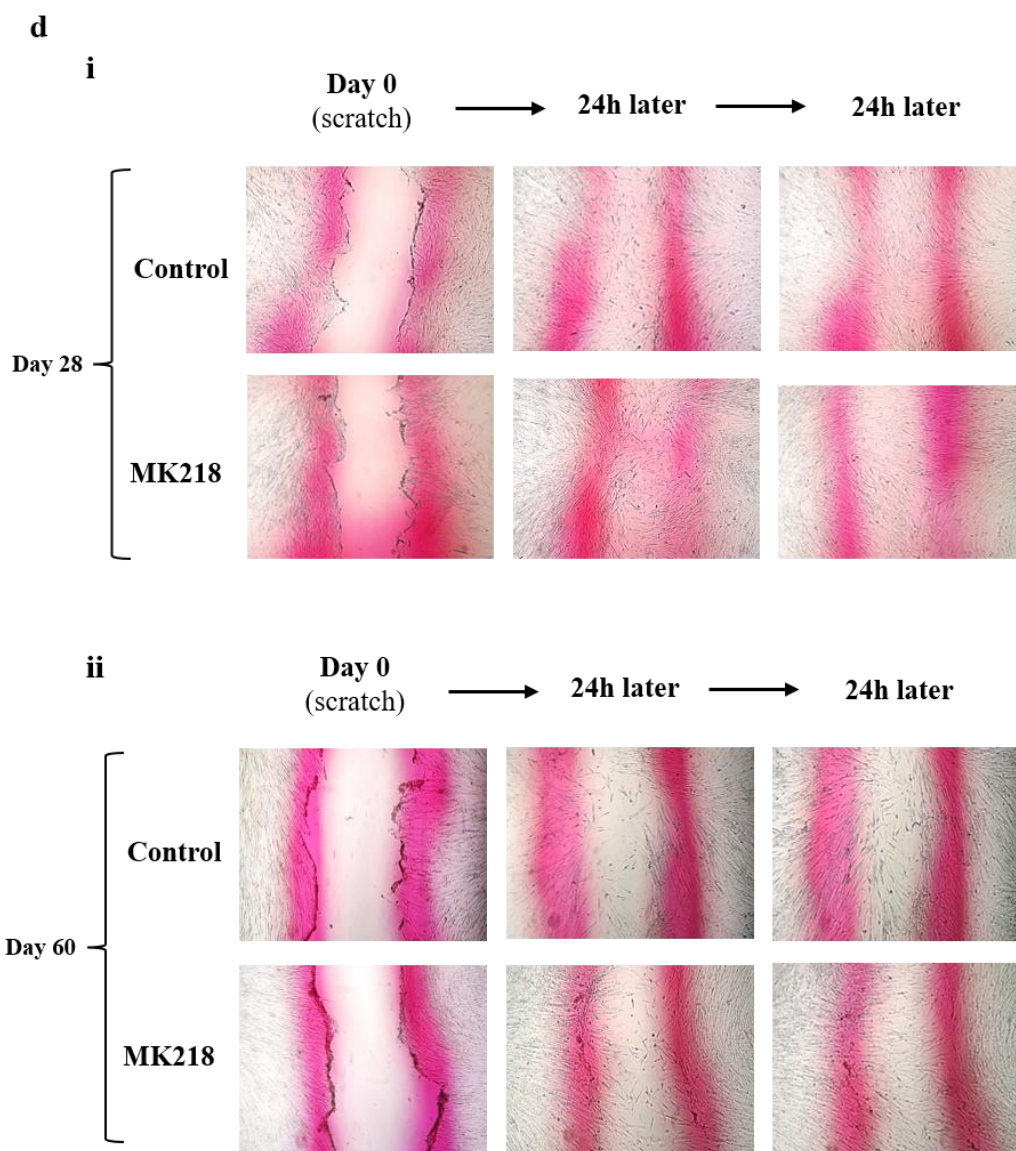
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης στα κύτταρα που δέχθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους 0.5 µg/ml MK218 είτε το διαλύτη DMSO (control) έπειτα από 28 και 60 ημέρες συνεχόμενης χορήγησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κύτταρα που δέχονταν την επίδραση της MK218 για περίπου ένα μήνα (MK218 0.5 µg/ml/CPD 47.25, Control/CPD 48.36) παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες. (**Εικόνα 3.50 b**). Πιο συγκεκριμένα, την 28<sup>η</sup> ημέρα ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάση κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK218 είναι  $0.19 \pm 0.01$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.35 \pm 0.03$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO· διαφορά στατιστικά σημαντική ( $p = 0.012$ ). Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε και την 60<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας των HFL-1 ινοβλαστών **Εικόνα 3.50 c**, όπου ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε MK218 είναι  $0.76 \pm 0.02$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.92 \pm 0.01$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.0003$ ). Παρόλο που τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η συνεχόμενη επίδραση 0.5 µg/ml MK218 διατηρεί το νεαρό φαινότυπο των κυττάρων και την καλύτερη μορφολογία τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες, αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο χρονικές στιγμές (ημέρα 28 και 60) τα κύτταρα παρουσία της MK218 είχαν πραγματοποιήσει έναν λιγότερο διπλασιασμό από τα κύτταρα-μάρτυρες.

Παράλληλα, πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία scratch assay για τη συγκέντρωση 0.5 µg/ml και τις δύο χρονικές στιγμές που πραγματοποιήθηκε η χρώση SA-β-γαλακτοσιδάση. Όπως παρουσιάζεται στις διαδοχικές λήψεις της **Εικόνα 3.50 d**, η

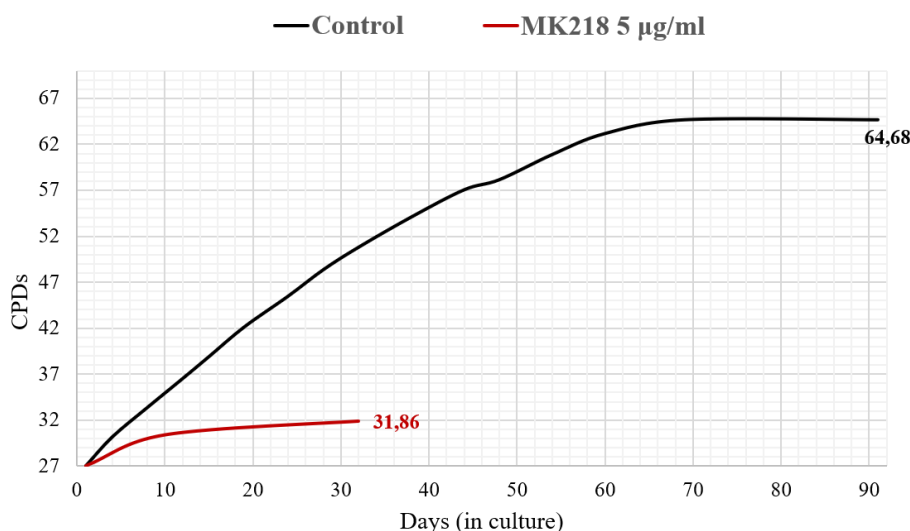
χορήγηση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  MK218 στους HFL-1 ινοβλάστες για 28 ή 60 συνεχόμενες ημέρες δεν οδήγησε σε εμφανή διαφορά στο «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control).

Συνολικά, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση της ένωσης MK218 στις συγκεντρώσεις 0.1, 0.25 και 0.5  $\mu\text{g/ml}$  πραγματοποίησαν ~ 2, 1 και 0.5 περισσότερους διπλασιασμούς σε σύγκριση με τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση του οργανικού διαλύτη DMSO (control). Η συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  MK218 παρουσίασε ισχυρή τοξική δράση, διακόπτοντας πρόωρα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επομένως, εκτιμώντας όλα τα ανωτέρω αποτελέσματα που αφορούν την αντιγηραντική δράση της ένωσης MK218 *in vitro*, συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση η οποία οδηγεί σε επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής των HFL-1 ινοβλαστών και παράλληλα βελτιώνει σημαντικούς δείκτες κυτταρικής ευζωίας (healthspan), είναι η 0.1  $\mu\text{g/ml}$ .





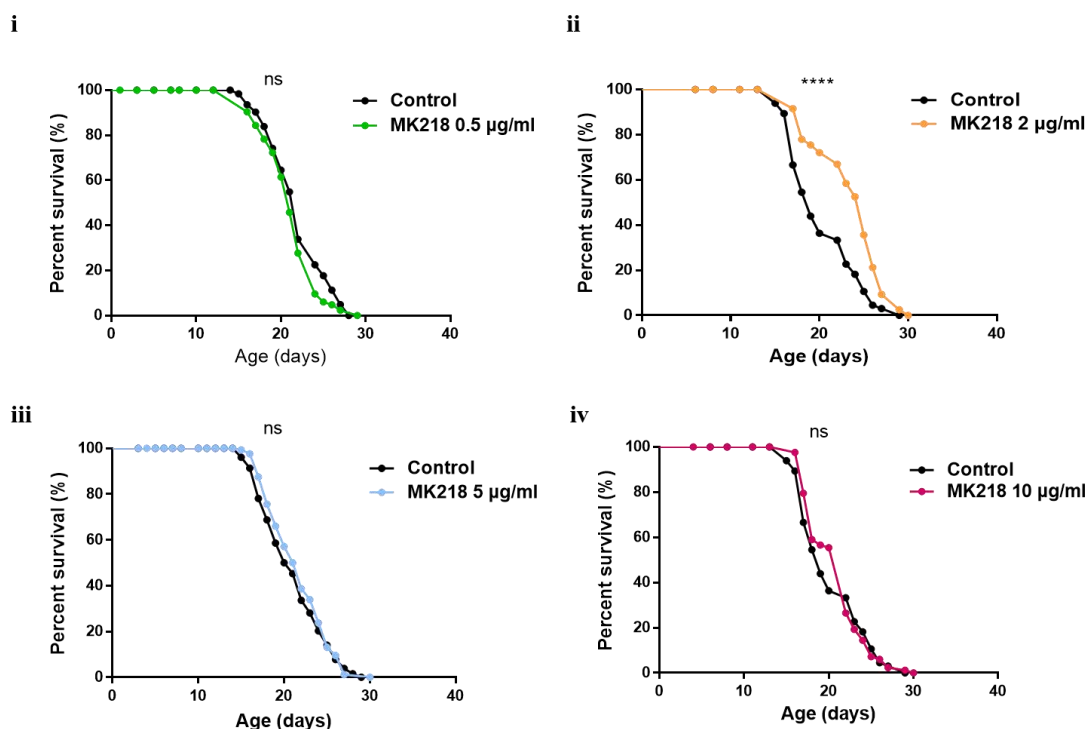
**Εικόνα 3.50: Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου.** (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 91 συνεχόμενες ημέρες. (b, c) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για (b) 28 και (c) 60 συνεχόμενες ημέρες. (d) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του κλεισίματος της «τεχνητής πληγής» HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) για (i) 28 και (ii) 60 συνεχόμενες ημέρες. Οι κόκκινες γραμμές εσωκλείουν την περιοχή της «τεχνητής πληγής». Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.



**Εικόνα 3.51:** Η ένωση MK218 στη συγκέντρωση 5 µg/ml παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση στο προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 5 µg/ml MK218 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 91 συνεχόμενες ημέρες.

#### 3.2.8.4 Η ένωση MK218 επιμηκύνει το οργανισμικό προσδόκιμο ζωής στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*

Προχωρήσαμε στη χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων της ένωσης MK218 (0.5, 2, 5 και 10 µg/ml) στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, ώστε να ελέγξουμε την επίδραση της ένωσης στη διάρκεια ζωής των ζώων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου στέλεχος (N2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα γραφήματα της **Εικόνα 3.52**, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής των σκωλήκων οι οποίοι δέχτηκαν την επίδραση της ένωσης MK218 στη συγκέντρωση 2 µg/ml.

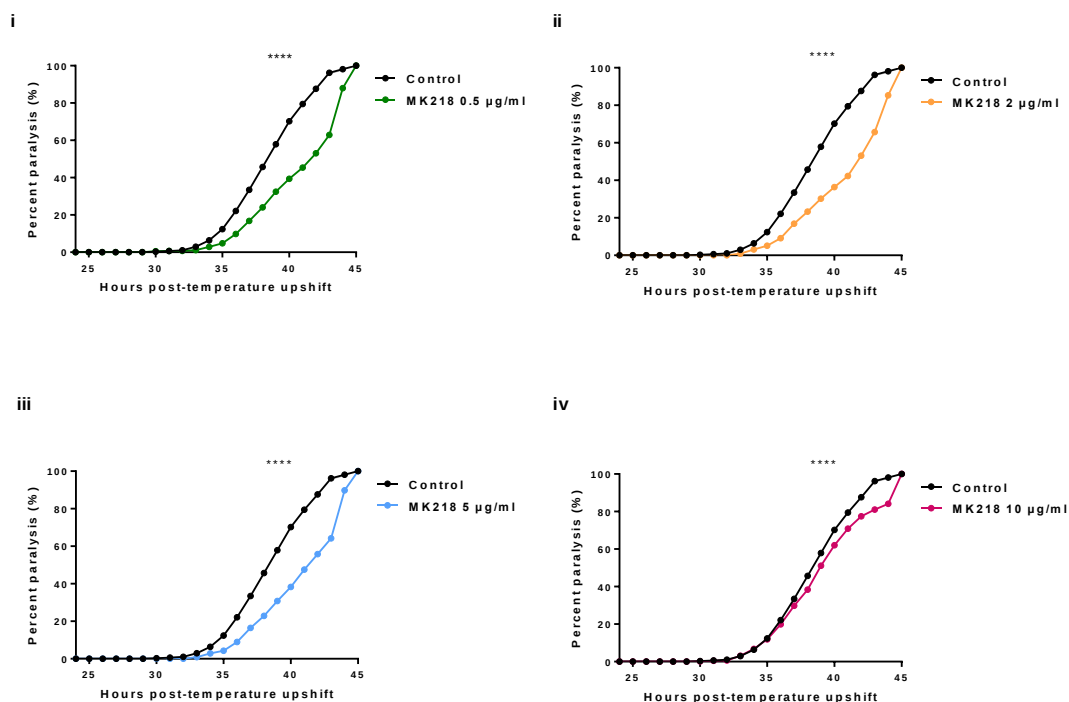


**Εικόνα 3.52: Η ένωση MK218 αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans*.** Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης των αγρίων τύπου σκωλήκων (N2) που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης MK218 και σε αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO (control). (i) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 22 (N=62/107) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν κατά τη διάρκεια της ζωής τους στην ένωση MK218 σε συγκέντρωση 0.5 µg/ml είναι 21 ημέρες (N=83/131). (ii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 19 (N=66/88) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK218 σε συγκέντρωση 2 µg/ml είναι 25 ημέρες (N=118/125). (iii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $20.07 \pm 0.25$  (N=128/195) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK218 σε συγκέντρωση 5 µg/ml είναι  $20.94 \pm 0.23$  ημέρες (N=168/257). (iv) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 19 (N=66/88) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση MK218 σε συγκέντρωση 10 µg/ml είναι 22 ημέρες (N=83/134).

### 3.2.8.5 Η ένωση MK218 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης σε οργανισμικό επίπεδο

Στη συνέχεια, θέλαμε να προχωρήσουμε στη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής δράσης της ένωσης MK218 *in vivo* στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος-μοντέλο για την AD στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, CL4176, μέσω του οποίου πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες παράλυσης (Link et al., 2003). Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση 0.5, 2, 5 και 10 µg/ml MK218. Παρουσία της MK218 αποκαλύφθηκε ότι επιβραδύνεται στατιστικά σημαντικά τόσο η έναρξη όσο και ο ρυθμός παράλυσης των σκουληκιών σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) και στις τέσσερις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (Εικόνα 3.53). Ως βέλτιστη (καλύτερη και μικρότερη αποτελεσματική) συγκέντρωση κρίνεται η 2 µg/ml MK218. Περισσότερα πειράματα απαιτείται να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας και άλλα στελέχη-μοντέλα της AD προκειμένου

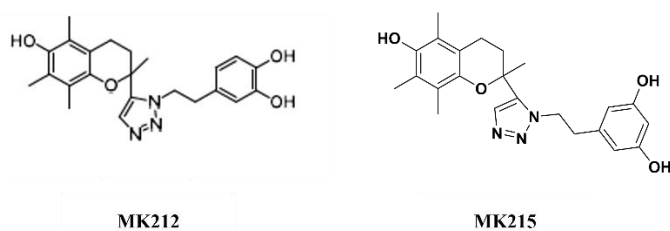
αφενός να επιβεβαιωθεί η νευροπροστατευτική δράση της ένωσης MK218 και αφετέρου να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης της ένωσης.



**Εικόνα 3.53:** Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ένωση MK218 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του  $A\beta_{1-42}$  πεπτιδίου. Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $38.29 \pm 0.20$  (N=783/807) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του  $A\beta$  πεπτιδίου, ενώ (i) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml MK218 παρέλυσε στις  $41.60 \pm 0.26$  (N=891/917) ώρες, (ii) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 2 µg/ml MK218 παρέλυσε στις  $41.73 \pm 0.24$  (N=896/924) ώρες, (iii) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 5 µg/ml MK218 παρέλυσε στις  $42.21 \pm 0.24$  (N=656/685) ώρες και (iv) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 10 µg/ml MK218 παρέλυσε στις  $38.93 \pm 0.23$  (N=806/829) ώρες..

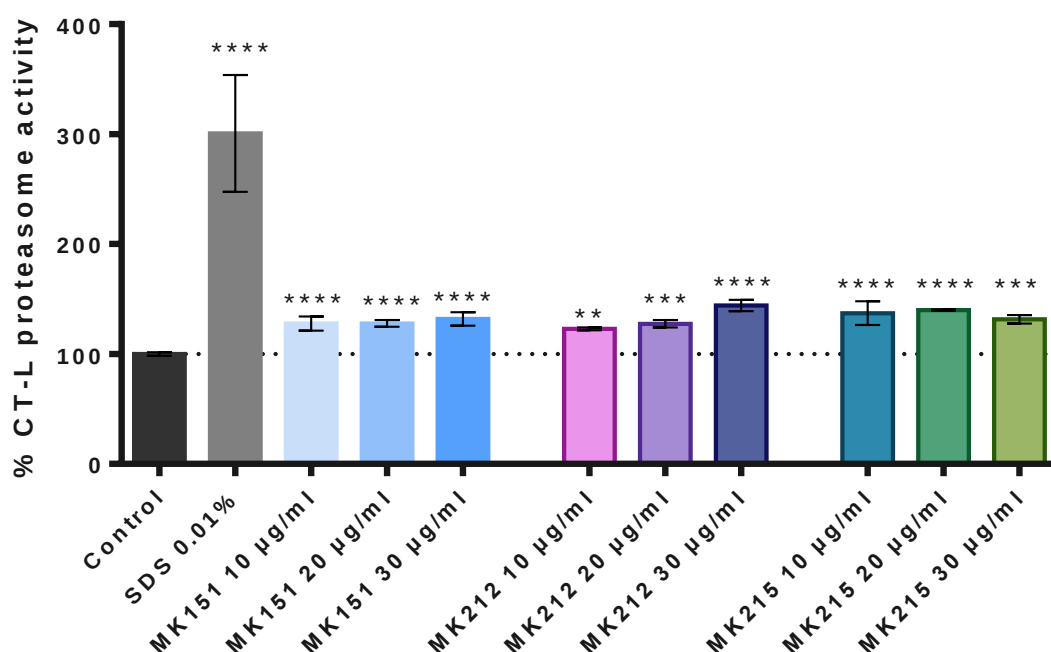
### 3.2.9 Μελέτη παράγωγων ενώσεων της ένωσης MK151

Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν παράγωγες υβριδικές ενώσεις της MK151, ώστε να μελετηθεί ακόμα καλύτερα η δράση της ως δομικού ενεργοποιητή του 20S πρωτεασώματος και να βρεθεί η βέλτιστη ένωση που δρα ως ενεργοποιητής του πρωτεασώματος. Για το σκοπό αυτό, συντέθηκε η ένωση MK212 (MW 409.48 g/mol), η οποία αποτελεί το τοποϊσομερές της MK151 ώστε να μελετηθεί η επίδραση της διαμόρφωσης στη δράση της ένωσης. Τα τοποϊσομερή είναι μόρια με τον ίδιο χημικό τύπο και την ίδια συνδεσιμότητα στερεοχημικών δεσμών, αλλά με διαφορετικές τοπολογίες. Επίσης, συντέθηκε η ένωση MK215 (MW 409.48 g/mol), στην οποία η υδροξυτυροσώλη έχει αντικατασταθεί από τη ρεσορκινώλη, μια ένωση με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Fotopoulou et al., 2024).



**Εικόνα 3.54:** Χημική δομή των ενώσεων MK212 και MK215.

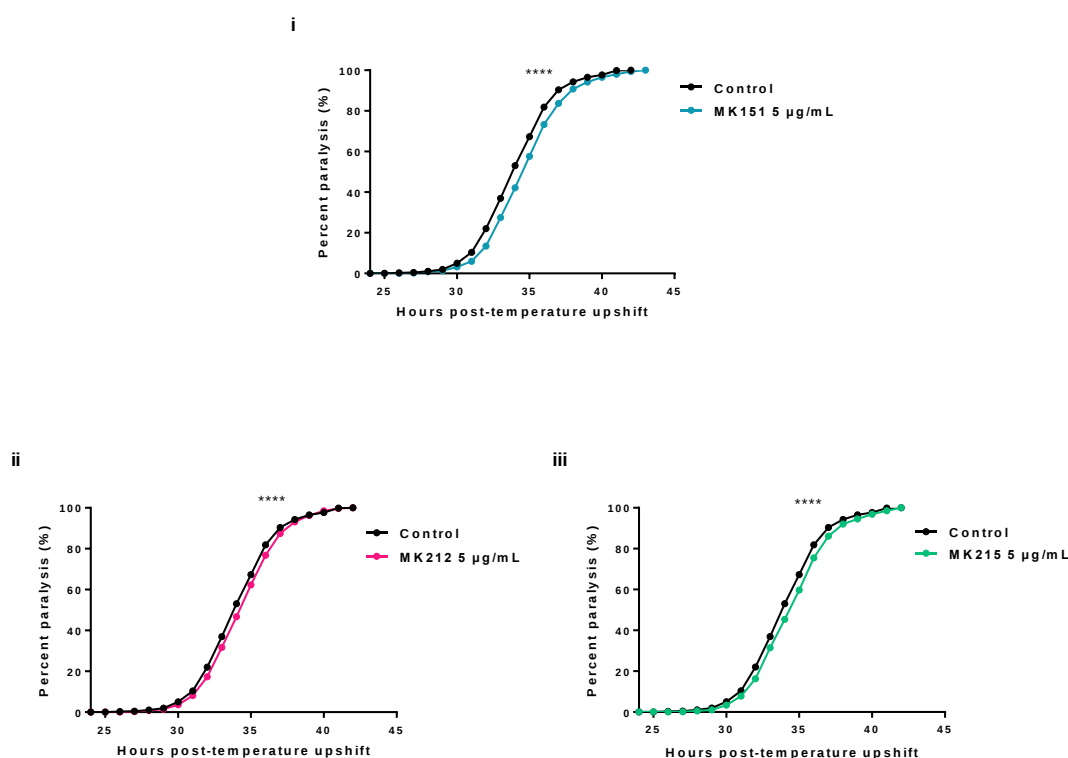
Χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο, καθαρό, ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα και οι τρεις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν οι 10, 20 και 30  $\mu\text{g/ml}$ , καθώς αυτές έχουν κριθεί βέλτιστες για την ένωση MK151. Σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.55**, και οι δύο ενώσεις ενεργοποιούν δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) στατιστικά σημαντικά και στις τρεις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Ειδικότερα, η βέλτιστη συγκέντρωση της ένωσης MK212 είναι η 30  $\mu\text{g/ml}$  (73.26  $\mu\text{M}$ ), όπου μετά από επώαση του καθαρού 20S πρωτεασώματος με την συγκέντρωση αυτή αύξησε κατά 1.4 φορές την πρωτεασωμική ενεργότητα. Η βέλτιστη συγκέντρωση για την ένωση MK215 είναι η 20  $\mu\text{g/ml}$  (48.84  $\mu\text{M}$ ), όπου οδήγησε σε αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας κατά 1.4 φορές.



**Εικόνα 3.55:** Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης MK212 και MK215 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων MK212 και MK215. Για την ένωση MK212 στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $122.9 \pm 1.36$ , στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $127.5 \pm 3.44$  και στη συγκέντρωση 30  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $144.2 \pm 5.15$ . Για την ένωση MK215 στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $137.1 \pm 10.76$ , στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  το ποσοστό ενεργοποίησης είναι

140.0 ± 0.70 και στη συγκέντρωση 30 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι 131.5 ± 3.79. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA). Η ένωση MK151 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης με τις νέες υβριδικές ενώσεις.

Για να συγκριθεί η βιολογική δραστηριότητα των νέων υβριδικών ενώσεων με την ένωση-οδηγό MK151, θελήσαμε να εξετάσουμε τη νευροπροστατευτική τους δράση σε οργανισμικό επίπεδο. Έτσι, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες παράλυσης στο στέλεχος-μοντέλο για την AD στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, CL4176. Μελετήθηκε η επίδραση 5 µg/ml MK212 και MK215. Παράλληλα, στο ίδιο πείραμα, μελετήθηκε και η ένωση MK151 στη συγκέντρωση 5 µg/ml ώστε να συγκριθούν ταυτόχρονα οι δράσεις των τριών ενώσεων. Κατά την επίδραση τόσο της MK212 όσο και της MK215 αποκαλύφθηκε ότι επιβραδύνεται στατιστικά σημαντικά ο ρυθμός παράλυσης των σκωλήκων σε σύγκριση με τα ζώα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control). Εντούτοις, η επιβράδυνση της παράλυσης των σκωλήκων που επιτυγχάνεται μέσω της ένωσης MK151 στην ίδια συγκέντρωση (5 µg/ml) είναι ισχυρότερη σε σύγκριση με την ένωση MK212 αλλά και την MK215 (Εικόνα 3.56). Επομένως, δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα για τις δύο αυτές ενώσεις.



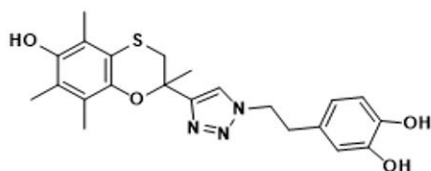
**Εικόνα 3.56:** Η έκθεση του στελέχους CL4176 στις ενώσεις MK212 και MK215 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις 33.86 ± 0.17 (N=3097/3125) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, ενώ (i) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 5 µg/ml MK151 παρέλυσε στις 34.51 ± 0.18 (N=2867/2893), (ii) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 5 µg/ml MK212

παρέλυσε στις  $34.17 \pm 0.17$  ( $N=2791/2816$ ) ώρες και το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  MK215 παρέλυσε στις  $34.26 \pm 0.18$  ( $N=2457/2482$ ) ώρες.

### 3.2.10 Μελέτη οξαθειϊνικών αναλόγων της ένωσης MK151

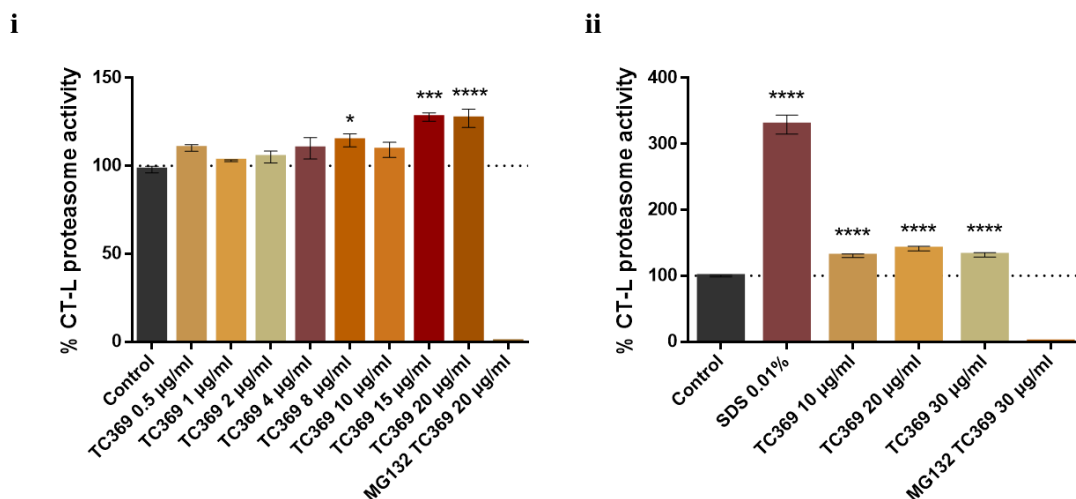
#### 3.2.10.1 Η ένωση TC369 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος

Στη συνέχεια, μελετήσαμε ενώσεις οι οποίες περιέχουν ισοστερή των χρωμανίων και στις οποίες το μεθυλένιο στη θέση 4 του χρωμανικού δακτυλίου έχει αντικατασταθεί από άτομο θείου. Αρχικά, σχεδιάστηκε και συντέθηκε η βιοϊσοστερής ένωση της MK15, **TC369** (MW 427.52 g/mol), στην οποία το θείο έχει λάβει τη θέση του μεθυλενίου στη θέση 4 του χρωμανικού δακτυλίου (*Εικόνα 3.57*). Πρωταρχικός σκοπός ήταν να ελεγχθεί η ικανότητα της ένωσης να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα μέσω απευθείας στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στην *Εικόνα 3.58 i*, η ένωση TC369 ενεργοποιεί δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά περίπου 1.4 φορές μετά από επώαση του καθαρού 20S πρωτεασώματος με την ένωση TC369 σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$  (46.78  $\mu\text{M}$ ).



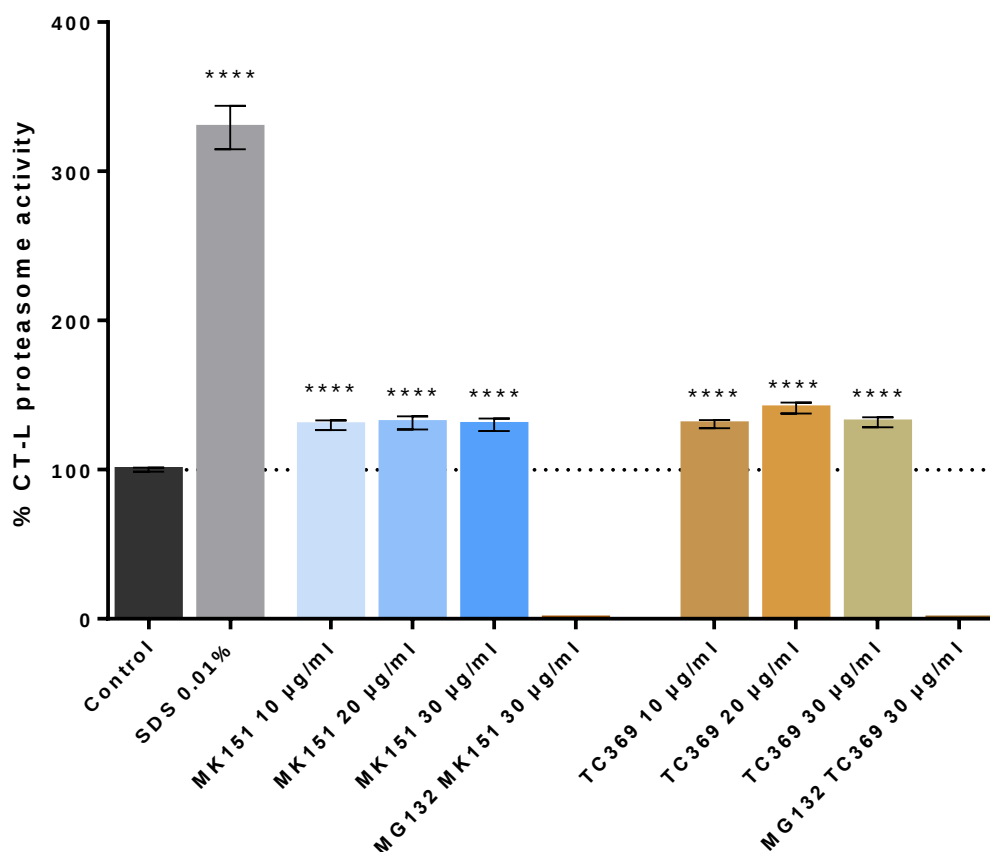
*Εικόνα 3.57: Χημική δομή της ένωσης TC369.*

Σε συνέχεια των ανωτέρω θετικών αποτελεσμάτων, ελέγχθηκαν ξανά οι δύο (2) από τις καλύτερες συγκεντρώσεις (10 και 20  $\mu\text{g/ml}$ ) της TC369 που έχουμε δείξει να ενεργοποιούν το καθαρό πρωτεάσωμα απουσία κυτταρικών λυμάτων, καθώς και η συγκέντρωση 30  $\mu\text{g/ml}$  ώστε να διαλευκανθεί η μέγιστη αποδοτική συγκέντρωση της ένωσης. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην *Εικόνα 3.58 ii* έδειξαν ότι η ένωση TC369 ενεργοποιεί δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά 1.4 φορές μετά από επώαση του καθαρού 20S πρωτεασώματος με την ένωση στη συγκέντρωση 20  $\mu\text{g/ml}$ , υψηλότερη αποδοτική συγκέντρωση.



**Εικόνα 3.58: Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης TC369 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος.** Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης TC369. (i) Στη συγκέντρωση 8 µg/ml (πρώτη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $114.5 \pm 3.73$ , στη συγκέντρωση 15 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $127.8 \pm 2.41$  και στη συγκέντρωση 30 µg/ml (μέγιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται ενεργοποίηση) το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $127.1 \pm 5.26$ . (ii) Στη συγκέντρωση 10 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $130.5 \pm 2.66$ , στη συγκέντρωση 20 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $141.3 \pm 3.61$ , και στη συγκέντρωση 30 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $131.8 \pm 3.34$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

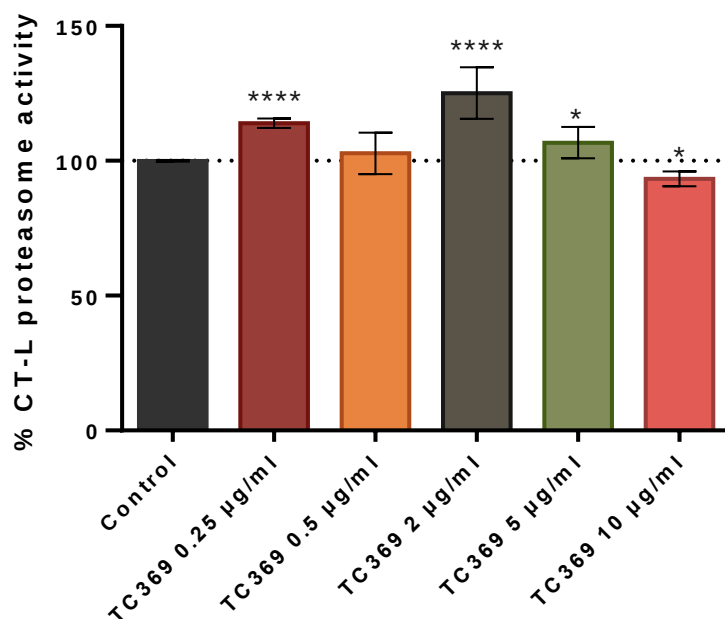
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν παράλληλα πειράματα με τις ενώσεις MK151 και TC369 χρησιμοποιώντας καθαρό, απομονωμένο ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα, με στόχο να διερευνηθεί ποια από τις δύο ενώσεις επιτυγχάνει μεγαλύτερη ενεργοποίηση του πρωτεασώματος. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνα 3.59** διακρίνεται πως και οι δύο ενώσεις ενεργοποιούν δομικά, πιθανά μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης, το 20S πρωτεάσωμα απουσία κυτταρικών λυμάτων αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά περίπου 1.3 φορές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρουσία της ένωσης TC369 στη συγκέντρωση 20 µg/ml, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος αυξάνεται κατά περίπου 1.4 φορές· μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με όσα έχουν καταγραφεί σε όλες τις συγκεντρώσεις της MK151 που δοκιμάστηκαν.



**Εικόνα 3.59:** Ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης των ενώσεων MK151 και TC369 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης MK151 και TC369. Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

### 3.2.10.2 Η ένωση TC369 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η πρωτεασωμική ενεργοποίηση μπορεί να επιτευχθεί και έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης TC369 σε HFL-1 ινοβλάστες για αποτίμηση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης *in cellulo*. Χρησιμοποιήσαμε HFL-1 κύτταρα που τους χορηγήσαμε διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης TC369 για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) αυξάνεται στατιστικά σημαντικά στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στην ένωση TC369 στις συγκεντρώσεις 0.25, 2 και 5 µg/ml (0.58, 4.67 και 11.69 µM) σε σύγκριση με εκείνους που εκτέθηκαν μόνο στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) (Εικόνα 3.60). Ωστόσο, η συγκέντρωση 5 µg/ml προκάλεσε αύξηση της τάξης του 106% και για αυτό δεν λαμβάνεται υπόψη.

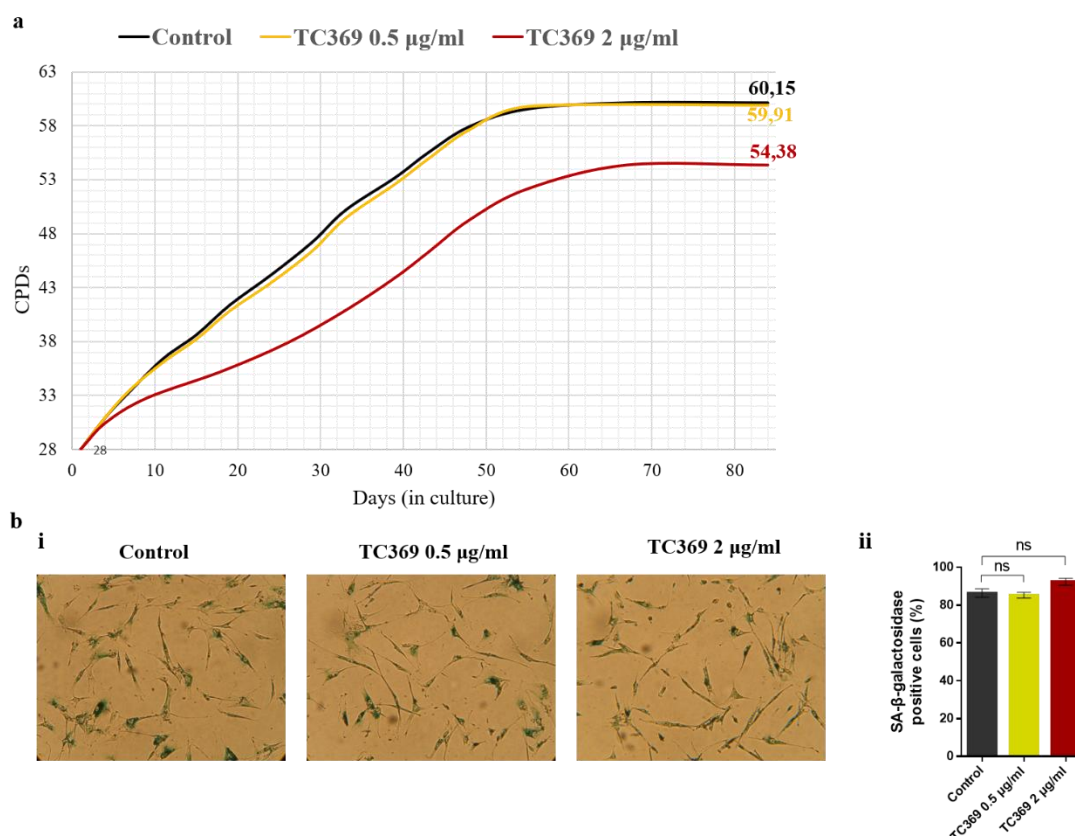


**Εικόνα 3.60:** Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε νεαρούς πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου μετά από εικοσιτετράωρη έκθεση στην ένωση TC369. Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος σε HFL-1 ινοβλάστες που τους χορηγήθηκε η ένωση TC369 στις συγκεντρώσεις 0.25, 0.5, 2, 5 και 10 µg/ml για 24 ώρες. Η έκθεση των κυττάρων στη συκέντρωση 0.25 µg/ml προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας σε ποσοστό  $113.9 \pm 0.7$ , στη συκέντρωση 2 µg/ml προκάλεσε αύξηση σε ποσοστό  $125.1 \pm 3.17$  και στη συκέντρωση 5 µg/ml προκάλεσε αύξηση σε ποσοστό  $106.7 \pm 2.37$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA).

### 3.2.10.3 Η ένωση TC369 επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου

Δεδομένης της ικανότητας της ένωσης TC369 να ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα τόσο *in vitro* όσο και *in cellulo*, συνεχίσαμε ελέγχοντας την επίδραση της χορήγησής της στην εξέλιξη της γήρανσης HFL-1 ινοβλαστών. Για το σκοπό αυτό, HFL-1 κύτταρα (CPD 28) εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2 µg/ml και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control) για να αποτιμηθεί η αντιγηραντική δράση της ουσίας *in vitro* και παράλληλα να συγκριθεί με την αντιγηραντική δράση της MK151. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνα 3.61 a**, η χορήγηση 0.5 µg/ml TC369 δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τη χορήγηση του διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control), αφού τα κύτταρα πραγματοποίησαν τον ίδιο αριθμό διπλασιασμών. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5 µg/ml TC369 πραγματοποίησαν  $59.91 \pm 0.10$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $60.15 \pm 0.16$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p = 0.35$ ). Αντίθετα, η χορήγηση 2 µg/ml TC369 μείωσε στατιστικά σημαντικά το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων, όπου τα κύτταρα πραγματοποίησαν  $54.39 \pm 0.05$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.0001$ ).

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε καθυστέρηση της γήρανσης κατά τη χορήγηση της ένωσης TC369 στους HFL-1 ινοβλάστες, πραγματοποιήσαμε τη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης στους υπό μελέτη πληθυσμούς κυττάρων (παρουσία TC369 και παρουσία του διαλύτη DMSO) την 48<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας (**Εικόνα 3.61 b**). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κύτταρα που δέχθηκαν τη συνεχόμενη επίδραση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 κατά τη διάρκεια της ζωής τους και είχαν πραγματοποιήσει τους ίδιους διπλασιασμούς με τα κύτταρα μάρτυρες (DMSO/CPD 57.95, TC369 0.5  $\mu\text{g/ml}$ /CPD 57.64) παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό κυττάρων θετικών στη χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στο διαλύτη DMSO (control). Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 είναι  $0.84 \pm 0.01$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.86 \pm 0.02$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.61$ ). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στη συγκέντρωση 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369, όπου ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν είναι  $0.91 \pm 0.18$  ( $p = 0.10$ ).



**Εικόνα 3.61:** Η ένωση TC369 στις συγκεντρώσεις 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  δεν επιμηκώνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 και στο διαλύτη DMSO

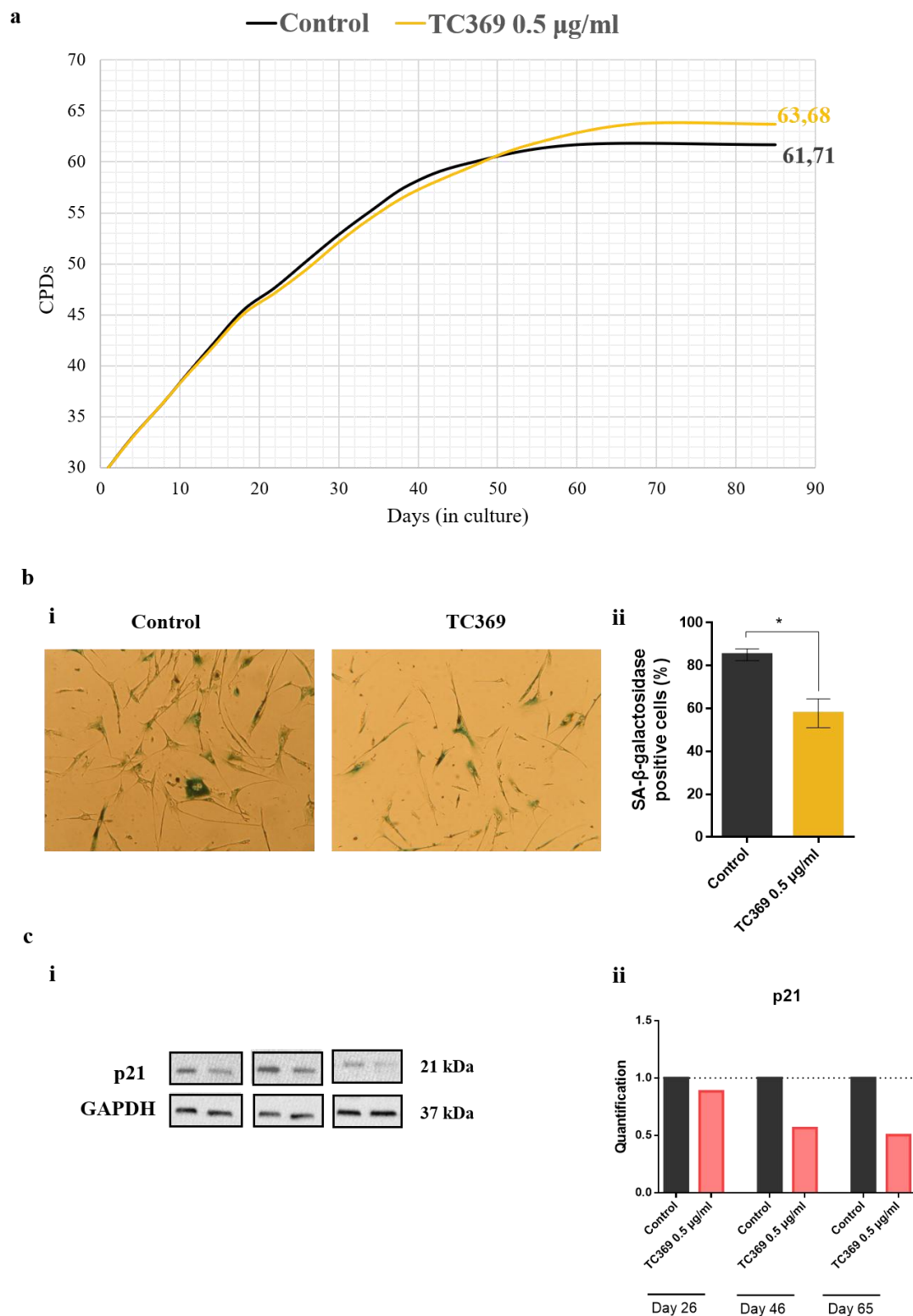
(control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 84 συνεχόμενες ημέρες. (b) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλάστων και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 και 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) για 48 συνεχόμενες ημέρες.

Για να αποσαφηνιστεί η αντιγηραντική δράση της ένωσης TC369 στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, το πείραμα επαναλήφθηκε με χορήγηση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  της ένωσης σε νεαρούς HFL-1 ινοβλάστες (CPD 30) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους έως ότου ολοκληρώσουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.62** έδειξαν ότι η ένωση TC369 στη συγκέντρωση αυτή προκαλεί επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής κατά περίπου δύο κυτταρικούς διπλασιασμούς. Ειδικότερα τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 πραγματοποίησαν  $63.68 \pm 0.20$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $61.54 \pm 0.16$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p < 0.0001$ ).

Θέλοντας να το διερευνήσουμε περαιτέρω, πραγματοποιήσαμε τη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς κυττάρων (παρουσία TC369 και παρουσία του διαλύτη DMSO) την 46<sup>η</sup> ημέρα: χρονικό σημείο όπου τα κύτταρα-μάρτυρες άρχισαν να εμφανίζουν μείωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόλο το γεγονός ότι τα κύτταρα που δέχθηκαν τη συνεχόμενη επίδραση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 κατά τη διάρκεια της ζωής τους είχαν πραγματοποιήσει τους ίδιους διπλασιασμούς με τα κύτταρα-μάρτυρες (DMSO/CPD 59.81, TC369 0.5  $\mu\text{g/ml}$ /CPD 59.27) παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικόνα 3.62 b**), υποδηλώνοντας πως τα κύτταρα που δέχονται την επίδραση της TC369 διατηρούν τον νεαρό τους φαινότυπο. Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε TC369 είναι  $0.57 \pm 0.06$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.85 \pm 0.02$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.03$ ).

Επιπρόσθετα, μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση της πρωτεΐνης p21<sup>CIP1/WAF1</sup> κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Σύμφωνα με την **Εικόνα 3.62 c**, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της p21 έπειτα από 26, 46 και 65 συνεχόμενες ημέρες χορήγησης της ένωσης TC369 στους HFL-1 ινοβλάστες, σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στον οργανικό διαλύτη DMSO (control). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν συνάδουν με το διάγραμμα του αριθμού των κυτταρικών διπλασιασμών των δύο ομάδων ελέγχου, καθώς η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης p21 που εμφανίζεται την 26<sup>η</sup> και 46<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας υποδηλώνει πως τα κύτταρα διαθέτουν ακόμη το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό. Αντιθέτως, η μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p21 την 65<sup>η</sup> ημέρα συνεχόμενης καλλιέργειας των κυττάρων, υποδεικνύει πως τα κύτταρα έχουν εισέλθει στο στάδιο της μη αντιστρεπτής παύσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εφόσον

πλέον δεν πραγματοποιούν επιπλέον κυτταρικές διαιρέσεις (DMSO/CPD 61.71, TC369 0.5  $\mu\text{g/ml}$ /CPD 63.68). Ωστόσο, επανάληψη του ανωτέρου πειράματος απαιτείται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.



**Εικόνα 3.62:** Η ένωση TC369 στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  επιμηκώνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του

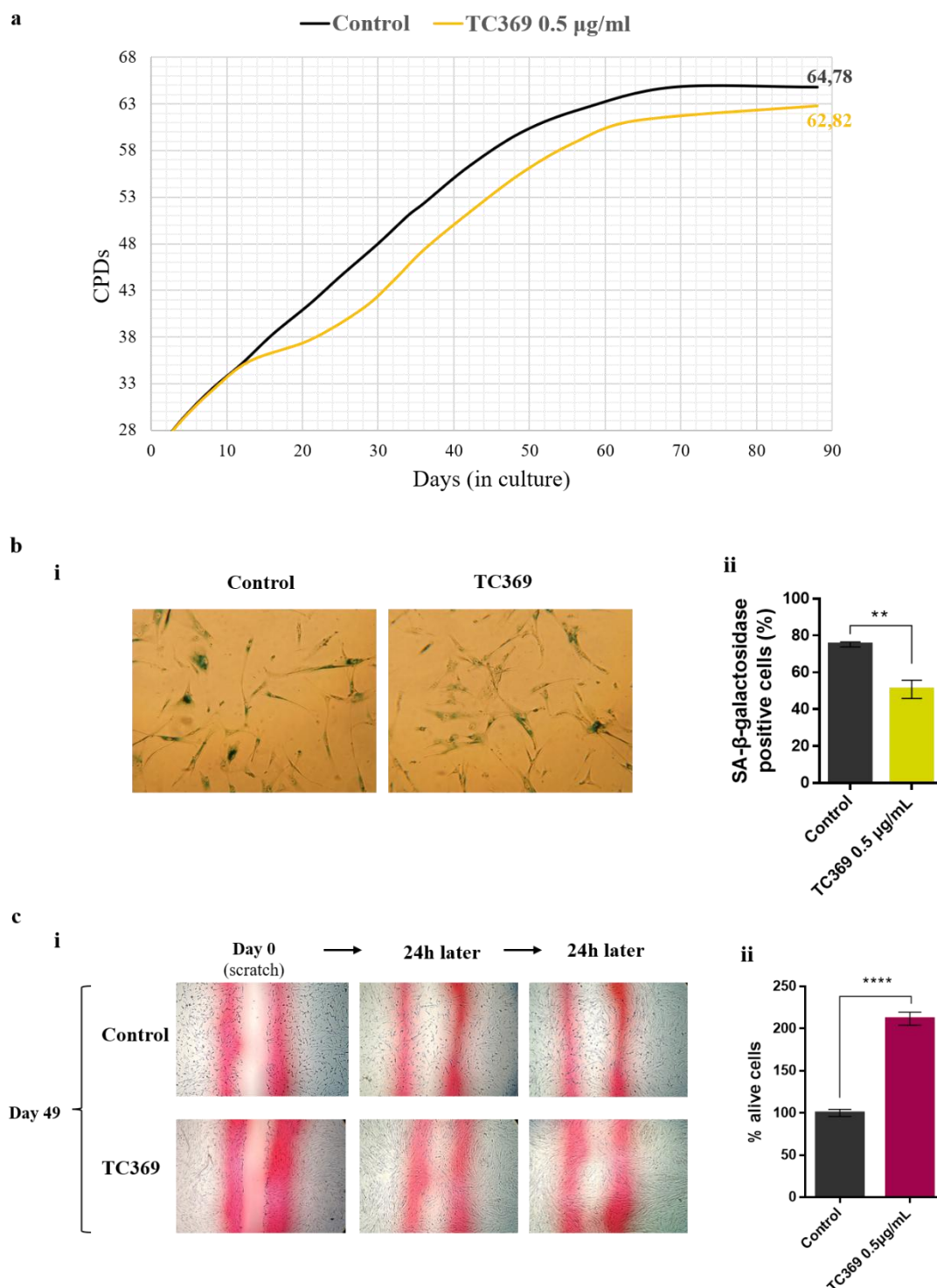
**ανθρώπου.** (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 78 συνεχόμενες ημέρες. (b) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1 ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) για 46 συνεχόμενες ημέρες. (c) (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) για 26, 46 και 65 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης της p21 στους HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από το ανοσοαποτύπωμα.

Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, το πείραμα της κυτταρικής γήρανσης πραγματοποιήθηκε και τρίτη φορά. Έτσι, HFL-1 ινοβλάστες (CPD 28) εκτέθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους στις συγκέντρωση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 και στον οργανικό διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνα 3.63 a**, η χορήγηση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τη χορήγηση του διαλύτη DMSO (μάρτυρας, control). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 0.5  $\mu\text{g/ml}$  TC369 πραγματοποίησαν  $62.82 \pm 0.57$  κυτταρικές διαιρέσεις, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες που πραγματοποίησαν  $64.78 \pm 0.08$  κυτταρικές διαιρέσεις ( $p = 0.002$ ).

Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε τη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς κυττάρων (παρουσία TC369 και παρουσία του διαλύτη DMSO) την 49<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειά τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κύτταρα που δέχονταν την επίδραση της TC369 παρέμεναν σε μεγάλο ποσοστό αρνητικά στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος των θετικών στη χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων που μετρήθηκαν και που τους χορηγήθηκε TC369 είναι  $0.49 \pm 0.05$  σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο  $0.75 \pm 0.01$  των κυττάρων που τους χορηγήθηκε DMSO ( $p = 0.006$ ) (**Εικόνα 3.63 b**). Ωστόσο, τα κύτταρα που δεχόντουσαν για περίπου ενάμιση μήνα την επίδραση της ένωσης TC369 είχαν πραγματοποιήσει περίπου τέσσερις λιγότερους διπλασιασμούς σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (Control/CPD 59.96, TC369/CPD 55.64).

Τέλος, πραγματοποιήσαμε και τη δοκιμασία scratch assay την ίδια χρονική στιγμή όπου πραγματοποιήθηκε και η χρώση SA- $\beta$ -γαλακτοσιδάσης (ημέρα 49). Η χορήγηση της TC369 στους HFL-1 ινοβλάστες για 49 συνεχόμενες ημέρες επιτάχυνε το «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (**Εικόνα 3.63 c, i**). Το αποτέλεσμα αυτό συνοδεύτηκε και από ενισχυμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που καταγράφηκε έπειτα από τη χρώση Crystal violet παρουσία της TC369 (**Εικόνα 3.63 c, ii**).

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε επιμήκυνση του κυτταρικού προσδόκιμου ζωής στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, οι δείκτες κυτταρικής ευζωίας που μελετήθηκαν έδειξαν πως η χορήγηση της ένωσης TC369 διατηρεί το νεανικό φαινότυπο των κυττάρων μειώνοντας το λόγο των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων, επιταχύνοντας το «κλείσιμο» της «τεχνητής πληγής» και παράλληλα ενισχύοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να οφείλονται στους λιγότερους κυτταρικούς διπλασιασμούς που είχαν πραγματοποιήσει τα κύτταρα παρουσία της ένωσης TC369 σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες τη χρονική στιγμή που έλαβαν χώρα τα ανωτέρω πειράματα. Δεδομένου ότι τα αποτελέσματα αυτά αντιτίθενται στις δύο προηγούμενες επαναλήψεις του πειράματος, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να αποσαφηνιστεί η επίδραση της ένωσης TC369 στο μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.



**Εικόνα 3.63:** Η ένωση TC369 στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml δεν επιμηκύνει το κυτταρικό προσδόκιμο ζωής, αλλά βελτιώνει την ευζωία (healthspan) πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου. (a) Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (CPD) των HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των συνολικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν τα κύτταρα ύστερα από την έκθεσή τους στην ουσία ή στο διαλύτη για 88 συνεχόμενες ημέρες. (b) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των HFL-1

ινοβλαστών και (ii) ποσοτικοποίηση (%) του αριθμού των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 μg/ml TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) για 49 συνεχόμενες ημέρες. (c) (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του κλεισίματος της «τεχνητής πληγής» HFL-1 ινοβλαστών που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5 μg/ml TC369 και στο διαλύτη DMSO (control) για 49 συνεχόμενες ημέρες. Οι κόκκινες γραμμές εσωκλείουν την περιοχή της «τεχνητής πληγής». (ii) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) των ζωντανών κυττάρων έπειτα από χρώση με Crystal violet των HFL-1 ινοβλαστών που τους χορηγήθηκε 0.5 μg/ml TC369 ή ο διαλύτης DMSO (control) για 49 συνεχόμενες ημέρες. Η μέση τιμή της απορρόφησης των κυττάρων που δέχθηκαν τον διαλύτη DMSO (control) τέθηκε αυθαίρετα ως 100%. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

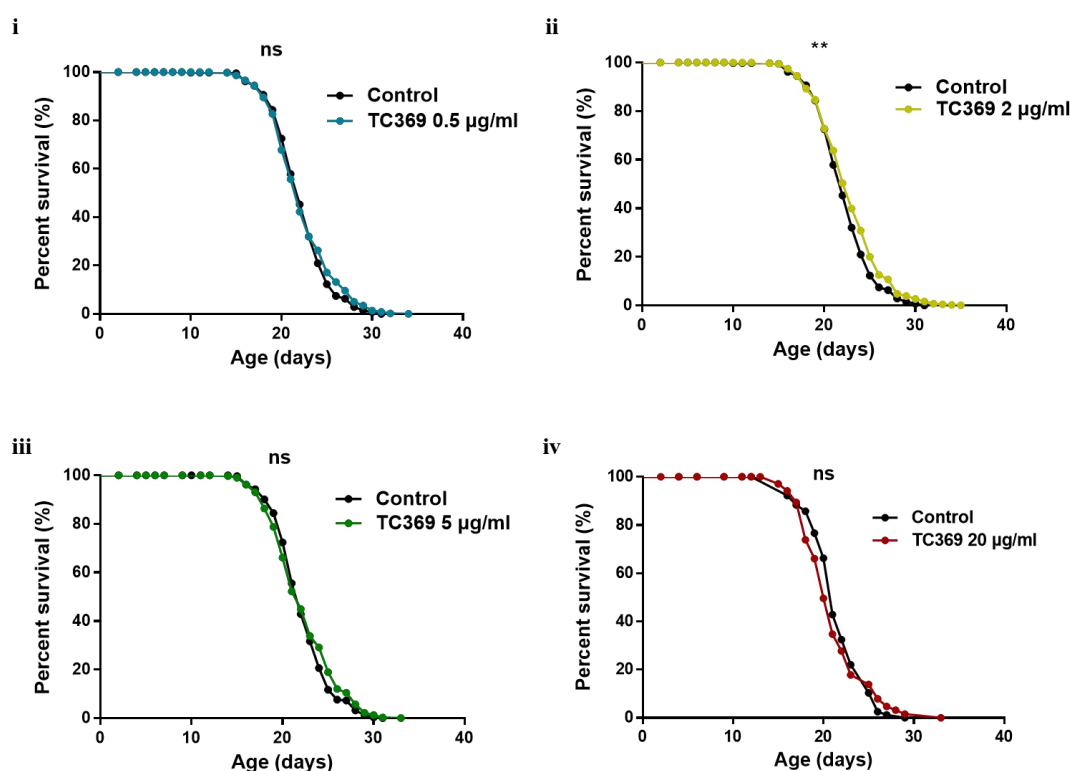
#### 3.2.10.4 Η ένωση TC369 αυξάνει το προσδόκιμο ζωής και βελτιώνει δείκτες ευζωίας σε οργανισμικό επίπεδο χωρίς παρουσία τοξικότητας

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στη χορήγηση τεσσάρων συγκεντρώσεων της ένωσης TC369 (0.5, 2, 5 και 20 μg/ml) στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* ώστε να ελέγξουμε το αντίκτυπο που έχουν στη διάρκεια ζωής των ζώων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου στέλεχος (N2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα γραφήματα της **Εικόνα 3.64**, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του προσδόκιμου ζωής των σκωλήκων υπό τη χορήγηση 2 μg/ml (4.67 μM) TC369. Επίσης, παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση στο προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που εξετάστηκε (20 μg/ml).

Οι σκωλήκες που δέχθηκαν την επίδραση της TC369 στη συγκέντρωση 2 μg/ml καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, παρουσίασαν πιο νεανική μορφολογία και βελτιωμένη κινητικότητα σε σύγκριση με τους σκωλήκες-μάρτυρες που είχαν εκτεθεί μόνο στο διαλύτη DMSO. Αυτά τα χαρακτηριστικά παραπέμπουν σε βελτιωμένη ευζωία (healthspan) και για αυτό προχωρήσαμε στην εκτίμηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των σκωλήκων για τη συγκέντρωση αυτή. Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκαν η συμπεριφορά σίτισης (καταμέτρηση φαρυγγικού παλμού και καταμέτρηση του ρυθμού κενώσεων), ο αναπτυξιακός ρυθμός των ζώων (καταμέτρηση του χρόνου από την εκκόλαψη των αυγών μέχρι το τέταρτο προνυμφικό στάδιο ανάπτυξης, L4), η γονιμότητα (καταμέτρηση αριθμού απογόνων), καθώς και ο αριθμός σκωλήκων που μεταβαίνουν στην προνύμφη dauer (μορφή διάπαυσης λόγω έλλειψης τροφής ή συνθηκών στρες). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3-4**, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο χρόνο μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων, στον αναπτυξιακό ρυθμό των ζώων, στη γονιμότητα καθώς και στον αριθμό των σκωλήκων που μεταβαίνουν στην προνύμφη dauer. Οι φαινοτυπικοί αυτοί δείκτες παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και έντονη μεταβλητότητα όταν παρευρίσκονται τοξίνες στο περιβάλλον των σκωλήκων (Dhawan et al., 1999; Hunt, 2017; Xiong et al., 2017), γεγονός που υποδηλώνει μη τοξική δράση της ένωσης TC369. Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική αύξηση καταγράφηκε στο ρυθμό του φαρυγγικού παλμού στους σκωλήκες που τους χορηγήθηκε 2 μg/ml TC369 σε σύγκριση με τους σκωλήκες-μάρτυρες. Η αύξηση του φαρυγγικού παλμού που καταμετράται από την πρώτη κιόλας ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων έχει συσχετιστεί με αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ζώων, αλλά και με βελτίωση της

ευζωίας τους (Cao et al., 2007; Dhawan et al., 1999). Το γεγονός αυτό συνάδει με την περίπτωση της χορήγησης της TC369 στους σκωλήκες, καθώς η παρουσία της ένωσης επιμηκύνει στατιστικά σημαντικά το οργανισμικό προσδόκιμο ζωής του *C. elegans*.

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω τη συμπεριφορά δεικτών που σχετίζονται με τη διατήρηση της ευζωίας των σκωλήκων κατά τη γήρανση, μελετήσαμε το ρυθμό του φαρυγγικού παλμού, τη διάρκεια μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων και την ικανότητα κίνησης των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) σε διάφορες ημέρες της ενήλικης ζωής τους.



**Εικόνα 3.64: Η ένωση TC369 αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans*.** Παρουσιάζονται οι καμπύλες επιβίωσης των αγρίων τύπου σκωλήκων (N2) που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης TC369 και σε αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO (control). (i) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $21.69 \pm 0.17$  (N=415/516) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν κατά τη διάρκεια της ζωής τους στην ένωση TC369 σε συγκέντρωση 0.5 µg/ml είναι  $21.40 \pm 0.19$  ημέρες (N=438/551). (ii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $21.69 \pm 0.17$  (N=415/516) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση TC369 σε συγκέντρωση 2 µg/ml είναι  $22.06 \pm 0.18$  ημέρες (N=439/563). (iii) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι  $21.46 \pm 0.18$  (N=315/398) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση TC369 σε συγκέντρωση 5 µg/ml είναι  $21.29 \pm 0.22$  ημέρες (N=316/414). (iv) Ο μέσος όρος επιβίωσης των σκωλήκων-μαρτύρων είναι 21 (N=77/112) ημέρες, ενώ ο μέσος όρος των σκωλήκων που εκτέθηκαν στην ένωση TC369 σε συγκέντρωση 20 µg/ml είναι 20 ημέρες (N=99/140).

**Πίνακας 3-4: Φαινοτυπική ανάλυση σε σκώληκες αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* που εκτέθηκαν σε 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 ή σε DMSO.**

|                                            | Φαρυγγικός<br>παλμός <sup>a, *</sup> | Χρόνος<br>μεταξύ δύο<br>διαδοχικών<br>κενώσεων <sup>b</sup> | Αναπτυξιακός<br>ρυθμός <sup>γ</sup> | Γονιότητα<br><sup>δ</sup> | Αριθμός<br>σκωλήκων<br>που<br>μεταβαίνουν<br>στη dauer<br>μορφή <sup>ε</sup> |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DMSO</b>                                | 250.8 $\pm$ 2.50                     | 50.70 $\pm$ 0.50                                            | 55.92 $\pm$ 0.26                    | 281.1 $\pm$ 5.18          | 0                                                                            |
| <b>TC369 2 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> | 259.5 $\pm$ 2.66                     | 50.90 $\pm$ 0.50                                            | 55.94 $\pm$ 0.26                    | 286.7 $\pm$ 8.42          | 0                                                                            |

<sup>a</sup> Φαρυγγικός παλμός που καταγράφηκε σε 1 min στην πρώτη μέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων.

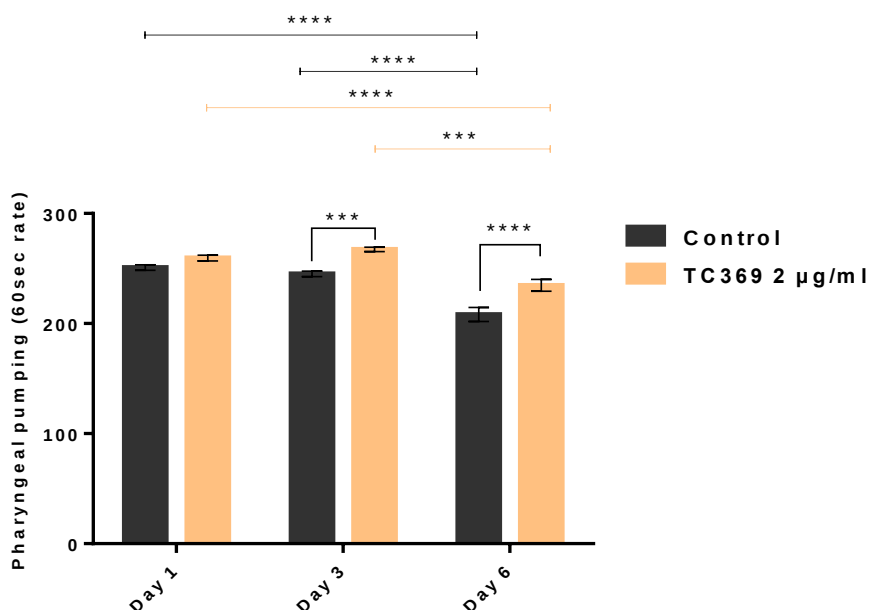
<sup>b</sup> Χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών κενώσεων σε seconds.

<sup>γ</sup> Χρόνος από την εκκόλαψη των αυγών έως το τέταρτο στάδιο ανάπτυξης των σκωλήκων.

<sup>δ</sup> Αριθμός απογόνων ανά σκώληκα. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από 15 ζώα που εκτέθηκαν στην ένωση TC369 2  $\mu\text{g/ml}$  και από 15 σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO.

<sup>ε</sup> Αριθμός σκωλήκων που μετέβησαν στην προνύμφη dauer στους 27 °C. Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.

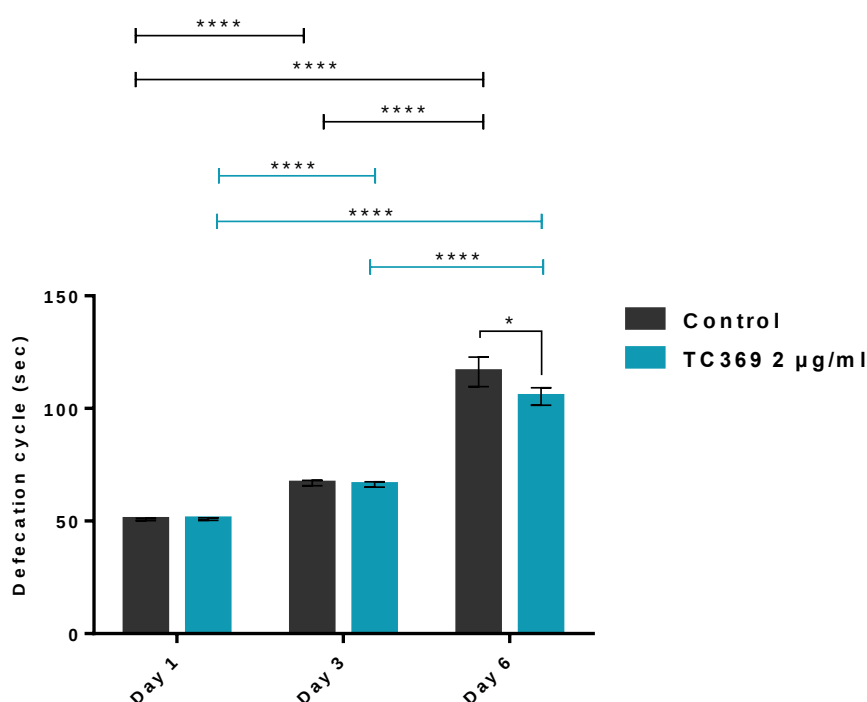
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο φαρυγγικός παλμός σταδιακά μειώνεται από την δεύτερη (2<sup>η</sup>) έως την έβδομη (7<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, ενώ η μείωση αυτή είναι ραγδαία από την έβδομη (7<sup>η</sup>) έως τη δέκατη (10<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους (C. Huang et al., 2004). Αντίθετα, αύξηση του ρυθμού των φαρυγγικών συσπάσεων έχει συσχετιστεί με αύξηση του προσδόκιμου ζωής και βελτίωση της ευζωίας των σκωλήκων (Cao et al., 2007; Dhawan et al., 1999; M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022), αποτελώντας ένα δείκτη βραδύτερης γήρανσης (Sayed et al., 2021). Έτσι, σκώληκες αγρίου τύπου (N2) δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την πρώτη (1<sup>η</sup>), την τρίτη (3<sup>η</sup>) και την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής όπου και μετρήθηκε ο φαρυγγικός παλμός τους. Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.65**, ο ρυθμός των φαρυγγικών συσπάσεων την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων-μαρτύρων (control) ήταν περίπου 250, 245 και 208 παλμοί ανά λεπτό, αντίστοιχα. Η χορήγηση της TC369 οδήγησε σε αύξηση του φαρυγγικού παλμού και τις τρεις ημέρες, όπου καταγράφηκαν περίπου 260, 267 και 235 παλμοί ανά λεπτό την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, αντίστοιχα. Ωστόσο, στατιστικά σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μόνο την τρίτη και έκτη ημέρα.



**Εικόνα 3.65: Η ένωση TC369 αυξάνει το φαρυγγικό παλμό των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* κατά τη γήρανση.** Παρουσιάζεται ο φαρυγγικός παλμός που καταγράφηκε σε 60 δευτερόλεπτα (second, sec) την πρώτη (Day 1), την τρίτη (Day 3) και την έκτη (Day 6) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) που τους χορηγήθηκε 2 µg/ml TC369 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Ο μέσος ρυθμός φαρυγγικού παλμού την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 1) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $250.8 \pm 2.50$ , ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 είναι  $259.5 \pm 2.66$ . Ο μέσος ρυθμός φαρυγγικού παλμού την τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 3) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $245.1 \pm 2.38$ , ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 είναι  $267.4 \pm 2.09$ . Ο μέσος ρυθμός φαρυγγικού παλμού την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 6) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $208.2 \pm 6.44$ , ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 είναι  $234.7 \pm 5.45$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και post-hoc Dunnett's και Turkey's multiple comparisons test.

Αντιστρόφως ανάλογα του φαρυγγικού παλμού, ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων στους σκώληκες αγρίου τύπου (N2) σταδιακά αυξάνεται καθώς τα ζώα γηράσκουν, υποδηλώνοντας μια φυσιολογική διαδικασία γήρανσης των σκωλήκων (How et al., 2018). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κένωση στους σκώληκες ακολουθεί μια ρυθμική συμπεριφορά που αποτελείται από κύκλους των 50 περίπου δευτερολέπτων (seconds, sec). Έτσι, σκώληκες αγρίου τύπου (N2) δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την πρώτη (1<sup>η</sup>), την τρίτη (3<sup>η</sup>) και την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους όπου και καταμετρήθηκε ο ρυθμός των κενώσεων. Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.66**, ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών κενώσεων την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων-μαρτύρων (control) ήταν περίπου 50, 66 και 116 δευτερόλεπτα (sec), αντίστοιχα. Ύστερα από τη συνεχόμενη χορήγηση της TC369, ο χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την 1<sup>η</sup>, την 3<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων ήταν περίπου 50, 66 και 105 δευτερόλεπτα (sec), αντίστοιχα. Την 1<sup>η</sup> και

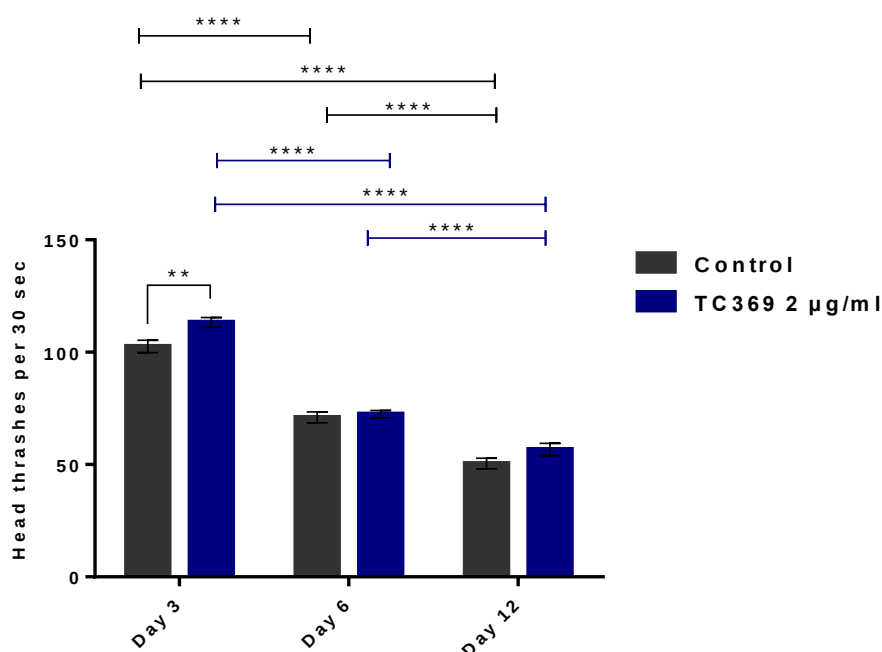
3<sup>η</sup> ημέρα, οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου συναρτήσει του χρόνου δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Εντούτοις, στατιστικά σημαντική μείωση καταγράφηκε την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων υπό την επίδραση της TC369. Το γεγονός αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια μορφή «αποτοξίνωσης» στους σκώληκες ενισχύοντας την απομάκρυνση από τον οργανισμό των επιβλαβών ουσιών (Gioran et al., 2024; Lieke et al., 2018; M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022). Επιπροσθέτως, από τις παραπάνω καταγραφές, παρατηρούμε ότι ο χρόνος μεταξύ των δύο διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αυξάνεται καθώς οι σκώληκες γηράσκουν και στις δύο ομάδες ελέγχου, γεγονός που αντικατοπτρίζει, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (How et al., 2018), μια ομαλή διαδικασία γήρανσης.



**Εικόνα 3.66:** Η ένωση TC369 μειώνει το χρόνο των διαδοχικών κενώσεων των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* την έκτη (6<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Παρουσιάζεται ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων που καταγράφηκε σε δευτερόλεπτα (second, sec) την πρώτη (Day 1), την τρίτη (Day 3) και την έκτη (Day 6) ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) που τους χορηγήθηκε 2 µg/ml TC369 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Ο μέσος χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 1) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $50.70 \pm 0.50$ , ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 είναι  $50.90 \pm 0.56$ . Ο μέσος χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 3) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $66.86 \pm 1.16$ , ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 είναι  $66.22 \pm 1.21$ . Ο μέσος χρόνος των διαδοχικών κενώσεων την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 6) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $116.3 \pm 6.51$ , ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2 µg/ml TC369 είναι  $105.3 \pm 3.85$ . Τα p-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και post-hoc Dunnett's και Turkey's multiple comparisons test.

Τέλος, θέλοντας να εκτιμήσουμε την επίδραση της ένωσης TC369 στην κινητικότητα των σκωλήκων κατά τη γήρανση, αγρίου τύπου σκώληκες (N2) δέχτηκαν την επίδραση

2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 ή του οργανικού διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν (ως αβγά) έως την τρίτη (3<sup>η</sup>), την έκτη (6<sup>η</sup>) και τη δωδέκατη (12<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής. Όπως φαίνεται στο γράφημα της **Εικόνα 3.67**, ο αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού που πραγματοποίησαν οι σκωλήκες-μάρτυρες (control) σε διάστημα τριάντα δευτερολέπτων την 3<sup>η</sup>, την 6<sup>η</sup> και την 12<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής τους ήταν περίπου 102, 70 και 50, αντίστοιχα. Ύστερα από τη συνεχόμενη χορήγηση της TC369, ο αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού που πραγματοποίησαν οι σκωλήκες ήταν περίπου 113, 72 και 56, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, την 3<sup>η</sup> ημέρα, η ένωση TC369 είχε θετική επίδραση στην κίνηση των σκωλήκων σημειώνοντας αύξηση του αριθμού των κινήσεων του κεφαλιού σε σύγκριση με τους σκωλήκες-μάρτυρες· διαφορά που άγγιξε τη στατιστική σημαντικότητα. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν την 6<sup>η</sup> και την 12<sup>η</sup> ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, παρόλο που η παρουσία της ένωσης TC369 οδήγησε σε μικρή αύξηση του αριθμού των κινήσεων του κεφαλιού των σκωλήκων σε σύγκριση με τους σκωλήκες-μάρτυρες κατά τη γήρανση. Επιπροσθέτως, οι κινήσεις του κεφαλιού που πραγματοποίησαν οι σκωλήκες και στις δύο ομάδες ελέγχου μειώνονταν με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία (Hahm et al., 2015; C. Huang et al., 2004; Restif et al., 2014).



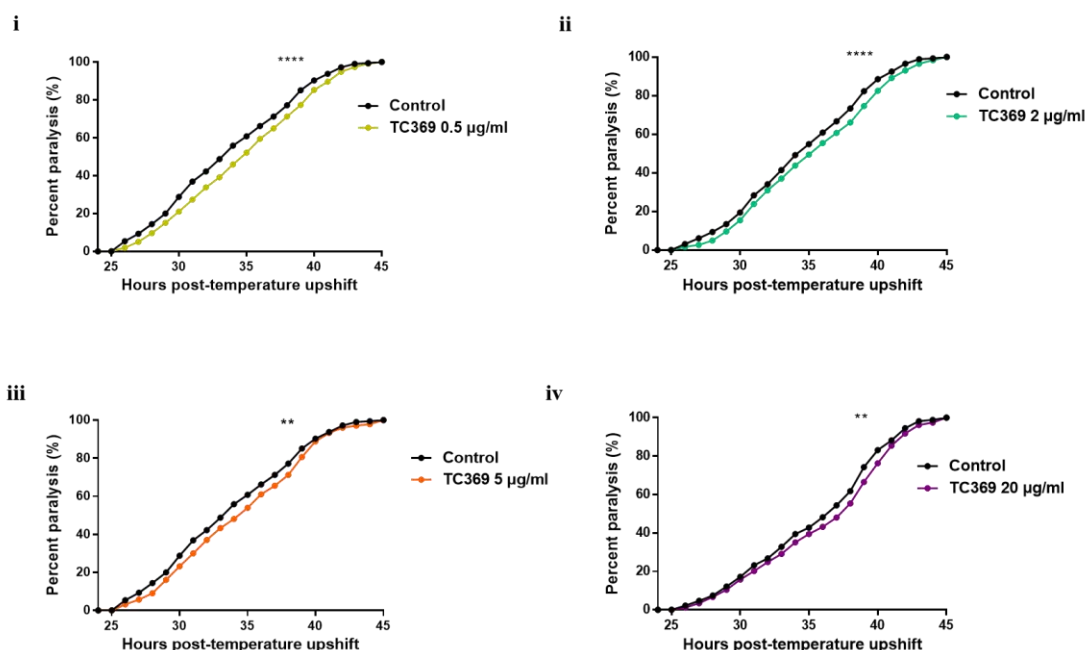
**Εικόνα 3.67:** Η ένωση TC369 αυξάνει την κινητικότητα των σκωλήκων αγρίου τύπου (N2) *C. elegans* την τρίτη (3<sup>η</sup>) ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Παρουσιάζεται ο αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) που πραγματοποίησαν σε διάστημα τριάντα (30) δευτερολέπτων (second, sec) την τρίτη (Day 3), την έκτη (Day 6) και τη δωδέκατη (Day 12) ημέρα της ενήλικης ζωής τους σκωλήκες αγρίου τύπου (N2) που τους χορηγήθηκε 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 ή ο οργανικός διαλύτης DMSO (control). Ο μέσος αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) την τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 3) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $102.60 \pm 2.76$  (N=30), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 είναι  $113.30 \pm 2.13$  (N=34). Ο μέσος αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 6) των σκωλήκων-

μαρτύρων (control) είναι  $70.97 \pm 2.46$  ( $N=35$ ), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 είναι  $72.41 \pm 1.60$  ( $N=37$ ). Ο μέσος αριθμός των κινήσεων του κεφαλιού (head thrashes) τη δωδέκατη ημέρα της ενήλικης ζωής (Day 12) των σκωλήκων-μαρτύρων (control) είναι  $50.45 \pm 2.35$  ( $N=33$ ), ενώ των σκωλήκων που δέχτηκαν την επίδραση 2  $\mu\text{g/ml}$  TC369 είναι  $56.74 \pm 2.92$  ( $N=34$ ). Τα  $p$ -value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) και post-hoc Dunnett's και Turkey's multiple comparisons test.

Συνολικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από την ανάλυση του προσδόκιμου ζωής όσο και των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των σκωλήκων σε συνδυασμό με την περαιτέρω διερεύνηση χαρακτηριστικών που μεταβάλλονται καθώς οι σκώληκες γηράσκουν (φαρυγγικός παλμός, ρυθμός κενώσεων και κινητικότητα), επιβεβαιώνουν την αρχική παρατήρηση για βελτιωμένη κατάσταση της ευζωίας των πληθυσμών που εκτέθηκαν στην ένωση TC369 καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Επομένως, η ένωση TC369 αυξάνει το οργανισμικό προσδόκιμο ζωής των αγρίου τύπου ( $N2$ ) *C. elegans* χωρίς την παρουσία τοξικότητας, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την ευζωία των σκωλήκων καθώς αυτοί γηράσκουν.

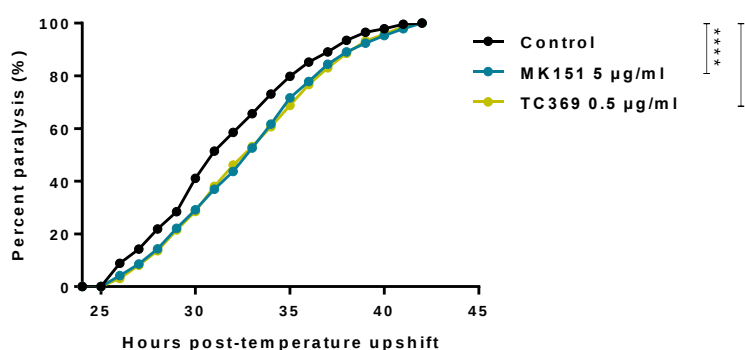
#### 3.2.10.5 Η ένωση TC369 προστατεύει έναντι της Αβ-τοξικότητας σε οργανισμικό επίπεδο

Δεδομένου ότι ταυτοποιήσαμε την ένωση TC369 ως ενεργοποιητή του πρωτεασώματος, προχωρήσαμε στη μελέτη της ενδεχόμενης νευροπροστατευτικής της δράσης *in vivo* στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε το στέλεχος-μοντέλο CL4176 για την AD στο νηματώδη σκώληκα, μέσω του οποίου πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες παράλυσης και μελετήθηκε η επίδραση τεσσάρων συγκεντρώσεων (0.5, 2, 5 και 20  $\mu\text{g/ml}$ ) της ένωσης TC369. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η TC369 επιβραδύνει στατιστικά σημαντικά το ρυθμό παράλυσης των σκωλήκων σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) και στις τέσσερις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (Εικόνα 3.68). Εντούτοις, η επίδραση της συγκέντρωσης 0.5  $\mu\text{g/ml}$  παρουσίασε το καλύτερο αποτέλεσμα στην επιβράδυνση της παράλυσης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως η βέλτιστη συγκέντρωση για τη συνέχεια των πειραμάτων που αφορούν τη νευροπροστατευτική της δράση.



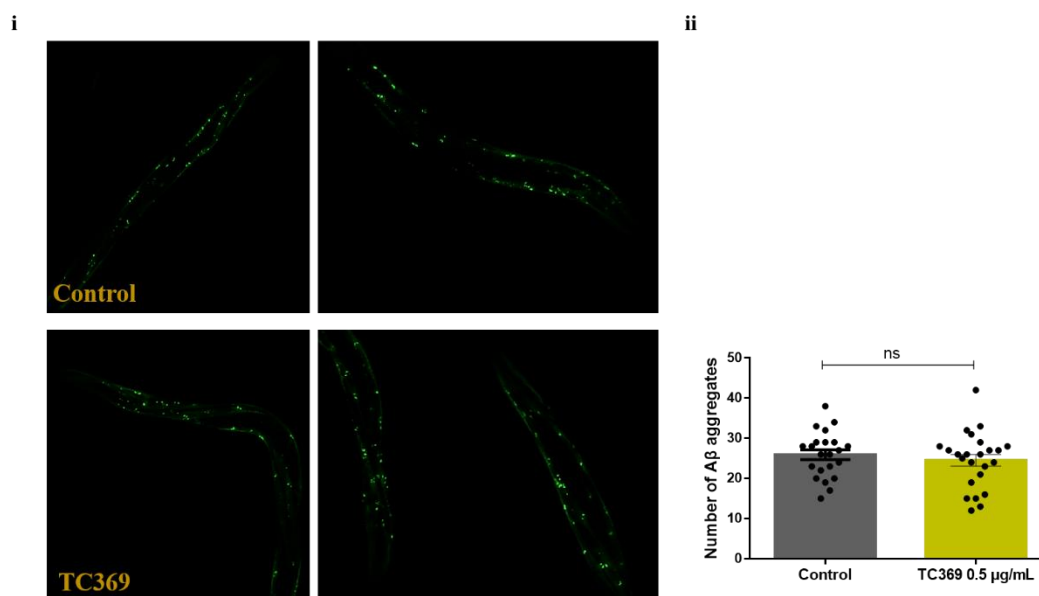
**Εικόνα 3.68:** Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ουσία TC369 επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. (i) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο DMSO (control) παρέλυσε στις  $33.10 \pm 0.32$  (N=1073/1081) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml TC369 παρέλυσε στις  $34.76 \pm 0.33$  (N=914/924) ώρες. (ii) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο DMSO (control) παρέλυσε στις  $34.11 \pm 0.31$  (N=864/870) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 2 µg/ml TC369 παρέλυσε στις  $35.05 \pm 0.32$  (N=801/808) ώρες. (iii) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο DMSO (control) παρέλυσε στις  $33.10 \pm 0.32$  (N=1073/1081) ώρες, ενώ το 50% των σκωληκιών που εκτέθηκαν σε 5 µg/ml TC369 παρέλυσε στις  $34.17 \pm 0.33$  (N=983/991) ώρες. (iv) Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο DMSO (control) παρέλυσε στις  $36.15 \pm 0.32$  (N=552/556) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε 20 µg/ml TC369 παρέλυσε στις  $37.11 \pm 0.32$  (N=583/587) ώρες.

Έπειτα, θελήσαμε να συγκρίνουμε τις δύο υβριδικές ενώσεις MK151 και TC369 σε παράλληλο πείραμα δοκιμασίας παράλυσης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.69**, δείχνουν πως οι δύο ενώσεις έχουν παρόμοιο θετικό αποτέλεσμα καθυστερώντας το ρυθμό της παράλυσης των σκωλήκων του διαγονιδιακού στελέχους CL4176.



**Εικόνα 3.69:** Σύγκριση των βέλτιστων συγκεντρώσεων των ενώσεων MK151 και TC369 στη δοκιμασία παράλυσης στο στέλεχος CL4176. Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $30.96 \pm 0.28$  (N=521/525) ώρες μετά τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε σε 5 µg/ml MK151 παρέλυσε στις  $32.78 \pm 0.29$  (N=384/388) ώρες, ενώ το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε σε 0.5 µg/ml TC369 παρέλυσε στις  $32.64 \pm 0.31$  (N=455/459) ώρες.

Σε συνέχεια των θετικών αποτελεσμάτων της ένωσης TC369 στην επιβράδυνση της παράλυσης, προχωρήσαμε σε πειράματα με το στέλεχος CL2331 ώστε να εκτιμηθεί η κατάσταση της συσσωμάτωσης του Αβ πεπτιδίου *in vivo*. Οι σκώληκες δέχτηκαν την επίδραση 0.5 µg/ml TC369 είτε του διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4 stage) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης ώστε να αποκαλυφθεί η επίδραση της ουσίας στη συσσωμάτωση του Αβ πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν επέρχεται μείωση της εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου στους σκώληκες που εκτέθηκαν σε 0.5 µg/ml TC369 σε σύγκριση με τους σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) (Εικόνα 3.70), αν και εμφανίζεται μια μικρή τάση μείωσης. Απαιτούνται επιπλέον πειράματα για την εκτίμηση των επιπέδων εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου σε σκώληκες στους οποίους η ένωση θα έχει χορηγηθεί έως την πρώτη, δεύτερη ή και τρίτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Στόχος είναι να αποκαλυφθεί τυχόν θετική επίδραση της TC369 σε μεταγενέστερα στάδια της ζωής των διαγονιδιακών αυτών σκωλήκων.

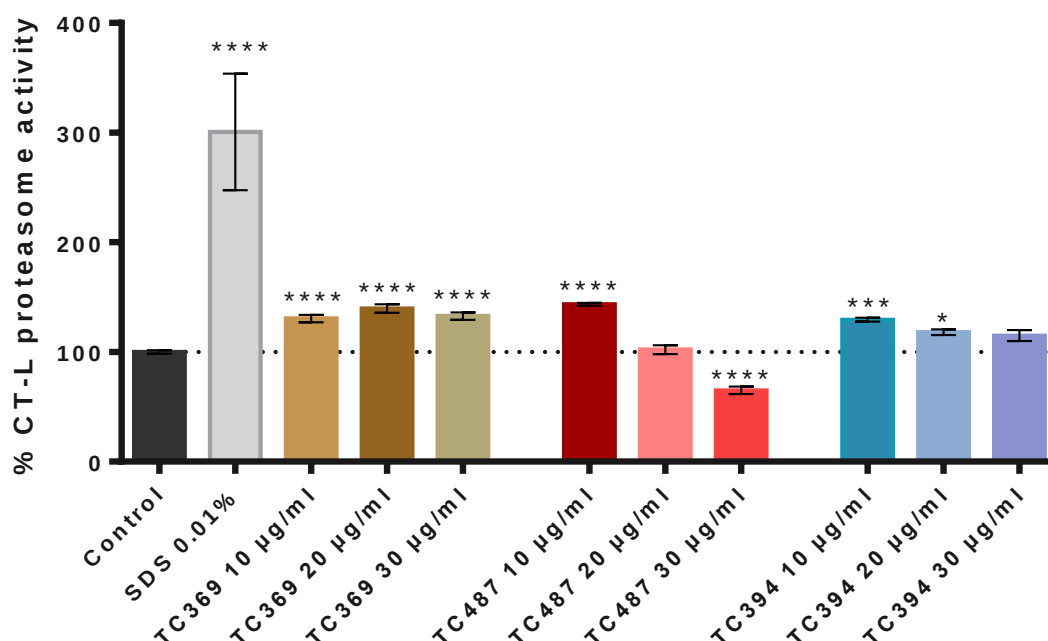


**Εικόνα 3.70:** Η ένωση TC369 δε μειώνει στατιστικά σημαντικά την εναπόθεση των συσσωματωμάτων του Αβ<sub>3-42</sub> πεπτιδίου στους μυς του διαγονιδιακού στελέχους CL2331 στο τέταρτο στάδιο της ανάπτυξής τους. (i) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες σκωλήκων που εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ<sub>3-42</sub> πεπτίδιο συζευγμένο με GFP που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) είτε σε 0.5 µg/ml TC369 από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο προνυμφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (L4 stage). Τα συσσωματώματα του Αβ<sub>3-42</sub> πεπτιδίου απεικονίζονται ως πράσινες κουκίδες. (ii) Ο μέσος αριθμός των Αβ συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως το τέταρτο

προνομφικό στάδιο της ανάπτυξής τους (*L4 stage*) είναι  $25.91 \pm 1.22$  ( $N=22$ ), ενώ ο μέσος αριθμός των *Ab* συσσωματωμάτων στο μπροστινό τμήμα των σκωλήκων που εκτέθηκαν σε  $0.5 \mu\text{g/ml}$  TC369 είναι  $24.54 \pm 1.43$  ( $N=24$ ).

### 3.2.10.6 Μελέτη παράγωγων ενώσεων της ένωσης TC369

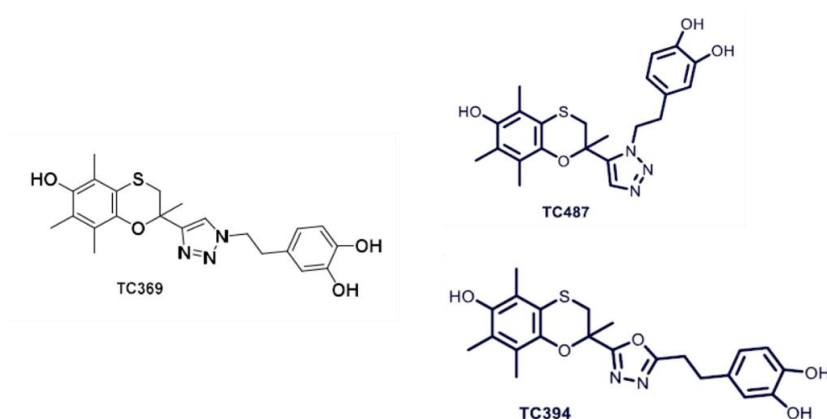
Θέλοντας να μελετήσουμε λίγο περισσότερο τη σχέση δομής-δράσης της ένωσης TC369, συντέθηκαν δύο επιπλέον υβριδικές ενώσεις, οι TC487 (MW 427.52 g/mol) και TC394 (MW 428.50 g/mol) (Εικόνα 3.72). Η ένωση TC487 αποτελεί το τοποϊσομερές της TC369, ενώ η ένωση TC394 είναι βιοϊσοστερές της TC369, όπου ο τριαζολικός δακτύλιος έχει αντικατασταθεί από τον ισοστερή 1,3,4-οξαδιαζόλιο. Οι δύο αυτές νέες υβριδικές ενώσεις, ελέγχθηκαν, αρχικά, για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα μέσω απευθείας στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Κατά τη διαδικασία αποτίμησης των ενώσεων ως δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος, χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο, καθαρό, ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα. Οι τρεις συγκεντρώσεις των ενώσεων που εξετάστηκαν ήταν οι 10, 20 και  $30 \mu\text{g/ml}$ , καθώς αυτές έχουν κριθεί βέλτιστες για την ένωση TC369, σύμφωνα με την οποία θα κριθεί η αποτελεσματικότητα των νέων υβριδικών ενώσεων. Σύμφωνα με το γράφημα που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.71**, και οι δύο ενώσεις ενεργοποιούν δομικά το πρωτεάσωμα αυξάνοντας την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) στατιστικά σημαντικά. Ειδικότερα, η βέλτιστη συγκέντρωση της ένωσης TC487 είναι η  $10 \mu\text{g/ml}$  ( $23.39 \mu\text{M}$ ), όπου μετά από επώαση με το καθαρό 20S πρωτεάσωμα αυξήθηκε κατά 1.4 φορές η πρωτεασωμική ενεργότητα. Η βέλτιστη συγκέντρωση για την ένωση TC394 είναι η  $20 \mu\text{g/ml}$  ( $46.67 \mu\text{M}$ ), όπου οδήγησε σε αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας κατά περίπου 1.3 φορές.



**Εικόνα 3.71:** Σάρωση ως προς την ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης της ένωσης TC487 και

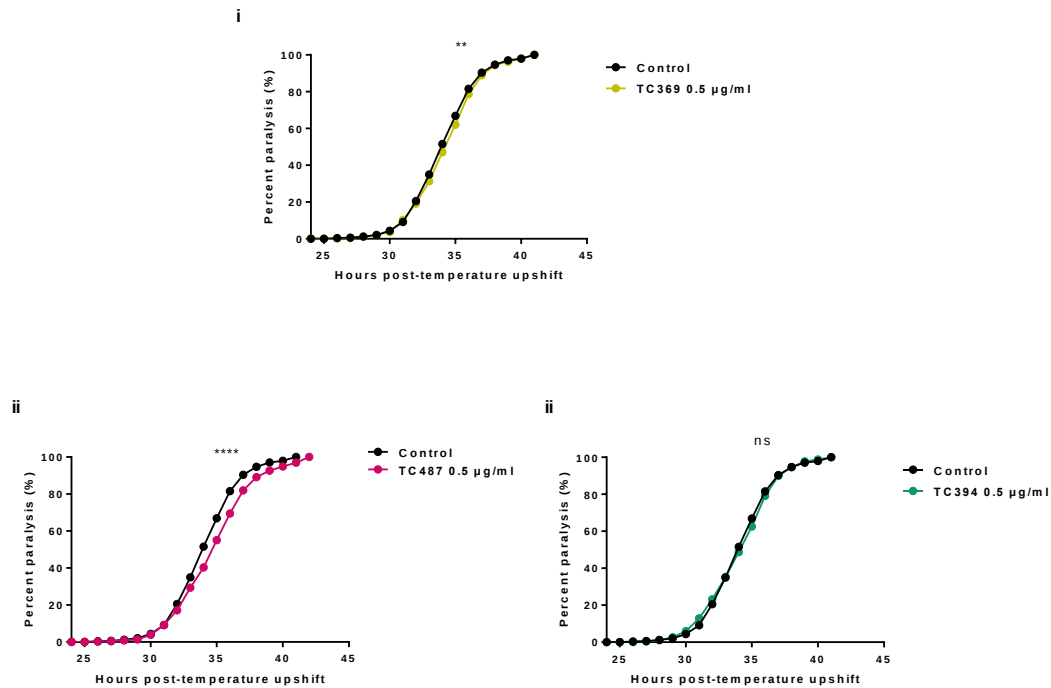
**TC394 με το καθαρό πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα του κυτταρικού περιβάλλοντος.** Παρουσιάζεται η % ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετά από έκθεσή του στο διαλύτη DMSO (control) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων TC487 και TC394. Για την ένωση TC487 στη συγκέντρωση 10 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $143.4 \pm 1.16$ . Για την ένωση TC394 στη συγκέντρωση 10 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $129.4 \pm 1.66$  και στη συγκέντρωση 20 µg/ml το ποσοστό ενεργοποίησης είναι  $118.1 \pm 2.56$ . Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της Ανάλυσης Διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA). Η ένωση TC369 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης με τις νέες υβριδικές ενώσεις.

Για να συγκριθεί η δραστικότητα των νέων υβριδικών ενώσεων με την ένωση TC369, θελήσαμε να εξετάσουμε τη νευροπροστατευτική τους δράση σε οργανισμικό επίπεδο. Έτσι, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες παράλυσης στο στέλεχος-μοντέλο για την AD στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, CL4176.



**Εικόνα 3.72: Χημική δομή των ενώσεων TC369, TC487 και TC394.**

Στο παραπάνω γενετικά τροποποιημένο στέλεχος, μελετήθηκε η επίδραση 0.5 µg/ml TC487 (1.169 µM) και 0.5 µg/ml TC394 (1.166 µM). Παράλληλα, στο ίδιο πείραμα, μελετήθηκε και η ένωση TC369 στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml ώστε να συγκριθούν ταυτόχρονα οι δράσεις των τριών ενώσεων (Εικόνα 3.73). Κατά την επίδραση της TC487 επιβραδύνεται στατιστικά σημαντικά ο ρυθμός παράλυσης των σκωλήκων σε σύγκριση με τα ζώα που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control). Μάλιστα, η επιβράδυνση της παράλυσης των σκωλήκων που επιτυγχάνεται μέσω της ένωσης TC487 είναι ισχυρότερη σε σύγκριση με την ένωση TC369 στην ίδια συγκέντρωση (0.5 µg/ml). Όσον αφορά στη δεύτερη ένωση, τα αποτελέσματα έδειξαν πως κατά την επίδραση 0.5 µg/ml TC394 δεν επιβραδύνεται στατιστικά σημαντικά ο ρυθμός παράλυσης των σκωλήκων σε σύγκριση με τα ζώα που εκτέθηκαν στο διαλύτη (DMSO).



**Εικόνα 3.73:** Η έκθεση του στελέχους CL4176 στην ένωση TC487, αλλά όχι στην TC394, επιβραδύνει το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται από τη θερμοεπαγώμενη έκφραση του Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίου. Το 50% των σκωλήκων-μαρτύρων που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) παρέλυσε στις  $33.94 \pm 0.17$  (N=2050/264) ώρες μετά τη θερμοεπαγώμενη έκφραση του Αβ πεπτιδίου, ενώ (i) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml TC369 παρέλυσε στις  $34.16 \pm 0.18$  (N=1990/2006), (ii) το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml TC487 παρέλυσε στις  $34.70 \pm 0.20$  (N=1786/1803) ώρες και το 50% των σκωλήκων που εκτέθηκε στη συγκέντρωση 0.5 µg/ml TC394 παρέλυσε στις  $34.06 \pm 0.19$  (N=2050/2064) ώρες.

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρωτεάσωμα είναι ένα πολυ-ενζυμικό πρωτεολυτικό σύμπλοκο που διαδραματίζει καίριο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών (πρωτεόσταση) διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ της συνεχούς σύνθεσης νέων πρωτεϊνών και της αποικοδόμησής τους στο χρόνο και στην ποσότητα που απαιτείται από τις ανάγκες του κυττάρου. Ο ρόλος του δεν περιορίζεται μόνο στην απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν ολοκληρώσει το «καθήκον» τους μέσα στο κύτταρο, αλλά επεκτείνεται και στην απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη (π.χ. οξειδωμένες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες που έχουν χάσει την τριτοταγή δομή τους), των μη σωστά αναδιπλωμένων ή γενικότερα των κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Rousseau & Bertolotti, 2018).

Καθώς ο οργανισμός γηράσκει, η λειτουργία των πρωτεοστατικών μηχανισμών των κυττάρων φθίνει λειτουργώντας ως τροχοπέδη στη διατήρηση της ακεραιότητας του πρωτεώματος. Ως ένας από τους κυριότερους πρωτεοστατικούς μηχανισμούς του κυττάρου, το πρωτεάσωμα αποτελεί βασική συνιστώσα για την κυτταρική ομοιόσταση. Η ηλικιο-ερξαρτώμενη μείωση τόσο της λειτουργίας του πρωτεασώματος, όσο και της ποσοτικής έκφρασης των υπομονάδων που το απαρτίζουν, οδηγεί στη συσσώρευση κατεστραμμένων ή μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της διαδικασίας της γήρανσης συμβάλλοντας τόσο στην εμφάνιση όσο και στην εξέλιξη ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών, ιδιαίτερα εκείνων που έχουν σχέση με λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση πρωτεϊνών (protein misfolding diseases), όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. AD, PD, HD) (Chondrogianni et al., 2020; M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022). Για το λόγο αυτό, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος έχει προταθεί ως στρατηγική για τη βελτίωση της κυτταρικής υγείας και την αντιμετώπιση παθολογιών που σχετίζονται με τη γήρανση. Παρεμβάσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση ή την ενίσχυση της λειτουργίας του πρωτεασώματος επιμηκύνουν το προσδόκιμο ζωής και αποτρέπουν ή καθυστερούν ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* μοντέλα (Chondrogianni et al., 2014; Chondrogianni, Voutetakis, et al., 2015; Njomen & Tepe, 2019).

Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος κερδίζει συνεχώς έδαφος στο πεδίο της αντιγήρανσης και των παθολογιών που σχετίζονται με αυτήν. Πληθώρα ενώσεων έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να ενισχύουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος. Πολλές από αυτές επάγουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (κυρίως του Nrf2) που ρυθμίζουν την έκφραση πρωτεασωματικών υπομονάδων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα του πρωτεασώματος και ενισχύοντας συνολικά την πρωτεασωματική λειτουργία (Chondrogianni, Voutetakis, et al., 2015; Njomen & Tepe, 2019). Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση ενδεχομένως να εγκυμονεί κινδύνους, καθώς η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων δεν στοχεύει αποκλειστικά στο πρωτεάσωμα, αλλά πιθανά και σε άλλες μεταγραφικές οδούς και στόχους αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης παρενεργειών. Έτσι, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω απευθείας επίδραση στη δομή του, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία ενεργοποιητών του πρωτεασώματος ονομάζονται δομικοί

ενεργοποιητές και αποτελούν ένα μικρό ποσοστό της έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο, ιδιαίτερα εάν αναφερόμαστε σε φυσικές ενώσεις.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ταυτοποίηση φυσικών και συνθετικών ενώσεων με αντιγηραντική δράση και ικανότητα αποτροπής της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης, με έμφαση στην ταυτοποίηση ενώσεων ενεργοποιητών του πρωτεασώματος. Μέσω της αξιολόγησης της δράσης των νέων αυτών δομικών ενεργοποιητών, τόσο για τις αντιγηραντικές τους ιδιότητες, όσο και για την ικανότητά τους να ενισχύουν την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με τάση συσσωμάτωσης, επιδιώκουμε να ενισχύσουμε τη φυσική απομάκρυνση τοξικών πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στη βελτίωση της υγιούς γήρανσης και της ευζωίας.

#### 4.1 Φυσικές ενώσεις

Στο πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής, παρουσιάζουμε την ταυτοποίηση για **πρώτη φορά** μίας ένωσης προερχόμενης από οργανισμό που διαβιεί στο θαλάσσιο περιβάλλον ως δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος. Το dolabellane διτερπένιο ονόματι **(1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (DBTO)** απομονώθηκε από δείγματα του καφέ άλγους *D. mediterranea* που συλλέχθηκαν από την παραλία του Αγίου Θεοδώρου στην Κάρπαθο. Ο μεταβολίτης DBTO ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα *in vitro*, απουσία κυτταρικών λυμάτων, όσο και *in cellulose*. Η πρωτεασωμική αυτή ενεργοποίηση δείξαμε ότι συμβάλλει στη βελτίωση δεικτών ευζωίας σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου και σε αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans*. Ωστόσο, η πιο ενδιαφέρουσα δράση της ένωσης DBTO είναι αυτή της προστασίας έναντι της Αβ-προκαλούμενης πρωτεοτοξικότητας σε τρία μοντέλα της AD στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Παρόμοια προστατευτική δράση μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος παρατηρήθηκε και σε κύτταρα νευρικής προέλευσης που εκτέθηκαν σε ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο. **Συνολικά, ταυτοποιήσαμε για πρώτη φορά ένα δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος προερχόμενο από θαλάσσιο οργανισμό της Μεσογείου Θάλασσας αναδεικνύοντας τις πιθανές δράσεις του στη διατήρηση της ευζωίας και στην προστασία έναντι της πρωτεοτοξικότητας που προκαλείται μέσω του Αβ πεπτιτίδου τόσο στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* όσο και σε κυτταρικά μοντέλα του ανθρώπου (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).**

Παρόλο που οι ενώσεις που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς αποτελούν μια πολύ ενδιαφέρουσα οικογένεια ενώσεων με ποικίλες και μοναδικές πολλές φορές χημικές δομές, οι οποίες συχνά παρουσιάζουν πιο ισχυρές βιολογικές δράσεις από τις χερσαίες προέλευσης ενώσεις, αξιοσημείωτο είναι ότι στη λίστα των δομικών ενεργοποιητών δεν περιλαμβάνονται ενώσεις θαλάσσιας προέλευσης (M. Vasilopoulou et al., 2021). **Σε αυτή τη μελέτη, ταυτοποιήσαμε το μεταβολίτη DBTO ως τον πρώτο θαλάσσιο μεταβολίτη που δρα ως δομικός ενεργοποιητής του πρωτεασώματος.** Πολύ λίγες ενώσεις και/ή εκχυλίσματα προερχόμενα από θαλάσσιους οργανισμούς έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να ενισχύουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος (M. Vasilopoulou et al., 2021). Άμεση σχέση μεταξύ

της φουκοϊδάνης (fucoidan) και της λειτουργίας του πρωτεασώματος προτάθηκε από τους Wang και συνεργάτες. Οι φουκοϊδάνες είναι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες που απομονώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα των καφέ αλγών. Η χορήγηση φουκοϊδάνης στο στέλεχος GMC101 του *C. elegans* (διαγονιδιακοί σκώληκες που εκφράζουν το ανθρώπινο Αβ<sub>1-42</sub> πεπτιδίο στα μυϊκά κύτταρα του σώματός τους) καθυστέρησε την εμφάνιση παράλυσης μέσω της μείωσης τόσο των επιπέδων, όσο και της εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου. Επιπλέον, ενώ το Αβ πεπτιδίο βρέθηκε να επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος στους σκώληκες, η φουκοϊδάνη εμπόδισε τη μείωση της έκφρασης των γονιδίων *pbs-2* (ομόλογο του *PSMB7* που κωδικοποιεί τη β7 υπομονάδα στον άνθρωπο) και *pbs-5* (ομόλογο του *PSMB5* που κωδικοποιεί τη β5 υπομονάδα στον άνθρωπο) και αύξησε την ενεργότητα του πρωτεασώματος (X. Wang et al., 2018). Δύο επιπλέον μελέτες υποδεικνύουν ότι η φουκοϊδάνη μπορεί να ρυθμίσει τη λειτουργία του πρωτεασώματος, καθώς σε καρκινικά κύτταρα μαστού ή πνεύμονα, η χορήγησή της μείωσε την έκφραση των πρωτεϊνικών υποδοχέων TGFRI και TGFRII μέσω της εξαρτώμενης από το πρωτεάσωμα αποικοδόμησής τους (Hsu et al., 2013, 2014). Στα δικά μας αποτελέσματα, ο πολυσακχαρίτης με το κωδικό όνομα MAR211, δεν ενεργοποίησε το πρωτεάσωμα *in vitro*, ωστόσο μικρό ποσοστό ενεργοποίησης καταγράφηκε έπειτα από χορήγηση της ένωσης σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου (Εικόνα 3.5). Πιο λεπτομερή εξέταση απαιτείται προκειμένου να διαλευκανθεί εάν η ένωση αυτή έχει πράγματι ενεργοποιητικές ιδιότητες έναντι του πρωτεασώματος, ωστόσο σύμφωνα με τα αρχικά αποτελέσματα η ενεργοποίηση αυτή πιθανά οφείλεται σε μεταγραφική ρύθμιση. Σε μια άλλη μελέτη, ένα εκχύλισμα από το φύκος *P. tricornutum*, πλούσιο σε λιπαρά οξέα, αύξησε και τις τρεις ενεργότητες του πρωτεασώματος τόσο σε ανθρώπινο καθαρό πρωτεάσωμα, όσο και σε κερατινοκύτταρα του ανθρώπου που τους χορηγήθηκε το εκχύλισμα. Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος διατηρήθηκε ακόμα και μετά από έκθεση των κυττάρων σε UVA και UVB ακτινοβολία, ενώ συνοδευόταν και από μείωση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Bulteau et al., 2006). Επιπλέον, το πλούσιο σε λιπίδια εκχύλισμα από το *P. tricornutum* μείωσε τις καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες στο εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας μετά από εφαρμογή του εκχυλίσματος σε εθελοντές (Nizard et al., 2004). Ωστόσο, η ακριβής ένωση του εκχυλίσματος που οδήγησε στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος δεν έχει ταυτοποιηθεί έως σήμερα. Έτσι, ο μεταβολίτης DBTO καθίσταται, σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία, η πρώτη πλήρως χαρακτηρισμένη ένωση που προέρχεται από θαλάσσιο οργανισμό με ενεργοποιητική δράση έναντι του πρωτεασώματος. Η ένωση ενεργοποιεί και τις τρεις πρωτεολυτικές ενεργότητες του 20S πρωτεασώματος *in vitro* καθιστώντας την ως δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος πιθανά μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος επιτυγχάνεται συνολικά και στις τρεις ενεργότητές του παρουσία της ένωσης, πιθανώς υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση δεν εξαρτάται από τη διέγερση μίας εκ των τριών ενεργών κέντρων του πρωτεασώματος, αλλά μέσω του εμπλουτισμού της διαμόρφωσης της ανοιχτής πύλης του 20S πρωτεασώματος επιτρέποντας έτσι την πρόσβαση του υποστρώματος στον καταλυτικό θάλαμο (W. H. Choi et al., 2016;

Njomen et al., 2018). Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση που παρατηρήθηκε για τη βασική πρωτεολυτική ενεργότητα του πρωτεασώματος, δηλαδή την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L), ήταν εξαιρετικά ισχυρή καθώς αυξήθηκε κατά 3,2 φορές σε σχέση με το δείγμα-μάρτυρα (control), ενώ ήταν παρόμοια με αυτή που καταγράφηκε στο θετικό μάρτυρα (0.01% SDS). Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος *in cellulose* ύστερα από χορήγηση της ένωσης DBTO σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου, χωρίς ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος, συνηγορεί περαιτέρω στη δομική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος παρουσία της ένωσης.

Αποκαλύψαμε επίσης μια πολύ ενδιαφέρουσα επίδραση του DBTO στην κυτταρική ευζωία. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε επέκταση της διάρκειας ζωής των HFL-1 ινοβλαστών ύστερα από τη συνεχόμενη χορήγηση του DBTO (τουλάχιστον όχι στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν), παρατηρήσαμε σημαντική βελτίωση της κυτταρικής ευζωίας. Η μείωση των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων, η ικανότητα των κυττάρων να κλείνουν γρηγορότερα μια «τεχνητή πληγή» και επομένως η διατήρηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας, καθώς και τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης των κυττάρων, υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του DBTO καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους διατηρούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα τη νεανική τους μορφολογία. Παρόμοια θετικά αποτελέσματα όσον αφορά στην ευζωία των κυττάρων έχουν παρατηρηθεί σε ενώσεις που ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, όπως η κερσετίνη (Chondrogianni et al., 2010) και το 18α-GA (Karpetta et al., 2010), ενώ σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία, δεν έχει μελετηθεί το αντίκτυπο άλλων δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος στην κυτταρική ευζωία ινοβλαστών του ανθρώπου. Επιπλέον, η απουσία ενεργοποίησης άλλων κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (αμετάβλητα επίπεδα ROS, απουσία ενεργοποίησης στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και της SOD ενεργότητας) έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης DBTO σε HFL-1 ινοβλάστες, δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω της ένωσης είναι αρκετή για να προωθήσει τη βελτίωση της κυτταρικής ευζωίας. Ομοίως, βελτιωμένη ευζωία καταγράφηκε και στους αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans* έπειτα από τη χορήγηση DBTO. Δείκτες όπως η αύξηση του φαρυγγικού παλμού των σκωλήκων και η μείωση του χρόνου μεταξύ των διαδοχικών κενώσεων ήδη από την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους έχει συσχετισθεί με αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Dhawan et al., 1999), αλλά και με συνολική βελτίωση της ευζωίας των σκωλήκων (Cao et al., 2007; C. Huang et al., 2004). Η αύξηση στον αναπτυξιακό ρυθμό των σκωλήκων που παρατηρήθηκε παρουσία του DBTO, έχει καταγραφεί έπειτα από τη χορήγηση του 18α-GA σε αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans* (Papaevgeniou et al., 2016) και σε διαγονιδιακούς σκώληκες που υπερεκφράζουν την PBS-5 υπομονάδα του πρωτεασώματος (Chondrogianni, Georgila, et al., 2015) και στις δύο αυτές περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση του προσδόκιμου ζωής των σκωλήκων. Επίσης, η βελτίωση της ευζωίας απεδείχθη και έπειτα από την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω υπερέκφρασης

της β5 υπομονάδας (Nguyen et al., 2019) είτε της χορήγησης τιλιοροσίδης (Tsakiri et al., 2013) στη *D. melanogaster*. Παρόλο που ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων προβλέπει αύξηση του προσδόκιμου ζωής, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής των αγρίου τύπου *C. elegans* έπειτα από τη συνεχόμενη έκθεση στο μεταβολίτη DBTO. Εντούτοις, καταγράφηκε μια τάση αύξησης στις δύο από τις τρεις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (0.25 και 0.5 μg/ml), χωρίς όμως να αγγίζουν τη στατιστική σημαντικότητα. Η απουσία επέκτασης της διάρκειας ζωής που παρατηρήθηκε τόσο *in cellulo*, όσο και *in vivo* έπειτα από τη χορήγηση του DBTO είναι μάλλον απρόσμενη, καθώς πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος συνοδεύεται από αυξημένη μακροβιότητα (Chondrogianni et al., 2020; Papaevgeniou & Chondrogianni, 2016). Υποθέτουμε ότι αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στα επίπεδα ενεργοποίησης του πρωτεασώματος που επιτυγχάνονται μέσω των διαφόρων παρεμβάσεων που έχουν μελετηθεί. Σε περιπτώσεις γενετικής παρέμβασης (υπερέκφραση πρωτεασωμικών υπομονάδων) η πρωτεασωμική ενεργοποίηση είναι σαφώς ισχυρότερη και επομένως το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή η αύξηση του προσδόκιμου ζωής, να είναι πιο έντονο. Επιπροσθέτως, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι η έλλειψη ενεργοποίησης άλλων αντιοξειδωτικών μηχανισμών, πέρα από την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, μπορεί επίσης να εξηγήσει αυτό το φαινόμενο, καθώς οι περισσότερες ενώσεις που οδηγούν σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής παρουσιάζουν παράλληλα και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως το 18α-GA και η τιλιοροσίδα (Chatzigeorgiou et al., 2017; Kapeta et al., 2010; Papaevgeniou et al., 2016; Tsakiri et al., 2013; Velagapudi et al., 2018). Πιθανώς, μια πιο λεπτομερής διερεύνηση με τη χορήγηση περισσότερων (και ίσως μικρότερων) συγκεντρώσεων της ένωσης να μπορούσε να διαλευκάνει την επίδραση του DBTO στο προσδόκιμο ζωής τόσο *in cellulo* όσο και *in vivo*. Η βελτίωση, ωστόσο, της ευζωίας είναι μια παράμετρος που δεν μπορεί να προσπεραστεί, καθώς η σημασία της αναδεικνύεται από μελέτες που δείχνουν ότι η ευζωία δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη διάρκεια ζωής (Bansal et al., 2015; Fischer et al., 2016; Tissenbaum, 2012), καθιστώντας την ως έναν πιθανώς σημαντικό παράγοντα στη μελέτη της διαδικασίας της γήρανσης. Οι Bansal και συνεργάτες προκειμένου να εκτιμήσουν συνολικά την υγεία των διαγονιδιακών σκωλήκων *C. elegans* που μελετούσαν, πρότειναν ότι η διάρκεια ζωής (lifespan) ενός σκώληκα πρέπει να διαχωρίζεται σε δύο φάσεις: τη διάρκεια υγείας (healthspan) και τη διάρκεια γήρατος (gerospan). Η μεν ορίζεται ως η περίοδος κατά την οποία οι σκώληκες παρουσιάζουν περισσότερο από το 50% της μέγιστης λειτουργικής ικανότητας των αγρίου τύπου σκωλήκων *C. elegans*, ενώ η δε ορίζεται ως η περίοδος κατά την οποία παρουσιάζουν λιγότερο από το 50% της μέγιστης λειτουργικής ικανότητας των αγρίου τύπου σκωλήκων *C. elegans*. Μάλιστα προτείνουν ότι για να οδηγηθούμε στην «υγιή γήρανση», που είναι και το ζητούμενο, η αναλογία διάρκεια υγείας/διάρκεια γήρατος μπορεί να προσφέρει περισσότερες και πιο χρήσιμες πληροφορίες από την επέκταση της διάρκειας ζωής ως τη μόνη παράμετρο αξιολόγησης (Bansal et al., 2015). Παρότι ιδανικά επιθυμούμε και τα δύο, προτιμάται

μια παρατεταμένη διάρκεια υγείας από μια παρατεταμένη διάρκεια ζωής γεμάτη παθολογίες που σχετίζονται με το γήρας (M. A. Vasilopoulou, Gioran, et al., 2022).

Πληθώρα μελετών έχουν αναδείξει τη σημασία της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης στην εξέλιξη διαφόρων πρωτεϊνοπαθειών, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η AD (M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022). Αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς μειωμένη πρωτεασωμική δραστηριότητα και μειωμένα επίπεδα έκφρασης διαφόρων υπομονάδων του πρωτεασώματος έχουν ανιχνευθεί σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα της AD (Almeida et al., 2006; Chocron et al., 2022; Necchi et al., 2011), καθώς και σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών με AD (Chocron et al., 2022; Keller et al., 2000; Lopez Salon et al., 2000). Αντιθέτως, η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω υπερέκφρασης της β5 υπομονάδας επιβραδύνει την εξέλιξη του φαινοτύπου που προσομοιάζει με AD σε αντίστοιχα μοντέλα στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* (υπομονάδα *pbs-5*) (Chondrogianni, Georgila, et al., 2015; Panagiotidou et al., 2023), στη *D. melanogaster* (υπομονάδα *Prosβ5*) (Chocron et al., 2022; Munkácsy et al., 2019) και στο ποντίκι (υπομονάδα *PSMB5*) (Chocron et al., 2022). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές αναφέρονται σε γενετική παρέμβαση, η οποία θα ήταν δύσκολο να εφαρμοστεί σε ανθρώπους. Στα πλαίσια αναζήτησης εναλλακτικών παρεμβάσεων, παρόμοια αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί σε μοντέλα AD του νηματώδους σκώληκα *C. elegans* (Papaevgeniou et al., 2016; N. Wang et al., 2022), αλλά και σε διαγονιδιακούς ποντικούς (Mladenovic Djordjevic et al., 2021) μέσω της χορήγησης φυσικών ενώσεων ενεργοποιητών του πρωτεασώματος. Στην περίπτωση του 18α-GA, η ένωση αποδείχθηκε ότι ενεργοποιεί μεταγραφικά το πρωτεάσωμα μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα SKN-1 (ομόλογο του Nrf2), χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η ενεργοποίηση και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών που δεν ελέγχθηκαν από τη συγκεκριμένη μελέτη. Και τούτο διότι, γονίδια-στόχοι του Nrf2 βρέθηκαν να επάγονται (*gst-4*), ενώ άλλα όχι (*gcs-1*) και επίσης η δραστηριότητα της καταλάσης αυξήθηκε, ενώ η δραστηριότητα της SOD παρέμεινε αμετάβλητη (Papaevgeniou et al., 2016). Οι Wang και συνεργάτες έδειξαν ότι το ουρσολικό οξύ ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα μέσω της μεταγραφικής επαγωγής των υπομονάδων του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου και του 20S πρωτεασώματος, χωρίς να αποκλείουν ότι η θετική επίδραση της ένωσης οφείλεται και στην αντιοξειδωτική της δράση (N. Wang et al., 2022). Τέλος, στη μελέτη των Djordjevic και συνεργατών η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος και κατ' επέκταση οι θετικές επιδράσεις του σε διαγονιδιακά ποντίκια για την AD οφείλεται σε συνεργατική δράση της ένωσης 18α-GA (ενεργοποίηση πρωτεασώματος μέσω επαγωγής του Nrf2) και ω-3 λιπαρών οξέων, δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος (Mladenovic Djordjevic et al., 2021). Αντίθετα, η παρούσα εργασία έδειξε ότι ο μεταβολίτης DBTO ενεργοποιεί το πρωτεάσωμα απουσία κυτταρικών λυμάτων, γεγονός που τον καθιστά ως ένα δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος με ελάχιστη ενεργοποίηση παράπλευρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα αρνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με την ενεργοποίηση της SOD, τα κυτταρικά επίπεδα των ROS ή την έκφραση γονιδίων-στόχων του Nrf2 (NQO-1, HO-1) υποστηρίζουν την απουσία ενεργοποίησης άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών (τουλάχιστον εκείνων που ελέγχθηκαν).

Όσον αφορά στην προστασία που παρέχει ο μεταβολίτης DBTO έναντι της Αβ-προκαλούμενης πρωτεοτοξικότητας, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η αυξημένη δραστηριότητα του πρωτεασώματος οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των ολιγομερών του Αβ πεπτιδίου (αν και δεν επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα) καθώς και των συνολικών επιπέδων του Αβ πεπτιδίου. Πιστεύουμε ότι μέσω της ενισχυμένης δραστηριότητας του πρωτεασώματος προωθείται η αποικοδόμηση των Αβ πεπτιδίων προτού αυτά σχηματίσουν συσσωματώματα, τα οποία τελικά θα καταφέρουν να εμποδίσουν την πρωτεολυτική του δράση. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από τη μειωμένη εναπόθεση των Αβ συσσωματωμάτων που παρατηρήθηκε στο διαγονιδιακό στέλεχος CL2331. Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω γενετικής τροποποίησης (Chondrogianni, Georgila, et al., 2015; Panagiotidou et al., 2023) ή μέσω των ενώσεων 18α-GA (Papaevgeniou et al., 2016) και ουρσολικό οξύ (N. Wang et al., 2022) έχει δείξει παρόμοια αποτελέσματα. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος, είτε μέσω γενετικής υπερέκφρασης είτε μέσω νέων αγωνιστών του πρωτεασώματος, βελτίωσε την αποικοδόμηση της APP πρωτεΐνης σε κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH, μύγες και ποντίκια. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος ήταν αρνητικά συσχετισμένη με τα επίπεδα της APP πρωτεΐνης και του Αβ<sub>42</sub> πεπτιδίου στους ιστούς ιπποκάμπου ασθενών με AD, γεγονός που υπογραμμίζει τη βιολογική συνάφεια των ευρημάτων σε οργανισμικά μοντέλα (Chocron et al., 2022). Επιπλέον, ο συνδυασμός 18α-GA και ω-3 λιπαρών οξέων μείωσε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό κάλυψης του εγκεφαλικού φλοιού και του ιπποκάμπου 5xFAD ποντικών από το Αβ<sub>42</sub> πεπτίδιο, χωρίς να επηρεάσει τον αριθμό των Αβ αμυλοειδικών πλακών (Mladenovic Djordjevic et al., 2021). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η προστασία έναντι του ηλικιο-εξαρτώμενου νευροεκφυλισμού που προκαλείται στους διαγονιδιακούς σκώληκες UA198 λόγω της έκφρασης του Αβ πεπτιδίου στους γλουταματεργικούς νευρώνες των ζώων. Οι σκώληκες που δέχθηκαν την επίδραση του μεταβολίτη DBTO παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά περισσότερους νευρώνες σε σύγκριση με τους σκώληκες μάρτυρες την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και έπειτα από την ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω γενετικής παρέμβασης (Panagiotidou et al., 2023). Εντούτοις, εάν και καταγράφηκε μικρή βελτίωση στην ανταπόκριση των διαγονιδιακών αυτών σκωλήκων σε εξωτερικό μηχανικό ερέθισμα, αυτή δεν άγγιξε τη στατιστική σημαντικότητα. Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι το πείραμα πραγματοποιήθηκε την πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων και όχι την έκτη όπου παρατηρήθηκαν και τα θετικά αποτελέσματα, όσον αφορά στην προστασία έναντι του νευροεκφυλισμού των γλουταματεργικών νευρώνων. Εάν και παρατηρήθηκε μια πιθανή εμπλοκή της πρωτεασωμικής ενεργοποίησης στην αποκατάσταση της ανταπόκρισης των σκωλήκων στο εξωτερικό μηχανικό ερέθισμα, περισσότερη διερεύνηση θα επιβεβαιώσει ή θα απορρίψει την υπόθεση αυτή. Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν την πιθανότητα χρήσης ενώσεων ενεργοποιητών του πρωτεασώματος ως μια στρατηγική κατά νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η AD, με δυνατότητα χρήσης τους σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Πολλές άλλες φυσικές ενώσεις έχουν δείξει προστατευτική δράση έναντι της Αβ-προκαλούμενης

πρωτεοτοξικότητας μέσω της ενεργοποίησης του πρωτεασώματος, όπως η ρεσβερατρόλη (Marambaud et al., 2005; Regitz et al., 2016), η κερσετίνη (Regitz et al., 2014), η μορίνη, η ισοκερσιτρίνη (Carmona et al., 2018) και η φουκοϊδάνη (X. Wang et al., 2018). Εντούτοις, καμία από τις ενώσεις αυτές δεν έχει χαρακτηριστεί ως δομικός ενεργοποιητής του πρωτεασώματος.

## 4.2 Συνθετικές ενώσεις

Οι φυσικές ενώσεις παρουσιάζουν μεγάλη βιολογική ποικιλότητα και είναι, κατά κανόνα, καλά ανεκτές από τον οργανισμό, καθώς οι τελευταίοι τις αναγνωρίζουν καλύτερα και μπορούν να τις μεταβολίσουν αποτελεσματικά. Έτσι, οι φυσικές ενώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως πρότυπο για τη σύνθεση ισχυρότερων συνθετικών ενώσεων που πολλές φορές μπορούν να προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα. Οι συνθετικές ενώσεις έχουν το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης σταθερότητας, καθαρότητας και δυνατότητας προσαρμογής τους για επίτευξη βελτιωμένης αποτελεσματικότητας και στοχευμένης δράσης. Αυτός ήταν και ο σκοπός του δεύτερου μέρους της διδακτορικής διατριβής με φόντο την ταυτοποίηση ενώσεων δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος.

**Η υβριδική ένωση MK151, συνδυάζοντας τα δομικά χαρακτηριστικά της υδροξυτυροσόλης και του χρωμανίου (της φαρμακοφόρου ομάδας της βιταμίνης E), ταυτοποιήθηκε ως δομικός ενεργοποιητής του πρωτεασώματος.** Η MK151 ενεργοποιεί το 20S πρωτεάσωμα *in vitro*, απουσία κυτταρικών λυμάτων, *in cellulo* όσο και *in vivo*. Η πρωτεασωμική αυτή ενεργοποίηση δείξαμε ότι συμβάλει στην επιμήκυνση της αναδιπλασιαστικής διάρκειας ζωής πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου, καθώς και στη βελτίωση δεικτών ευζωίας στους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans*. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά στην προστασία έναντι της Αβ-προκαλούμενης πρωτεοτοξικότητας καταγράφηκαν σε μοντέλα της AD στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*, αποτελώντας **την πρώτη συνθετική ένωση αποτελούμενη από συνδυασμό δύο φυσικών ενώσεων, που παρουσιάζει ιδιότητες έναντι της πρωτεϊνικής συσσώματωσης σε οργανισμικό επίπεδο.** Συνολικά, ταυτοποιήσαμε ένα συνθετικό δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος προερχόμενο από τον καινοτόμο συνδυασμό δύο φυσικών ενώσεων αναδεικνύοντας τις πιθανές αντιγηραντικές ιδιότητές του και τις δράσεις του στη βελτίωση της ευζωίας του νηματώδους σκώληκα *C. elegans* και πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου (M. A. Vasilopoulou et al., 2021). Επίσης, η ένωση MK151 παρουσίασε προστατευτική δράση έναντι της πρωτεοτοξικότητας που προκαλείται μέσω του Αβ πεπτιδίου στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*.

Πολύ μικρός αριθμός συνθετικών ενώσεων έχουν ταυτοποιηθεί ως δομικοί ενεργοποιητές του πρωτεασώματος. Εντούτοις, οι συνθετικές αυτές ενώσεις αφορούν διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων, όπως ανάλογα φαινοθειαζίνης (χλωροπρομαζίνη) (Jones et al., 2017), την ιμιδαζολίνη TCH-165 (Njomen et al., 2018), τον ανταγωνιστή του λευκοτρενίου MK-886 (Trader et al., 2017), το αμίδιο AM-404 και παράγωγά του

(Salazar-Chaparro et al., 2024; Trader et al., 2017) και τα προσφάτως αναφερθέντα κυκλικά πεπτίδια (Nelson et al., 2024). **Αντιθέτως, η ένωση MK151 αποτελεί την πρώτη υβριδική ένωση που συνδυάζει την υδροξυτυροσόλη, την κύρια αντιοξειδωτική πολυφαινολική ένωση του ελαιολάδου, και το χρωμάνιο, τη φαρμακοφόρο ομάδα της βιταμίνης E, η οποία ταυτοποιήθηκε ως δομικός ενεργοποιητής του 20S πρωτεασώματος.** Η υδροξυτυροσόλη απαντάται στα φύλλα και στον καρπό της ελιάς και αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη της ελαιοπευρωπαΐνης, ενός ενεργοποιητή του πρωτεασώματος με αντιγηραντικές ιδιότητες σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου (Katsiki et al., 2007). Παράλληλα, η υδροξυτυροσόλη έχει χαρακτηριστεί κυρίως για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και τη νευροπροστατευτική της δράση, μεταξύ άλλων (Bertelli et al., 2020; Marković et al., 2019; Micheli et al., 2023; Robles-Almazan et al., 2018). Επιπροσθέτως, ενώσεις που περιλαμβάνουν το χρωμανικό δακτύλιο, δηλαδή τη φαρμακοφόρο ομάδα της βιταμίνης E, εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, νευροπροστατευτικές και αντιγηραντικές ιδιότητες (Koufaki et al., 2011, 2014). **Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η βιταμίνη E, το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, Trolox, που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης MK151, καθώς και η υδροξυτυροσόλη δεν είναι ικανές να ενεργοποιήσουν δομικά το πρωτεάσωμα.** Στην παρούσα μελέτη, δείξαμε ότι η ένωση MK151 ενεργοποιεί τη βασική πρωτεολυτική ενεργότητα του 20S πρωτεασώματος, δηλαδή την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L), *in vitro* απουσία κυτταρικών λυμάτων, καθιστώντας την ως δομικό ενεργοποιητή του πρωτεασώματος πιθανά μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος *in cellulo* ύστερα από χορήγηση της ένωσης MK151 σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου, χωρίς ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος, συνηγορεί περαιτέρω στη δομική ενεργοποίηση του πρωτεασώματος παρουσία της ένωσης. Ακόμη, η χορήγηση της ένωσης MK151 σε αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans* αύξησε την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L), επιτυγχάνοντας ενεργοποίηση του πρωτεασώματος και *in vivo*. Θέλοντας επίσης να εξετάσουμε την επίδραση της διαμόρφωσης της ένωσης στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, διαπιστώσαμε ότι το ρακεμικό μίγμα της ένωσης MK151 ήταν υπεύθυνο για την ενεργοποίηση αυτή. Οι R- και S-ισομορφές της ένωσης δεν ήταν ικανές να ενισχύσουν την δραστηριότητα του πρωτεασώματος με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του ρακεμικού μίγματος τόσο σε *in vitro*, όσο και *in cellulo* πειράματα.

Αναδείξαμε επίσης μια εντυπωσιακή επίδραση της ένωσης MK151, καθώς φαίνεται να διαθέτει αντιγηραντικές ιδιότητες και να συμβάλει στη βελτίωση της κυτταρικής και οργανισμικής ευζωίας. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε επέκταση της διάρκειας ζωής των πρωτογενών, εμβρυϊκών HFL-1 ινοβλαστών του ανθρώπου ύστερα από τη συνεχόμενη χορήγηση της MK151, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήσαμε και σημαντική βελτίωση της κυτταρικής ευζωίας. Η μείωση των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων, η ταχύτερη επούλωση μιας «τεχνητής πληγής» και επομένως η διατήρηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης των κυττάρων, υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα που

δέχθηκαν την επίδραση της MK151 καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους διατηρούν τη νεανική τους μορφολογία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε αντιοξειδωτική δράση της ένωσης MK151 έπειτα από τη χορήγησή της σε HFL-1 ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από την παρουσία υπεροξειδίου ή άλλων οξειδωτικών παραγόντων (αιθανόλη, οξείδωση που καταλύεται από μέταλλα). Εντούτοις, ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω υπερέκφρασης της β5 υπομονάδας σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες αύξησε την κυτταρική επιβίωση υπό παρόμοιες συνθήκες προκαλούμενου οξειδωτικού στρες (Chondrogianni et al., 2005). Ομοίως, η ένωση 18α-GA παρουσίασε αντιοξειδωτικές ιδιότητες παρουσία υπεροξειδίου στο μέσο καλλιέργειας ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών (Kareta et al., 2010). Παρόλα αυτά, δεν θα μπορούσαμε να παραβλέψουμε το γεγονός ότι στην πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε σε μια γενετική παρέμβαση με ισχυρότερη επίδραση στην πρωτεασωματική ενεργοποίηση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η ένωση 18α-GA ενεργοποιεί και το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, ο οποίος επάγει τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, εάν και δεν ελέγχθηκε η ενεργοποίηση του Nrf2 ή γονιδίων-στόχων του, η απουσία αύξησης της έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων καθώς και η έλλειψη αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της MK151, υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος μέσω της ένωσης είναι αρκετή για να εξηγήσει τις αντιγηραντικές της ιδιότητες *in cellulo*. Παρόλα αυτά, η έλλειψη αντιοξειδωτικής δράσης της MK151 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς θα ήταν λογικό να αναμένουμε ότι μια ένωση που αποτελείται από δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά (Bertelli et al., 2020; Giordano et al., 2020; Marković et al., 2019) θα εμφάνιζε παρόμοια δράση. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε πιθανώς να οφείλεται στη τελική δομή της MK151 που ενδεχομένως καθιστά την υδροξυτυροσόλη και το Trolox ανέκανα να διατηρήσουν την αντιοξειδωτική τους δράση μετά τη συνένωσή τους, αναστέλλοντας έτσι και τη συνολική αντιοξειδωτική δράση της MK151. Οι δύο ενώσεις πιθανά να ανταγωνίζονται στην προσφορά υδρογόνου αλληλοαναστέλλοντας η μία την άλλη.

Βελτιωμένη ευζωία καταγράφηκε και στους αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans* έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης MK151. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείκτες όπως ο φαρυγγικός παλμός των σκωλήκων, ο ρυθμός των κενώσεων και η κινητικότητά τους καθώς οι σκώληκες γερνούσαν. Και στις τρεις περιπτώσεις καταγράφηκε στατιστικά σημαντική βελτίωση των δεικτών ευζωίας, επεκτείνοντας την ευεργετική δράση της ένωσης MK151 και σε οργανισμικό επίπεδο. Οι ρυθμικές συσπάσεις που υφίστανται ο φάρυγγας, οι οποίες επιτρέπουν τη σίτιση των σκωλήκων, είναι ηλικιο-εξαρτώμενες και μειώνονται σταδιακά από την δεύτερη κιόλας ημέρα της ενήλικης ζωής τους, αντανakλώντας τη δομή και τη λειτουργία των μυών του φάρυγγα κατά τη γήρανση (D. K. Chow et al., 2006; C. Huang et al., 2004; Saul et al., 2021). Το ίδιο μοτίβο ακολουθεί και η κίνηση των σκωλήκων, η οποία παρουσιάζεται μειωμένη με το πέρασ του χρόνου (Hahm et al., 2015; C. Huang et al., 2004; Restif et al., 2014). Μάλιστα, έχει προταθεί ότι η προοδευτική μείωση τόσο της κινητικότητας του *C. elegans*, όσο και των μυϊκών συσπάσεων του φάρυγγα κατά τη διαδικασία της γήρανσης είναι

παρόμοια με την ανθρώπινη αδυναμία και τα σημάδια σαρκοπενίας, δηλαδή απώλειας της μυϊκής μάζας, που συναντώνται σε ηλικιωμένους ανθρώπους (Tissenbaum, 2012). Στον αντίποδα, διαγονιδιακοί σκώληκες με αυξημένο προσδόκιμο ζωής παρουσιάζουν καθυστέρηση στην επιδείνωση αυτών των δεικτών (Bansal et al., 2015; Tissenbaum, 2012). Επίσης, βελτιωμένη κίνηση (Sugawara & Sakamoto, 2020) και αύξηση του φαρυγγικού παλμού (Pietsch et al., 2011) έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση της κερσετίνης, ενός γνωστού ενεργοποιητή του πρωτεασώματος (Chondrogianni et al., 2010). Παρόλο που ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων προβλέπει αύξηση του προσδόκιμου ζωής, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής των αγρίου τύπου *C. elegans* έπειτα από τη συνεχή έκθεση στην ένωση MK151. Αν και καταγράφηκε μια τάση αύξησης στην ίδια συγκέντρωση όπου παρατηρήθηκαν οι θετικές επιδράσεις στην ευζωία των σκωλήκων (2 µg/ml), αυτή δεν έφτασε στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας. Η απουσία επέκτασης της διάρκειας ζωής που παρατηρήθηκε *in vivo* έπειτα από χορήγηση της MK151 δεν ήταν κάτι που αναμέναμε, καθώς όπως αναφέρθηκε και στο Α μέρος της παρούσας διατριβής, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σχετίζεται με αυξημένη μακροβιότητα (Chondrogianni et al., 2014, 2020). Υποθέτουμε ότι αυτή η αντίφαση μπορεί να οφείλεται είτε σε διαφορές στα επίπεδα ενεργοποίησης του πρωτεασώματος που επιτυγχάνονται μέσω των διαφόρων παρεμβάσεων (υπερέκφραση πρωτεασωμικών υπομονάδων, ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν την έκφραση πρωτεασωμικών υπομονάδων) είτε στην έλλειψη αντιοξειδωτικής δράσης της ένωσης MK151. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η χορήγηση εκχυλίσματος του καρπού ασαί (acai) από το φυτό *E. precatoria*, το οποίο είναι πλούσιο σε α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), λιπίδια και πολυφαινόλες, βελτίωσε σημαντικά δείκτες ευζωίας, όπως η αύξηση του φαρυγγικού παλμού, σε νηματώδεις σκώληκες *C. elegans* χωρίς όμως να οδηγήσει σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής των σκωλήκων (Peixoto et al., 2016). Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η ευζωία δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη διάρκεια ζωής. **Συνολικά, η ένωση MK151 είναι η πρώτη συνθετική ένωση δομικός ενεργοποιητής του πρωτεασώματος που παρουσιάζει αντιγηραντικές ιδιότητες *in cellulo* και, σημαντικότερα, βελτιώνει την ευζωία παρατείνοντας τη διάρκεια υγείας *in cellulo* και *in vivo*.**

Οι συνθετικές ενώσεις που έχουν έως τώρα αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως δομικοί ενεργοποιητές του πρωτεασώματος έχουν επίσης χαρακτηριστεί και για την ικανότητά τους να προωθούν την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με τάση συσσωμάτωσης. Εντούτοις, οι περισσότερες επικεντρώνονται στη μελέτη κυρίως της α-συνουκλεΐνης, συσσωματώματα της οποίας παρατηρούνται σε ασθενείς με PD (Coleman & Trader, 2018b; Jones et al., 2017; Nelson et al., 2024; Njomen et al., 2018; Trader et al., 2017), ενώ η ένωση TCH-165 οδήγησε σε αυξημένη αποικοδόμηση και της πρωτεΐνης tau που εμπλέκεται στην παθογένεια της AD (Njomen et al., 2018). Ωστόσο, η ικανότητα των συνθετικών δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος να αποικοδομούν την α-συνουκλεΐνη ή την πρωτεΐνη tau περιορίζεται μόνο σε δοκιμές *in vitro* και *in cellulo*. Εξαίρεση αποτελεί η ένωση methylene blue, ένα ανάλογο φαινοθειαζίνης, όπου η

χορήγησή της μείωσε τα επίπεδα των Αβ<sub>40</sub> και Αβ<sub>42</sub> πεπτιδίων στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών 3xTg-AD αφήνοντας ανεπηρέαστη την εναπόθεση των Αβ αμυλοειδικών πλακών. Παράλληλα, βελτίωσε τις ικανότητες μάθησης και μνήμης των ποντικών (Medina et al., 2011). Μολονότι στη συγκεκριμένη μελέτη η ένωση methylene blue οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) και τρυψίνης (T-L) σε εγκεφάλους ποντικών, δεν ελέγχθηκε η ικανότητά της να ενεργοποιεί δομικά το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικών λυμάτων. Επιπρόσθετα, οι Stack και συνεργάτες λίγα χρόνια αργότερα, έδειξαν ότι η ένωση methylene blue εμποδίζει την τοξικότητα που προκαλείται από τη συσσώρευση της πρωτεΐνης tau σε διαγονιδιακούς ποντικούς ενεργοποιώντας το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (Stack et al., 2014), χωρίς να εξετάζουν την πιθανότητα εμπλοκής του πρωτεασώματος. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι **η υβριδική ένωση MK151 είναι ο πρώτος συνθετικός δομικός ενεργοποιητής του πρωτεασώματος που παρέχει προστασία έναντι της πρωτεοτοξικότητας σε *in vivo* μοντέλα**. Ειδικότερα, η ένωση MK151 καθυστερεί το ρυθμό παράλυσης που προκαλείται λόγω του Αβ πεπτιδίου σε διαγονιδιακούς νηματώδεις σκωλήκες *C. elegans* μοντέλα για την AD. Πιστεύουμε ότι η αυξημένη δραστηριότητα του πρωτεασώματος προάγει την αποικοδόμηση των Αβ πεπτιδίων μειώνοντας συνολικά την εναπόθεση των Αβ συσσωματωμάτων, όπως υποδεικνύουν τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τη χορήγηση της ένωσης στο διαγονιδιακό στέλεχος CL2331. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα της MK151 να προστατεύει τους γλουταματεργικούς νευρώνες των διαγονιδιακών UA198 σκωλήκων από τον ηλικιο-εξαρτώμενο νευροεκφυλισμό που υφίστανται λόγω της έκφρασης του Αβ πεπτιδίου. Εάν και δεν καταγράφηκε στατιστική σημαντικότητα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η θετική τάση διατήρησης υγιών νευρώνων έπεται από τη χορήγηση της ένωσης, ενισχύει την πιθανή αποτελεσματικότητάς της και σε αυτό το μοντέλο. Πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι τα αποτελέσματα αφορούν στην πέμπτη ημέρα της ενήλικης ζωής των σκωλήκων, και όχι στην έκτη, όπου στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα αναφέρθηκαν ύστερα από τη χορήγηση της ένωσης DBTO ή την υπερέκφραση της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος στο ίδιο μοντέλο (Panagiotidou et al., 2023). Η συνέχιση του πειράματος και η εκτίμηση της ακεραιότητας των γλουταματεργικών νευρώνων την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής των διαγονιδιακών αυτών σκωλήκων, πιθανώς να οδηγεί σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Έκπληξη προκαλεί το γεγονός ότι η υβριδική ένωση MK151 δεν οδήγησε σε αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y του ανθρώπου (τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις και τις συνθήκες που ελέγχθηκαν) και κατ' επέκταση στην έλλειψη προστασίας των κυττάρων έναντι της Αβ-πρωτεοτοξικότητας. Η παρατήρηση αυτή απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Αρχικά, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί ότι η ένωση πράγματι εισέρχεται εντός των συγκεκριμένων κυττάρων και στη συνέχεια να ελεγχθούν περισσότερες συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με διαφορετικούς χρόνους χορήγησης της ένωσης MK151, προκειμένου να αποκαλυφθεί η πλήρης δυναμική της. Παρόλα αυτά, η MK151 παρουσιάζει πολλά υποσχόμενες νευροπροστατευτικές ιδιότητες, με τα προκαταρκτικά ευρήματα να

δείχνουν ότι η ένωση αξίζει περαιτέρω διερεύνηση καθώς δεν μπορούμε να αγνοήσουμε τις θετικές επιδράσεις που καταγράφηκαν σε οργανισμικό επίπεδο.

Στη συνέχεια, έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της υβριδικής ένωσης MK151 και αξιολόγησης των βιολογικών επιδράσεων των νέων βελτιστοποιημένων αυτών ενώσεων. Το τοποϊσομερές της ένωσης MK151, **MK212**, καθώς και η ένωση **MK215**, όπου η υδροξυτυροσόλη αντικαταστάθηκε από την αντιοξειδωτική ένωση ρεσορκινόλη, κατέγραψαν μεγαλύτερη αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος *in vitro*, απουσία κυτταρικών λυμάτων. Εντούτοις, καμία από αυτές δεν εμφάνισε καλύτερη νευροπροστατευτική δράση *in vivo* σε σύγκριση με την ένωση MK151 και για αυτό δεν μελετήθηκαν περαιτέρω. Μεγάλη έκπληξη προκάλεσε η νέα υβριδική ένωση **MK218**, στην οποία ο τριαζολικός δακτύλιος συνδέεται με τον ετεροκυκλικό δακτύλιο του χρωμανίου μέσω ενός ατόμου άνθρακα σε αντίθεση με την άμεση σύνδεση στην ένωση MK151. Η ένωση MK218 παρουσίασε παρόμοια αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) *in vitro* απουσία κυτταρικών λυμάτων και *in cellulo* με την ένωση-οδηγό MK151. Ωστόσο, η αύξηση που σημειώθηκε *in cellulo* επετεύχθη σε μικρότερη συγκέντρωση χορήγησης (0.1 μg/ml) σε σύγκριση με την ένωση MK151 (0.5 μg/ml). Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βιολογικές επιδράσεις της ένωσης MK218, καθώς καταγράφηκε ισχυρότερη αντιγηραντική δράση της MK218 έπειτα από τη συνεχόμενη χορήγησή της σε πρωτογενείς, εμβρυικούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου. Μάλιστα αυτή συνοδευόταν από βελτίωση δεικτών κυτταρικής ευζωίας, όπως μείωση των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων, ταχύτερη επούλωση μιας «τεχνητής πληγής» και μείωση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών. Η αντιγηραντική δράση της ένωσης MK218 παρατηρήθηκε σε μικρότερη συγκέντρωση (0.1 μg/ml) σε σύγκριση με την ένωση MK151 (0.5 μg/ml). Αξιοσημείωτο είναι ότι η ένωση MK218 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική επέκταση του οργανισμικού προσδόκιμου ζωής στη συγκέντρωση (2 μg/ml) όπου η ένωση MK151 παρουσίασε μια τάση αύξησης χωρίς να αγγίζει τη στατιστική σημαντικότητα. Δεδομένων των θετικών επιδράσεων της ένωσης MK151 στη βελτίωση της ευζωίας των αγρίου τύπου *C. elegans*, είναι σημαντικό να μελετηθούν παρόμοιοι δείκτες και έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης MK218. Νευροπροστατευτική δράση καταγράφηκε και στην περίπτωση της MK218, καθώς παρατηρήθηκε καθυστέρηση της παράλυσης που προκαλείται λόγω της έκφρασης του Αβ πεπτιδίου σε διαγονιδιακούς σκώληκες. Μάλιστα, η θετική επίδραση της ένωσης MK218 ήταν ισχυρότερη σε σχέση με εκείνη της MK151. Τα πρώιμα αυτά αποτελέσματα, υποδεικνύουν ότι η νέα βελτιστοποιημένη ένωση MK218 παρουσιάζει αντιγηραντικές και νευροπροστατευτικές δράσεις καθιστώντας την πολλά υποσχόμενη. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περισσότερα πειράματα προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι αρχικές αυτές παρατηρήσεις εμβαθύνοντας στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης της.

Τέλος, μελετήθηκαν ισοστερείς ενώσεις του χρωμανίου, στις οποίες το μεθυλένιο στη θέση τέσσερα (4) του χρωμανικού δακτυλίου αντικαταστάθηκε από άτομο θείου (S). Η νέα υβριδική ένωση **TC369** παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση της ενεργότητας

χυμοθρυψίνης (CT-L) *in vitro* απουσία κυτταρικών λυμάτων σε σύγκριση με την ένωση-οδηγό MK151. Ενεργοποίηση του πρωτεασώματος επιτεύχθηκε και *in cellulo*, αν και η αντιγηραντική δράση της ένωσης σε κυτταρικό επίπεδο απαιτεί περισσότερη διερεύνηση (με τη χορήγηση πιθανώς μικρότερων συγκεντρώσεων) καθώς τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα. Ωστόσο, δεν θα μπορούσαμε να μην αναφερθούμε στη βελτίωση των δεικτών κυτταρικής ευζωίας που παρατηρήθηκαν έπειτα από τη χορήγηση της ένωσης TC369 σε πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου (μείωση των θετικών στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης κυττάρων, ταχύτερη επούλωση μιας «τεχνητής πληγής» και μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p21). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντιγηραντική δράση της TC369 *in vivo*, όπου στην ίδια συγκέντρωση χορήγησης με την ένωση MK151, οι αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans* παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο προσδόκιμο ζωής τους σε σχέση με τους σκώληκες-μάρτυρες. Επιπροσθέτως, οι δείκτες ευζωίας (φαρυγγικός παλμός, ρυθμός κενώσεων και κινητικότητα) που μελετήθηκαν παρουσία της ένωσης MK151 καθώς οι σκώληκες γερνούσαν, βελτιώθηκαν και στην περίπτωση χορήγησης της ένωσης TC369, υποστηρίζοντας τις ευεργετικές της ιδιότητες τόσο στη διάρκεια ζωής όσο και στη διάρκεια υγείας των σκωλήκων. Σημαντική είναι και η νευροπροστατευτική δράση της TC369, η οποία οδήγησε σε στατιστικά σημαντική επιβράδυνση της παράλυσης διαγονιδιακών σκωλήκων μοντέλων της AD. Ωστόσο, αντίθετα με την ένωση MK151, δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση στη εναπόθεση των Αβ συσσωματωμάτων στους διαγονιδιακούς σκώληκες CL2331. Για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης της ένωσης TC369, συντέθηκαν οι υβριδικές ενώσεις **TC487**, τοποϊσομερές της TC369, και η **TC394**, στην οποία ο τριαζολικός δακτύλιος έχει αντικατασταθεί από τον ισοστερή 1,3,4-οξαδιαζόλιο. Η ένωση TC487 αύξησε την ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος *in vitro*, απουσία κυτταρικών λυμάτων, επιτυγχάνοντας το ίδιο ποσοστό ενεργοποίησης με την ένωση TC369, αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση (10 μg/ml έναντι 20 μg/ml). Επίσης, η νευροπροστατευτική δράση της TC487 που εκδηλώθηκε ως καθυστέρηση της παράλυσης των διαγονιδιακών σκωλήκων ήταν ισχυρότερη σε σχέση με εκείνη της TC369. Αντίθετα, η ένωση TC394 παρουσίασε μικρότερο ποσοστό ενεργοποίησης του πρωτεασώματος *in vitro*, ενώ δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική επιβράδυνση της παράλυσης των διαγονιδιακών σκωλήκων *C. elegans*. Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι τα ισοστερή του χρωμανίου στις νέες υβριδικές ενώσεις διαθέτουν σημαντική προοπτική για την ανάπτυξη ενώσεων με αντιγηραντική και/ή νευροπροστατευτική δράση, ενώ επίσης η παρουσία του τριαζολικού δακτυλίου φαίνεται απαραίτητη για τις θετικές βιολογικές δράσεις των συνθετικών υβριδικών ενώσεων.

Συνολικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή αποκάλυψε δομικούς ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος με αντιγηραντικές ιδιότητες και ιδιότητες έναντι της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε κυτταρικά και οργανισμικά μοντέλα γήρανσης. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που ταυτοποίησε μια φυσική ένωση που απομονώθηκε από θαλάσσιο οργανισμό, και συγκεκριμένα την ένωση DBTO προερχόμενη από το καφέ άλγος *D. mediterrane*. Ο μεταβολίτης DBTO βελτίωσε τη διάρκεια υγείας τόσο σε κυτταρικό,

όσο και σε οργανισμικό επίπεδο, ενώ αποκαλύφθηκε και η νευροπροστατευτική του δράση έναντι της τοξικότητας που προκαλείται λόγω του Αβ πεπτιδίου σε κυτταρικό και οργανισμικό επίπεδο. Επίσης, η «σύνδεση» δύο φυσικών ενώσεων, της υδροξυτυροσόλης και της βιταμίνης Ε, που δεν έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα, οδήγησε στη δημιουργία μιας νέας βιο-εμπνευσμένης συνθετικής ένωσης, της MK151, ενεργοποιητή του 20S πρωτεασώματος πιθανά μέσω άμεσης στερεοχημικής αλληλεπίδρασης με αυτό. Η ένωση MK151 παρουσίασε αντιγηραντική δράση και θετική επίδραση στη διατήρηση της κυτταρικής και οργανισμικής ευζωίας, ενώ εμφανίζει και πολλά υποσχόμενες νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Οι παράγωγες ενώσεις που συντέθηκαν χρησιμοποιώντας ως οδηγό την ένωση MK151 ήταν ικανές να ενεργοποιήσουν το 20S πρωτεάσωμα *in vitro* απουσία κυτταρικών λυμάτων εμφανίζοντας παράλληλα παρόμοιες ή και σε κάποιες περιπτώσεις καλύτερες αντιγηραντικές και/ή νευροπροστατευτικές δράσεις, ανοίγοντας έτσι το δρόμο προς την κλινική αξιοποίηση αυτών των πολλά υποσχόμενων δομικών ενεργοποιητών του πρωτεασώματος.

Η εξασφάλιση λειτουργικών πρωτεασωμάτων καθώς ο οργανισμός γηράσκει είναι υψίστης σημασίας για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Στα υγιή κύτταρα, παρόλο που το σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) είναι υπεύθυνο για την πλειονότητα της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, μόνο το 21-35% των πρωτεασωμάτων βρίσκεται στη 26S μορφή ποσοστό που είναι επαρκές για τη διατήρηση της πρωτεόστασης. Εντούτοις, κατά τη γήρανση ή σε ασθένειες όπως η AD, η έκφραση των υπομονάδων που απαρτίζουν το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο μειώνεται, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των πρωτεασωμάτων που βρίσκονται στην 26S μορφή σε λιγότερο από 10%. Το 90% των πρωτεασωμάτων που απομένουν στην 20S μορφή δεν έχουν την ικανότητα να αποικοδομήσουν πρωτεΐνες που φέρουν την ετικέτα της ουμπικιτίνης. Έτσι, η αδυναμία δημιουργίας 26S πρωτεασωμάτων εξαιτίας της έλλειψης διαθέσιμων 19S ρυθμιστικών συμπλόκων, οδηγεί σε μειωμένη ουμπικιτινο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση πρωτεϊνών, καθιστώντας τη στόχευση του UPS μη ρεαλιστική για την αντιμετώπιση ηλικιο-εξαρτώμενων παθολογιών (Coleman & Trader, 2018a). Αντιθέτως, η ουμπικιτινο-ανεξάρτητη αποικοδόμηση που διεξάγεται μέσω του 20S πρωτεασώματος αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση. Στόχοι του 20S πρωτεασώματος είναι κατεστραμμένες πρωτεΐνες, όπως εκείνες με εγγενώς αποδιοργανωμένες περιοχές ή οξειδωτικά τροποποιημένες. Καθώς η γήρανση και οι ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες, όπως η AD ή η PD, χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση τέτοιου είδους πρωτεϊνών και δεδομένου ότι τα γηρασμένα κύτταρα αποτελούν μια «δεξαμενή» 20S πρωτεασωμάτων που περιμένουν να πυροδοτηθούν, το 20S πρωτεάσωμα είναι ένας ελκυστικός και πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος (Coleman & Trader, 2018a; Njomen & Tepe, 2019; Orok-Nsiah & Gestwicki, 2018) που όμως απαιτεί προσεκτική αξιολόγηση.

Παρόλο που η ιδέα της πρωτεασωματικής ενεργοποίησης ως θεραπευτικής προσέγγισης έναντι ασθενειών που έχουν σχέση με λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση πρωτεϊνών δεν είναι καινούρια, οι ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος που έχουν

αναφερθεί έως τώρα στη βιβλιογραφία είναι περιορισμένοι. Μάλιστα μερικές από αυτές τις ενώσεις παρουσιάζουν ενεργοποιητική δράση και έναντι του 26S πρωτεασώματος, καθώς τα δύο σύμπλοκα (20S και 26S) μοιράζονται κοινά πρωτεολυτικά κέντρα. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι η ένωση 1 που αναφέρουν οι Coleman και Trader (Coleman & Trader, 2018b) και το ουρσολικό οξύ (Coleman & Trader, 2018b; N. Wang et al., 2022). Ωστόσο, η χρήση ενώσεων που ενισχύουν τόσο την ουμπικιτινο-εξαρτώμενη, όσο και την ουμπικιτινο-ανεξάρτητη αποικοδόμηση πρωτεϊνών εγκυμονεί κινδύνους και για αυτό θα πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση. Και τούτο διότι, η ενίσχυση της αποικοδόμησης πρωτεϊνών μέσω του 26S πρωτεασώματος μπορεί να προωθήσει την καρκινογένεση. Επιπλέον, πολλές ενώσεις ενεργοποιούν το πρωτεάσωμα μέσω επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Ωστόσο, η ενισχυμένη αποικοδόμηση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω της Nrf2-μεσολαβούμενης αύξησης της ενεργότητας του πρωτεασώματος έχει αναφερθεί σε καρκίνους, όπως του παχέος εντέρου και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Arlt et al., 2009; L. Chen et al., 2017; Solis et al., 2010), ενώ η αναστολή του πρωτεασώματος αποτελεί μηχανισμό δράσης των περισσότερων φαρμάκων που στοχεύουν σε αιματολογικούς καρκίνους, όπως το πολλαπλούν μυέλωμα (Manasanch & Orlowski, 2017).

Οι ενώσεις που εξετάζονται στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν φαίνεται να παρουσιάζουν τις προαναφερθείσες παρενέργειες. Σε πειράματα με πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου και αγρίου τύπου σκώληκες *C. elegans*, οι νέοι ενεργοποιητές του πρωτεασώματος που ταυτοποιήσαμε προκάλεσαν ομαλή γήρανση, ενώ μελέτη τοξικότητας των ενώσεων στο νηματώδη σκώληκα δεν αποκάλυψε κάποια ισχυρή τοξική επίδραση *in vivo*. Παρά το γεγονός ότι θεωρούμε πως οι ενώσεις μας δρουν επιλεκτικά ενεργοποιώντας το 20S πρωτεάσωμα, απαιτείται διεξοδική διερεύνηση των ενδεχόμενων επιπλέον βιολογικών στόχων των ενώσεων εντός του κυττάρου, καθώς οι ενώσεις μπορεί να έχουν και άλλες δράσεις που δεν εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη. Προς αυτήν την κατεύθυνση, βρίσκονται σε εξέλιξη πειράματα συγκρυστάλλωσης της ένωσης MK151 με το ανθρώπινο 20S πρωτεάσωμα, με σκοπό να αποκαλυφθεί η ακριβής αλληλεπίδραση της ένωσης με αυτό. Επίσης, RNA από πρωτογενείς, εμβρυϊκούς HFL-1 ινοβλάστες του ανθρώπου που δέχτηκαν την επίδραση των ενώσεων DBTO, MK151 και TC369 καθώς και το αντίστοιχο control (χορήγηση του οργανικού διαλύτη DMSO) έχει απομονωθεί και η ανάλυσή του μέσω RNA sequencing θα αποκαλύψει τις επιπτώσεις των νέων αυτών ενεργοποιητών στην έκφραση γονιδίων στα κύτταρα.

Εν κατακλείδι, η έρευνα σχετικά με τους ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος δείχνει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, ιδιαίτερα στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η AD, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση πρωτεϊνών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συστατικά που είναι απαραίτητα για τη συναρμολόγηση και κατ' επέκταση τη λειτουργικότητα των 26S πρωτεασωμάτων δεν εκφράζονται επαρκώς (Coleman & Trader, 2018a; Oropku-Nsiah & Gestwicki, 2018), καθιστώντας το 20S πρωτεάσωμα ιδανικό στόχο για θεραπευτικές

παρεμβάσεις. Από την άλλη πλευρά, οι ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος βοηθούν στην απομάκρυνση τοξικών πρωτεϊνών, επιβραδύνοντας τη γήρανση και προάγοντας την ευζωία. Όσον αφορά το τελευταίο, το ενδιαφέρον για τη διασφάλιση υγιούς γήρανσης ολοένα και αυξάνεται (Bansal et al., 2015; Tissenbaum, 2012, 2015), στοχεύοντας στην επέκταση της διάρκειας υγείας και στη μείωση της διάρκειας γήρατος που συνοδεύεται, κατά κανόνα, από παθολογίες που υποδουλίζουν την ποιότητα ζωής των ατόμων. Η κατανόηση και η αξιοποίηση των ενεργοποιητών του πρωτεασώματος μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους για τη θεραπεία όχι μόνο νευροεκφυλιστικών ασθενειών, αλλά και για την αντιμετώπιση των φαινοτύπων της γήρανσης (Chondrogianni et al., 2020; Chondrogianni, Voutetakis, et al., 2015; Chondrogianni & Gonos, 2008; Njomen & Tepe, 2019; M. A. Vasilopoulou, Papaevgeniou, et al., 2022; Q. Yu et al., 2024). Η στοχευμένη ενεργοποίηση του πρωτεασώματος προσφέρει μια νέα οπτική στη βελτίωση και διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης και επακόλουθα στην ομαλή κυτταρική λειτουργία, η οποία πλήττεται καθώς οι οργανισμοί γηράσκουν. Οι ενεργοποιητές του 20S πρωτεασώματος μπορεί να αποτελέσουν το εναρκτήριο λάκτισμα για καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις όχι μόνο στην αντιμετώπιση ασθενειών αλλά και στην επέκταση της ποιοτικής διάρκειας ζωής των ατόμων, ειδικότερα στη σύγχρονη εποχή όπου το προσδόκιμο ζωής συνεχώς αυξάνεται.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ádori, C., Low, P., Moszkovkin, G., Bagdy, G., László, L., & Kovács, G. G. (2006). Subcellular distribution of components of the ubiquitin-proteasome system in non-diseased human and rat brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(2). <https://doi.org/10.1369/jhc.5B6752.2005>
- Aitlhadj, L., & Stürzenbaum, S. R. (2013). The toxicological assessment of two anti-obesity drugs in *C. elegans*. *Toxicology Research*, 2(2). <https://doi.org/10.1039/c2tx20096a>
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., & Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13742>
- Ali, R. E., & Rattan, S. I. S. (2006). Curcumin's biphasic hormetic response on proteasome activity and heat-shock protein synthesis in human keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1). <https://doi.org/10.1196/annals.1354.056>
- Almeida, C. G., Takahashi, R. H., & Gouras, G. K. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci*, 26(16), 4277–4288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5078-05.2006>
- Altintas, O., Park, S., & Lee, S. J. V. (2016). The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports*, 49(2), 81–92. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.2.261>
- Amorim, J. A., Coppotelli, G., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Ross, J. M., & Sinclair, D. A. (2022). Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 18, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>

- Anderson, R. T., Bradley, T. A., & Smith, D. M. (2022). Hyperactivation of the proteasome in *Caenorhabditis elegans* protects against proteotoxic stress and extends lifespan. *Journal of Biological Chemistry*, 298(10). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102415>
- Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Muerkoesler, S. S., Brosch, M., Röder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M. P., Fölsch, U. R., & Schäfer, H. (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, 28(45). <https://doi.org/10.1038/onc.2009.264>
- Aubert, G., & Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiological Reviews*, 88(2), 557–579. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00026.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0020824660008.JPEG>
- Aunan, J. R., Cho, W. C., & Søreide, K. (2017). The biology of aging and cancer: A brief overview of shared and divergent molecular hallmarks. In *Aging and Disease* (Vol. 8, Issue 5). <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0103>
- Aunan, J. R., Watson, M. M., Hagland, H. R., & Søreide, K. (2016). Molecular and biological hallmarks of ageing. In *British Journal of Surgery* (Vol. 103, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/bjs.10053>
- Bae, H., Gurinovich, A., Malovini, A., Atzmon, G., Andersen, S. L., Villa, F., Barzilai, N., Puca, A., Perls, T. T., & Sebastiani, P. (2018). Effects of FOXO3 Polymorphisms on Survival to Extreme Longevity in Four Centenarian Studies. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(11). <https://doi.org/10.1093/gerona/glx124>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzoza, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589). <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353(6294), aac4354. <https://doi.org/10.1126/science.aac4354>

- Bansal, A., Zhu, L. J., Yen, K., & Tissenbaum, H. A. (2015). Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.1412192112>
- Baraibar, M. A., & Friguet, B. (2012). Changes of the proteasomal system during the aging process. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 109, pp. 249–275). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397863-9.00007-9>
- Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., & Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 27.1-27.28. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>
- Bellavista, E., Martucci, M., Vasuri, F., Santoro, A., Mishto, M., Kloss, A., Capizzi, E., Degiovanni, A., Lanzarini, C., Remondini, D., Dazzi, A., Pellegrini, S., Cescon, M., Capri, M., Salvioli, S., D'Errico-Grigioni, A., Dahlmann, B., Grazi, G. L., & Franceschi, C. (2014). Lifelong maintenance of composition, function and cellular/subcellular distribution of proteasomes in human liver. *Mechanisms of Ageing and Development*, 141–142, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2014.09.003>
- Belote, J. M., Miller, M., & Smyth, K. A. (1998). Evolutionary conservation of a testes-specific proteasome subunit gene in *Drosophila*. *Gene*, 215(1). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00256-X)
- Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 15(3), 349–357. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>
- Ben-Nissan, G., Katzir, N., Füzesi-Levi, M. G., & Sharon, M. (2022). Biology of the Extracellular Proteasome. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/biom12050619>
- Ben-Nissan, G., & Sharon, M. (2014). Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, 4, 862–884. <https://doi.org/10.3390/biom4030862>

- Bertelli, M., Kiani, A. K., Paolacci, S., Manara, E., Kurti, D., Dhuli, K., Bushati, V., Miertus, J., Pangallo, D., Baglivo, M., Beccari, T., & Michelini, S. (2020). Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 309). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.016>
- Betancourt, D., Lawal, T., & Tomko, R. J. (2023). Wiggle and Shake: Managing and Exploiting Conformational Dynamics during Proteasome Biogenesis. In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/biom13081223>
- Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M. C., Van Veen, E., Czopik, A., Steele, A. D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., & Guarente, L. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*, 6(6). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00335.x>
- Bott, L. C., Badders, N. M., Chen, K. L., Harmison, G. G., Bautista, E., Shih, C. C. Y., Katsuno, M., Sobue, G., Taylor, J. P., Dantuma, N. P., Fischbeck, K. H., & Rinaldi, C. (2016). A small-molecule Nrf1 and Nrf2 activator mitigates polyglutamine toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 25(10), 1979–1989. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw073>
- Braten, O., Livneh, I., Ziv, T., Admon, A., Kehat, I., Caspi, L. H., Gonen, H., Bercovich, B., Godzik, A., Jahandideh, S., Jaroszewski, L., Sommer, T., Kwon, Y. T., Guharoy, M., Tompa, P., & Ciechanover, A. (2016). Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1608644113>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1). <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Brown, C. J., Kaufman, T., Trinidad, J. C., & Clemmer, D. E. (2018). Proteome changes in the aging *Drosophila melanogaster* head. *International Journal of Mass Spectrometry*, 425, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.01.003>
- Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., & Hochstrasser, M. (2017). Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 429, 3500–3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>

- Bulteau, A. L., Moreau, M., Saunois, A., Nizard, C., & Friguet, B. (2006). Algae extract-mediated stimulation and protection of proteasome activity within human keratinocytes exposed to UVA and UVB irradiation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(1–2), 136–143. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.136>
- Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- C. Crdenas-Aguayo, M. del, C. Silva-Lucero, M. del, Cortes-Ortiz, M., Jimnez-Ramos, B., Gmez-Virgilio, L., Ramrez-Rodrguez, G., Vera- Arroyo, E., Fiorentino-Prez, R., Garca, U., Luna-Muoz, J., & A. Meraz Ros, M. (2014). Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. In *Neurochemistry*. <https://doi.org/10.5772/57398>
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 75). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Cao, Z., Wu, Y. J., Curry, K., Wu, Z., Christen, Y., & Luo, Y. (2007). Ginkgo biloba extract EGb 761 and Wisconsin Ginseng delay sarcopenia in *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(12). <https://doi.org/10.1093/gerona/62.12.1337>
- 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. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1534793>
- Carrard, G., Bulteau, A. L., Petropoulos, I., & Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome structure and function in aging. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00085-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00085-7)
- Chalfie, M., Hart, A. C., Rankin, C. H., & Goodman, M. B. (2014). Assaying mechanosensation. In *WormBook: the online review of C. elegans biology*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.172.1>

- Chatzigeorgiou, S., Thai, Q. D., Tchoumtchoua, J., Tallas, K., Tsakiri, E. N., Papassideri, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L., & Trougakos, I. P. (2017). Isolation of natural products with anti-ageing activity from the fruits of *Platanus orientalis*. *Phytomedicine*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.009>
- Chen, L., Brewer, M. D., Guo, L., Wang, R., Jiang, P., & Yang, X. (2017). Enhanced Degradation of Misfolded Proteins Promotes Tumorigenesis. *Cell Reports*, 18(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.010>
- Chen, Q., Ding, Q., Thorpe, J., Dohmen, R. J., & Keller, J. N. (2005). RNA interference toward UMP1 induces proteasome inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for protein oxidation and autophagic cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(2), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.019>
- Chen, Q., Thorpe, J., Dohmen, J. R., Li, F., & Keller, J. N. (2006). Ump1 extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: Central role for the proteasome? *Free Radical Biology and Medicine*, 40(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.048>
- Chen, X., Barclay, J. W., Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2015). Using *C. elegans* to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases. *Chemistry Central Journal*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0143-y>
- Chen, X., Zhang, W., Gao, Y. F., Su, X. Q., & Zhai, Z. H. (2002). Senescence-like changes induced by expression of p21Waf1/Cip1 in NIH3T3 cell line. *Cell Research*, 12(3–4). <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290129>
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y. G., Dombkowski, D., Sykes, M., & Scadden, D. T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21(cip1/waf1). *Science*, 287(5459). <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1804>
- Chhabra, P., & Brayman, K. L. (2013). Stem Cell Therapy to Cure Type 1 Diabetes: From Hype to Hope. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(5). <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0116>

- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11). <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. In *Nature Medicine* (Vol. 21, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Chocron, E. S., Munkácsy, E., Kim, H. S., Karpowicz, P., Jiang, N., Van Skike, C. E., DeRosa, N., Banh, A. Q., Palavicini, J. P., Wityk, P., Kalinowski, L., Galvan, V., Osmulski, P. A., Jankowska, E., Gaczynska, M., & Pickering, A. M. (2022). Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models. *Science Advances*, 8(23). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk2252>
- Choi, J. (2008). *Caenorhabditis elegans* as a biological model for multilevel biomarker analysis in environmental toxicology and risk assessment. *Toxicological Research*, 24(4). <https://doi.org/10.5487/TR.2008.24.4.235>
- Choi, W. H., De Poot, S. A. H., Lee, J. H., Kim, J. H., Han, D. H., Kim, Y. K., Finley, D., & Lee, M. J. (2016). Open-gate mutants of the mammalian proteasome show enhanced ubiquitin-conjugate degradation. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10963>
- Chondrogianni, N., Georgila, K., Kourtis, N., Tavernarakis, N., & Gonos, E. S. (2015). 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal*, 29(2), 611–622. <https://doi.org/10.1096/fj.14-252189>
- Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2007). Overexpression of hUMP1/POMP proteasome accessory protein enhances proteasome-mediated antioxidant defence. *Experimental Gerontology*, 42(9). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.01.012>
- Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2008). Proteasome activation as a novel antiaging strategy. In *IUBMB Life* (Vol. 60, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/iub.99>

- Chondrogianni, N., Kapeta, S., Chinou, I., Vassilatou, K., Papassideri, I., & Gonos, E. S. (2010). Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Exp Gerontol*, 45(10), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.07.001>
- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Franceschi, C., Friguet, B., & Gonos, E. S. (2000). Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol*, 35(6–7), 721–728. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11053662](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11053662)
- Chondrogianni, N., Sakellari, M., Lefaki, M., Papaevgeniou, N., & Gonos, E. S. (2014). Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 71, pp. 303–320). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.031>
- Chondrogianni, N., Simoes, D. de C. M., Franceschi, C., & Gonos, E. S. (2004). Cloning of differentially expressed genes in skin fibroblasts from centenarians. *Biogerontology*, 5(6). <https://doi.org/10.1007/s10522-004-3188-1>
- Chondrogianni, N., Stratford, F. L. L., Trougakos, I. P., Friguet, B., Rivett, A. J., & Gonos, E. S. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts. Induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28026–28037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301048200>
- Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A. J., Nezis, I. P., Rivett, A. J., & Gonos, E. S. (2005). Overexpression of proteasome  $\beta 5$  subunit increases the amount of assembled proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11840–11850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413007200>
- Chondrogianni, N., Vasilopoulou, M. A., Kapetanou, M., & Gonos, E. S. (2020). Proteasome Modulation: A Way to Delay Aging? In S. I. S. Rattan (Ed.), *Encyclopedia of Biomedical Gerontology* (pp. 92–104). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11461-8>
- Chondrogianni, N., Voutetakis, K., Kapetanou, M., Delitsikou, V., Papaevgeniou, N., Sakellari, M., Lefaki, M., Filippopoulou, K., & Gonos, E. S. (2015). Proteasome

- activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 23, Issue PA, pp. 37–55). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.12.003>
- Chow, D. K., Glenn, C. F., Johnston, J. L., Goldberg, I. G., & Wolkow, C. A. (2006). Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Experimental Gerontology*, 41(3). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.12.004>
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z>
- Chung, K. M., Hernandez, N., Sproul, A. A., & Yu, W. H. (2019). Alzheimer's disease and the autophagic-lysosomal system. *Neurosci Lett*, 697, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.017>
- Ciapetti, P., & Giethlen, B. (2008). Molecular Variations Based on Isosteric Replacements. In *The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00008-0>
- Cisneros, B., García-Aguirre, I., De Ita, M., Arrieta-Cruz, I., & Rosas-Vargas, H. (2023). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Cellular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. In *Archives of Medical Research* (Vol. 54, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2023.06.002>
- Coleman, R. A., & Trader, D. J. (2018a). All about the Core: A Therapeutic Strategy to Prevent Protein Accumulation with Proteasome Core Particle Stimulators. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 1(2). <https://doi.org/10.1021/acsptsci.8b00042>
- Coleman, R. A., & Trader, D. J. (2018b). Development and Application of a Sensitive Peptide Reporter to Discover 20S Proteasome Stimulators. *ACS Combinatorial Science*, 20(5). <https://doi.org/10.1021/acscmbsci.7b00193>
- Collins, G. A., & Goldberg, A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169, 792–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>

- Collins, J. J., Huang, C., Hughes, S., & Kornfeld, K. (2008). The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. In *WormBook: the online review of C. elegans biology*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.137.1>
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Corpas, R., Grinan-Ferre, C., Rodriguez-Farre, E., Pallas, M., & Sanfeliu, C. (2019). Resveratrol Induces Brain Resilience Against Alzheimer Neurodegeneration Through Proteostasis Enhancement. *Mol Neurobiol*, 56(2), 1502–1516. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1157-y>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2). <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P., & Yang, A. J. (2006). Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*, 281(16), 10825–10838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512786200>
- Croll, N. A., Smith, J. M., & Zuckerman, B. M. (1977). The aging process of the nematode *caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture. *Experimental Aging Research*, 3(3). <https://doi.org/10.1080/03610737708257101>
- Cui, Y., Ma, S., Zhang, C., Li, D., Yang, B., Lv, P., Xing, Q., Huang, T., Yang, G. L., Cao, W., & Guan, F. (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. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.011>
- D’Adda Di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963). <https://doi.org/10.1038/nature02118>

- Dahlmann, B., Rutschmann, M., Kuehn, L., & Reinauer, H. (1985). Activation of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle by fatty acids or sodium dodecyl sulphate. *Biochemical Journal*, 228(1). <https://doi.org/10.1042/bj2280171>
- Dal Vechio, F. H., Cerqueira, F., Augusto, O., Lopes, R., & Demasi, M. (2014). Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation. *Free Radic Biol Med*, 67, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.017>
- Danes, B. S. (1971). Progeria: a cell culture study on aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(9). <https://doi.org/10.1172/JCI106692>
- Dasuri, K., Zhang, L., Ebenezer, P., Liu, Y., Fernandez-Kim, S. O., & Keller, J. N. (2009). Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(11–12). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.10.003>
- Davidson, K., & Pickering, A. M. (2023). The proteasome: A key modulator of nervous system function, brain aging, and neurodegenerative disease. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1124907>
- Davies, K. J. A. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83, 301–310. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01250-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01250-0)
- De Vrij, F. M., Sluijs, J. A., Gregori, L., Fischer, D. F., Hermens, W. T., Goldgaber, D., Verhaagen, J., Van Leeuwen, F. W., & Hol, E. M. (2001). Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J*, 15(14), 2680–2688. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0438com>
- Deshaies, R. J., & Joazeiro, C. A. P. (2009). RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 399–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809>
- Dhawan, R., Dusenbery, D. B., & Williams, P. L. (1999). Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 58(7). <https://doi.org/10.1080/009841099157179>

- Dimri, G. P., & Campisi, J. (1994). Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 59. <https://doi.org/10.1101/SQB.1994.059.01.010>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., & al., et. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.20.9363>
- Dimri, M., & Dimri, G. P. (2019). Senescence-Associated Beta-Galactosidase Marker of Cellular Senescence. In *Encyclopedia of Biomedical Gerontology: Volume 1-3* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11446-1>
- Dwivedi, V., Yaniv, K., & Sharon, M. (2021). Beyond cells: The extracellular circulating 20S proteasomes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1867, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166041>
- Ebstein, F., Kloetzel, P. M., Krüger, E., & Seifert, U. (2012). Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class i antigen processing. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 69, Issue 15, pp. 2543–2558). *Cell Mol Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0938-0>
- Enenkel, C. (2014). Proteasome dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.023>
- Fan, S. Z., Lin, C. S., Wei, Y. W., Yeh, S. R., Tsai, Y. H., Lee, A. C., Lin, W. S., & Wang, P. Y. (2021). Dietary citrate supplementation enhances longevity, metabolic health, and memory performance through promoting ketogenesis. *Aging Cell*, 20(12). <https://doi.org/10.1111/accel.13510>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J. J., Kieft, J., Harkness, T., & Tyler, J. K. (2010). Elevated Histone Expression Promotes Life Span Extension. *Molecular Cell*, 39(5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.015>

- Filippopoulou, K., Papaevgeniou, N., Lefaki, M., Paraskevopoulou, A., Biedermann, D., Kren, V., & Chondrogianni, N. (2017). 2,3-Dehydrosilybin A/B as a pro-longevity and anti-aggregation compound. *Free Radic Biol Med*, 103, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.042>
- Finley, D., & Prado, M. A. (2020). The proteasome and its network: Engineering for adaptability. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033985>
- Fischer, K. E., Hoffman, J. M., Sloane, L. B., Gelfond, J. A. L., Soto, V. Y., Richardson, A. G., & Austad, S. N. (2016). A cross-sectional study of male and female C57BL/6Nia mice suggests lifespan and healthspan are not necessarily correlated. *Aging*, 8(10). <https://doi.org/10.18632/aging.101059>
- Flachsbart, F., Caliebe, A., Kleindorp, R., Blanché, H., Von Eller-Eberstein, H., Nikolaus, S., Schreiber, S., & Nebel, A. (2009). Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.0809594106>
- Fotopoulou, T., Papadopoulou, A., Tzani, A., Mamais, M., Mavrogonatou, E., Pratsinis, H., Koufaki, M., Kletsas, D., & Calogeropoulou, T. (2024). Design and Synthesis of Novel Antioxidant 2-Substituted-5,7,8-Trimethyl-1,4-Benzoxazine Hybrids: Effects on Young and Senescent Fibroblasts. *Antioxidants*, 13(7), 798. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13070798/S1>
- Franić, D., Zubčić, K., & Boban, M. (2021). Nuclear ubiquitin-proteasome pathways in proteostasis maintenance. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/biom11010054>
- Frankowski, H., Alavez, S., Spilman, P., Mark, K. A., Nelson, J. D., Mollahan, P., Rao, R. V., Chen, S. F., Lithgow, G. J., & Ellerby, H. M. (2013). Dimethyl sulfoxide and dimethyl formamide increase lifespan of *C. elegans* in liquid. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(3–4), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.10.002>
- Gaczynska, M., Goldberg, A. L., Tanaka, K., Hendil, K. B., & Rock, K. L. (1996). Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the

- interferon- $\gamma$ -induced subunits LMP2 and LMP7. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29). <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17275>
- Gaczynska, M., Rock, K. L., Spies, T., & Goldberg, A. L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9213>
- Gao, A. W., Alam, G. El, Zhu, Y., Li, W., Katsyuba, E., Sulc, J., Li, T. Y., Li, X., Overmyer, K. A., Lalou, A., Mouchiroud, L., Sleiman, M. B., Cornaglia, M., Morel, J.-D., Houtkooper, R. H., Coon, J. J., & Auwerx, J. (2024). High-content phenotypic analysis of a *C. elegans* recombinant inbred population identifies genetic and molecular regulators of lifespan. *BioRxiv*, 2024.01.15.575638. <https://doi.org/10.1101/2024.01.15.575638>
- Gentier, R. J., & van Leeuwen, F. W. (2015). Misframed ubiquitin and impaired protein quality control: an early event in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*, 8, 47. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00047>
- GH, S., LF, D., A, S., & V, D. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 2109–2117. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.2109>
- Ghosh, T. S., Shanahan, F., & O'Toole, P. W. (2022). The gut microbiome as a modulator of healthy ageing. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 19, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00605-x>
- Gioran, A., Paikopoulos, Y., Panagiotidou, E., Rizou, A. E. I., Nasi, G. I., Dimaki, V. D., Vrila, K. D., Bezantakou, D. S., Spatharas, P. M., Papandreou, N. C., Magafa, V., Lamari, F. N., Iconomidou, V. A., & Chondrogianni, N. (2024). Beneficial Effects of *Sideritis clandestina* Extracts and Sideridiol against Amyloid  $\beta$  Toxicity. *Antioxidants*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/antiox13030261>
- Giordano, M. E., Caricato, R., & Lionetto, M. G. (2020). Concentration dependence of the antioxidant and prooxidant activity of trolox in hela cells: Involvement in the

- induction of apoptotic volume decrease. *Antioxidants*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/antiox9111058>
- Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. In *Physiological Reviews* (Vol. 82, Issue 2). <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>
- González-Dominguez, A., Montañez, R., Castejón-Vega, B., Nuñez-Vasco, J., Lendines-Cordero, D., Wang, C., Mbalaviele, G., Navarro-Pando, J. M., Alcocer-Gómez, E., & Cordero, M. D. (2021). Inhibition of the NLRP3 inflammasome improves lifespan in animal murine model of Hutchinson–Gilford Progeria. *EMBO Molecular Medicine*, 13(10). <https://doi.org/10.15252/emmm.202114012>
- Grice, G. L., & Nathan, J. A. (2016). The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 3497–3506. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2255-5>
- Griffin, E. F., Scopel, S. E., Stephen, C. A., Holzhauer, A. C., Vaji, M. A., Tuckey, R. A., Berkowitz, L. A., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2019). ApoE-associated modulation of neuroprotection from A $\beta$ -mediated neurodegeneration in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(2). <https://doi.org/10.1242/dmm.037218>
- Griffin, E. F., Yan, X., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2018). Distinct functional roles of Vps41-mediated neuroprotection in Alzheimer’s and Parkinson’s disease models of neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 27(24), 4176–4193. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy308>
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., & Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology*, 7, 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/80992>
- Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A. M., Ngo, J. K., & Davies, K. J. A. (2011). HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.015>

- Gu, Z. C., & Enenkel, C. (2014). Proteasome assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 4729–4745. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1699-8>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hahm, J. H., Kim, S., Diloreto, R., Shi, C., Lee, S. J. V., Murphy, C. T., & Nam, H. G. (2015). *C. elegans* maximum velocity correlates with healthspan and is maintained in worms with an insulin receptor mutation. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9919>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274). <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- Harlow, E., & Lane, D. (1999). Using antibodies: a laboratory manual, CSHL Press; 1998. In *Antibodies A Laboratory Manual Illustrated*.
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N. L., Wilkinson, J. E., Frenkel, K., Carter, C. S., Pahor, M., Javors, M. A., Fernandez, E., & Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253). <https://doi.org/10.1038/nature08221>
- Hart, A. C. (2006). Behavior. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.87.1>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)

- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. In *Cell* (Vol. 169, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- Hennekam, R. C. M. (2020). Pathophysiology of premature aging characteristics in Mendelian progeroid disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 63(11). <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.104028>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 28, Issue 6, pp. 436–453). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Hesp, K., Smant, G., & Kammenga, J. E. (2015). Caenorhabditis elegans DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease. In *Experimental Gerontology* (Vol. 72, pp. 1–7). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.006>
- Hipp, M. S., Kasturi, P., & Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 7, pp. 421–435). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- Höhn, A., König, J., & Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. In *Journal of Proteomics* (Vol. 92, pp. 132–159). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004>
- Höhn, A., Tramutola, A., & Cascella, R. (2020). Proteostasis Failure in Neurodegenerative Diseases: Focus on Oxidative Stress. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). <https://doi.org/10.1155/2020/5497046>
- How, C. M., Li, S. W., & Liao, V. H. C. (2018). Chronic exposure to triadimenol at environmentally relevant concentration adversely affects aging biomarkers in Caenorhabditis elegans associated with insulin/IGF-1 signaling pathway. *Science of the Total Environment*, 640–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.314>

- Hsu, H. Y., Lin, T. Y., Hwang, P. A., Tseng, L. M., Chen, R. H., Tsao, S. M., & Hsu, J. (2013). Fucoidan induces changes in the epithelial to mesenchymal transition and decreases metastasis by enhancing ubiquitin-dependent  $\text{tgfb}\beta$  receptor degradation in breast cancer. *Carcinogenesis*, 34, 874–884. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs396>
- Hsu, H. Y., Lin, T. Y., Wu, Y. C., Tsao, S. M., Hwang, P. A., Shih, Y. W., & Hsu, J. (2014). Fucoidan inhibition of lung cancer in vivo and in vitro: Role of the Smurf2-dependent ubiquitin proteasome pathway in  $\text{TGF}\beta$  receptor degradation. *Oncotarget*, 5, 7870–7885. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2317>
- Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–19. <https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.144.1>
- Huang, C., Xiong, C., & Kornfeld, K. (2004). Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.0400848101>
- Huang, L., Ho, P., & Chen, C. H. (2007). Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Letters*, 581(25). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.031>
- Huang, W., Hickson, L. T. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., & Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 18, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>
- Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. In *Journal of Applied Toxicology* (Vol. 37, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/jat.3357>
- Hussong, S. A., Kappahn, R. J., Phillips, S. L., Maldonado, M., & Ferrington, D. A. (2010). Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *Journal of Neurochemistry*, 113(6), 1481–1490. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06688.x>
- Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J. H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J. W., Maratos-Flier, E., & Depinho, R. A. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in

- aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 469(7328).  
<https://doi.org/10.1038/nature09603>
- Jeong, S. (2017). Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Mol Cells*, 40(9), 613–620. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0096>
- JG, W., E, S., JN, T., & S, B. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314(1165), 1–340.  
<https://doi.org/10.1098/RSTB.1986.0056>
- Johnston-Carey, H. K., Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2016). The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 51, Issue 4, pp. 268–281). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1172554>
- Jones, C. L., Njomen, E., Sjögren, B., Dexheimer, T. S., & Tepe, J. J. (2017). Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins. *ACS Chemical Biology*, 12(9).  
<https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00489>
- Jung, S. H., Jae, S. H., Chang, I., & Kim, S. (2007). 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. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(5). <https://doi.org/10.1093/gerona/62.5.490>
- Kabashi, E., Agar, J. N., Strong, M. J., & Durham, H. D. (2012). Impaired proteasome function in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 13(4), 367–371. <https://doi.org/10.3109/17482968.2012.686511>
- Kandel, R., Jung, J., & Neal, S. (2024). Proteotoxic stress and the ubiquitin proteasome system. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 156).  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2023.08.002>
- Kapeta, S., Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2010). Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *Journal*

- of *Biological Chemistry*, 285(11), 8171–8184.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031575>
- Kapetanou, M., Athanasopoulou, S., & Gonos, E. S. (2022). Transcriptional regulatory networks of the proteasome in mammalian systems. *IUBMB Life*, 74(1).  
<https://doi.org/10.1002/iub.2586>
- Kapetanou, M., Chondrogianni, N., Petrakis, S., Koliakos, G., & Gonos, E. S. (2017). Proteasome activation enhances stemness and lifespan of human mesenchymal stem cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 103.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.035>
- Kapetanou, M., Tain, L. S., Nespital, T., Partridge, L., & Gonos, E. S. (2021). FoxO1 is a novel regulator of 20S proteasome subunits expression and activity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 169.  
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.625715>
- Karp, X. (2018). Working with dauer larvae. *WormBook*.  
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.180.1>
- Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A. J., & Gonos, E. S. (2007). The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res*, 10(2), 157–172. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.0513>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 365–381). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesbery, W. R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 75(1), 436–439.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x>
- Kelmer Sacramento, E., Kirkpatrick, J. M., Mazzetto, M., Baumgart, M., Bartolome, A., Di Sanzo, S., Caterino, C., Sanguanini, M., Papaevgeniou, N., Lefaki, M., Childs, D., Bagnoli, S., Terzibasi Tozzini, E., Di Fraia, D., Romanov, N., Sudmant, P. H., Huber, W., Chondrogianni, N., Vendruscolo, M., ... Ori, A. (2020). Reduced

- proteasome activity in the aging brain results in ribosome stoichiometry loss and aggregation. *Molecular Systems Biology*. <https://doi.org/10.15252/msb.20209596>
- Kenyon, C. (2011). The first long-lived mutants: Discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 366, Issue 1561, pp. 9–16). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0276>
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. In *Nature* (Vol. 464, Issue 7288, pp. 504–512). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature08980>
- Kevei, É., & Hoppe, T. (2014). Ubiquitin sets the timer: Impacts on aging and longevity. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 290–292). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2806>
- Khan, T. K., You, Y., Nelson, T. J., Kundu, S., Pramanik, S. K., & Das, J. (2022). Modulation of proteasome activity by curcumin and didemethylcurcumin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(18). <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1911853>
- Khosla, S., Farr, J. N., Tchkonina, T., & Kirkland, J. L. (2020). The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 16, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0335-y>
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2009). Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 87, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/jnr.22054>
- Kim, Y., Kim, E. K., Chey, Y., Song, M. J., & Jang, H. H. (2023). Targeted Protein Degradation: Principles and Applications of the Proteasome. In *Cells* (Vol. 12, Issue 14). <https://doi.org/10.3390/cells12141846>
- Kippin, T. E., Martens, D. J., & Van Der Kooy, D. (2005). p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes and Development*, 19(6). <https://doi.org/10.1101/gad.1272305>

- Kirkland, J. L., & Tchkonian, T. (2017). Cellular Senescence: A Translational Perspective. In *EBioMedicine* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.013>
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the odd science of aging. In *Cell* (Vol. 120, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Kisselev, A. F., & Goldberg, A. L. (2001). Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates. In *Chemistry and Biology* (Vol. 8, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00056-4)
- Kisselev, A. F., & Goldberg, A. L. (2005). Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. In *Methods in Enzymology* (Vol. 398, pp. 364–378). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)98030-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)98030-0)
- Klass, M. R. (1977). Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 6(C). [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0047-6374(77)90043-4)
- Kloetzel, P. M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: Functional interplay between proteasomes and TPPII. In *Nature Immunology* (Vol. 5, Issue 7, pp. 661–669). Nat Immunol. <https://doi.org/10.1038/ni1090>
- Kniepert, A., & Groettrup, M. (2014). The unique functions of tissue-specific proteasomes. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 39, Issue 1, pp. 17–24). Trends Biochem Sci. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.10.004>
- Koizumi, S., Irie, T., Hirayama, S., Sakurai, Y., Yashiroda, H., Naguro, I., Ichijo, H., Hamazaki, J., & Murata, S. (2016). The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. *ELife*, 5(AUGUST). <https://doi.org/10.7554/eLife.18357>
- Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? In *EBioMedicine* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020>

- Korovila, I., Hugo, M., Castro, J. P., Weber, D., Höhn, A., Grune, T., & Jung, T. (2017). Proteostasis, oxidative stress and aging. In *Redox Biology* (Vol. 13, pp. 550–567). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.008>
- Koufaki, M., Fotopoulou, T., Kapetanou, M., Heropoulos, G. A., Gonos, E. S., & Chondrogianni, N. (2014). Microwave-assisted synthesis of 3,5-disubstituted isoxazoles and evaluation of their anti-ageing activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.046>
- Koufaki, M., Tsatsaroni, A., Alexi, X., Guerrand, H., Zerva, S., & Alexis, M. N. (2011). Isoxazole substituted chromans against oxidative stress-induced neuronal damage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(16). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.074>
- Kriegenburg, F., Poulsen, E. G., Koch, A., Krüger, E., & Hartmann-Petersen, R. (2011). Redox control of the ubiquitin-proteasome system: From molecular mechanisms to functional significance. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 15, Issue 8, pp. 2265–2299). <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3590>
- Kruegel, U., Robison, B., Dange, T., Kahlert, G., Delaney, J. R., Kotireddy, S., Tsuchiya, M., Tsuchiyama, S., Murakami, C. J., Schleit, J., Sutphin, G., Carr, D., Tar, K., Dittmar, G., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K., & Schmidt, M. (2011). Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002253>
- Kulichkova, V. A., Artamonova, T. O., Lyublinskaya, O. G., Khodorkovskii, M. A., Tomilin, A. N., & Tsimokha, A. S. (2017). Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes. *Oncotarget*, 8(60). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22230>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113(20). <https://doi.org/10.1242/jcs.113.20.3613>
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2003). Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the

- Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8786–8794. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8786-8794.2003>
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem*, 84, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259). <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagoumtzi, S. M., & Chondrogianni, N. (2021). Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 171, 169–190. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.05.003>
- LaPak, K. M., & Burd, C. E. (2014). The molecular balancing act of p16ink4a in cancer and aging. In *Molecular Cancer Research* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0350>
- Lattanzi, G., Ortolani, M., Columbaro, M., Prencipe, S., Mattioli, E., Lanzarini, C., Maraldi, N. M., Cenni, V., Garagnani, P., Salvioli, S., Storci, G., Bonafè, M., Capanni, C., & Franceschi, C. (2014). Lamins are rapamycin targets that impact human longevity: A study in centenarians. *Journal of Cell Science*, 127(1). <https://doi.org/10.1242/jcs.133983>
- Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Carillo, S., Guiraud, I., Ouali, A., Dutaud, D., Aubry, L., Rossi, J. F., & Bureau, J. P. (2001). Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer*, 92(10). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20011115\)92:10<2493::AID-CNCR1599>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20011115)92:10<2493::AID-CNCR1599>3.0.CO;2-F)
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>

- Lee, S. J., Cho, H. J., & Ryu, J. H. (2021). Innate Immunity and Cell Death in Alzheimer's Disease. In *ASN Neuro* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1177/17590914211051908>
- Lefaki, M., Papaevgeniou, N., & Chondrogianni, N. (2017). Redox regulation of proteasome function. In *Redox Biology* (Vol. 13, pp. 452–458). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.005>
- Li, G., Gong, J., Liu, J., Liu, J., Li, H., Hsu, A. L., Liu, J., & Shawn Xu, X. Z. (2019). Genetic and pharmacological interventions in the aging motor nervous system slow motor aging and extend life span in *C. elegans*. *Science Advances*, 5(1). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau5041>
- Li, S., Armstrong, C. M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P. O., Han, J. D. J., Chesneau, A., Hao, T., Goldberg, D. S., Li, N., Martinez, M., Rual, J. F., Lamesch, P., Xu, L., Tewari, M., Wong, S. L., Zhang, L. V., ... Vidal, M. (2004). A Map of the Interactome Network of the Metazoan *C. elegans*. *Science*, 303(5657), 540–543. <https://doi.org/10.1126/science.1091403>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2007 2:2, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liang, J. J. H., McKinnon, I. A., & Rankin, C. H. (2020). The contribution of *C. elegans* neurogenetics to understanding neurodegenerative diseases. In *Journal of Neurogenetics* (Vol. 34, Issues 3–4). <https://doi.org/10.1080/01677063.2020.1803302>
- Liao, V. H. C., Yu, C. W., Chu, Y. J., Li, W. H., Hsieh, Y. C., & Wang, T. T. (2011). Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(10). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.07.008>
- Lieke, T., Zhang, X., Steinberg, C. E. W., & Pan, B. (2018). Overlooked Risks of Biochars: Persistent Free Radicals trigger Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science and Technology*, 52(14). <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01338>

- Lin, Y., Lin, C., Cao, Y., & Chen, Y. (2023). *Caenorhabditis elegans* as an in vivo model for the identification of natural antioxidants with anti-aging actions. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 167). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115594>
- Lindsten, K., de Vrij, F. M., Verhoef, L. G., Fischer, D. F., van Leeuwen, F. W., Hol, E. M., Masucci, M. G., & Dantuma, N. P. (2002). Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol*, 157(3), 417–427. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111034>
- Link, C. D., Fonte, V., Roberts, C. M., Hiester, B., Silverman, M. A., & Stein, G. H. (2008). The  $\beta$  amyloid peptide can act as a modular aggregation domain. *Neurobiology of Disease*, 32(3), 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.003>
- Link, C. D., Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., Wood, D. E., & Sahagan, B. G. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 397–413. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00224-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00224-5)
- Liu, W., Lin, H., Mao, Z., Zhang, L., Bao, K., Jiang, B., Xia, C., Li, W., Hu, Z., & Li, J. (2020). Verapamil extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* by inhibiting calcineurin activity and promoting autophagy. *Aging*, 12(6). <https://doi.org/10.18632/aging.102951>
- Liu, X. P., Goldring, C. E. P., Copple, I. M., Wang, H. Y., Wei, W., Kitteringham, N. R., & Park, B. K. (2007). Extract of *Ginkgo biloba* induces phase 2 genes through Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway. *Life Sciences*, 80(17), 1586–1591. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.034>
- Liu, Y., Hettinger, C. L., 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. <https://doi.org/10.1111/jnc.12647>

- Liu, Y., Liu, X., Zhang, T., Luna, C., Liton, P. B., & Gonzalez, P. (2007). Cytoprotective effects of proteasome  $\beta 5$  subunit overexpression in lens epithelial cells. *Molecular Vision*, 13.
- Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: From birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research*, 26, 869–885. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.86>
- Livneh, I., Kravtsova-Ivantsiv, Y., Braten, O., Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2017). Monoubiquitination joins polyubiquitination as an esteemed proteasomal targeting signal. *BioEssays*, 39. <https://doi.org/10.1002/bies.201700027>
- Lopez Salon, M., Morelli, L., Castano, E. M., Soto, E. F., & Pasquini, J. M. (2000). Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 62(2), 302–310. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20001015\)62:2<302::AID-JNR15>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20001015)62:2<302::AID-JNR15>3.0.CO;2-L)
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6, p. 1194). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. In *Cell* (Vol. 186, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Ma, M., & Liu, Z. L. (2010). Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover YAP1, PDR1, PDR3, RPN4, and HSF1 as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-660>
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>

- Madhu, P., & Mukhopadhyay, S. (2021). Distinct types of amyloid- $\beta$  oligomers displaying diverse neurotoxicity mechanisms in Alzheimer's disease. In *Journal of Cellular Biochemistry* (Vol. 122, Issue 11). <https://doi.org/10.1002/jcb.30141>
- Manasanch, E. E., & Orlowski, R. Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.206>
- 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 Letters*, 450(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00467-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00467-6)
- Marambaud, P., Zhao, H., & Davies, P. (2005). Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem*, 280(45), 37377–37382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508246200>
- Marchionni, S., Sell, C., & Lorenzini, A. (2020). Development and Longevity: Cellular and Molecular Determinants-A Mini-Review. In *Gerontology* (Vol. 66, Issue 3). <https://doi.org/10.1159/000505327>
- Marković, A. K., Torić, J., Barbarić, M., & Brala, C. J. (2019). Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/molecules24102001>
- Martin, G. M., Sprague, C. A., & Epstein, C. J. (1970). Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory Investigation*, 23(1).
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Matilainen, O., Arpalahti, L., Rantanen, V., Hautaniemi, S., & Holmberg, C. I. (2013). Insulin/IGF-1 Signaling Regulates Proteasome Activity through the Deubiquitinating Enzyme UBH-4. *Cell Reports*, 3(6), 1980–1995. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.012>

- Mattson, M. P., Longo, V. D., & Harvie, M. (2017). Impact of intermittent fasting on health and disease processes. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22).
- McNaught, K. S. P., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 179(1), 38–46. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8050>
- Medina, D. X., Caccamo, A., & Oddo, S. (2011). Methylene blue reduces A $\beta$  levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity. *Brain Pathology*, 21(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00430.x>
- Micheli, L., Bertini, L., Bonato, A., Villanova, N., Caruso, C., Caruso, M., Bernini, R., & Tirone, F. (2023). Role of Hydroxytyrosol and Oleuropein in the Prevention of Aging and Related Disorders: Focus on Neurodegeneration, Skeletal Muscle Dysfunction and Gut Microbiota. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nu15071767>
- Miller, H. A., Dean, E. S., Pletcher, S. D., & Leiser, S. F. (2020). Cell non-autonomous regulation of health and longevity. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.62659>
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., & Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12593–12598. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.22.12593>
- Minhas, P. S., Latif-Hernandez, A., McReynolds, M. R., Durairaj, A. S., Wang, Q., Rubin, A., Joshi, A. U., He, J. Q., Gauba, E., Liu, L., Wang, C., Linde, M., Sugiura, Y., Moon, P. K., Majeti, R., Suematsu, M., Mochly-Rosen, D., Weissman, I. L., Longo, F. M., ... Andreasson, K. I. (2021). Restoring metabolism of myeloid cells reverses cognitive decline in ageing. *Nature*, 590(7844). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03160-0>
- Mladenovic Djordjevic, A. N., Kapetanou, M., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Todorovic, S., Athanasopoulou, S., Jovic, M., Prvulovic, M., Taoufik, E., Matsas, R., Kanazir,

- S., & Gonos, E. S. (2021). Pharmacological intervention in a transgenic mouse model improves Alzheimer's-associated pathological phenotype: Involvement of proteasome activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 162, 88–103. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.11.038>
- MM, B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1976.9999>
- Mohamad Kamal, N. S., Safuan, S., Shamsuddin, S., & Foroozandeh, P. (2020). Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. In *European Journal of Cell Biology* (Vol. 99, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151108>
- Mondello, C., Petropoulou, C., Monti, D., Gonos, E. S., Franceschi, C., & Nuzzo, F. (1999). Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Experimental Cell Research*, 248(1). <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4398>
- Morimoto, R. I., & Cuervo, A. M. (2014). Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, S33–S38. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu049>
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H. L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., ... Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
- Motosugi, R., & Murata, S. (2019). Dynamic Regulation of Proteasome Expression. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(MAY), 30. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00030>
- Munkácsy, E., Chocron, E. S., Quintanilla, L., Gendron, C. M., Pletcher, S. D., & Pickering, A. M. (2019). Neuronal-specific proteasome augmentation via Prosβ5 overexpression extends lifespan and reduces age-related cognitive decline. *Aging Cell*, 18(5). <https://doi.org/10.1111/accel.13005>

- Murata, S., Takahama, Y., & Tanaka, K. (2008). Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.002>
- Myeku, N., Clelland, C. L., Emrani, S., Kukushkin, N. V, Yu, W. H., Goldberg, A. L., & Duff, K. E. (2016). Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat Med*, 22(1), 46–53. <https://doi.org/10.1038/nm.4011>
- Necchi, D., Lomoio, S., & Scherini, E. (2011). Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in the cerebellum of aging Ts65Dn mice. *Exp Neurol*, 232(2), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.009>
- Nelson, S., Harris, T. J., Muli, C. S., Maresh, M. E., Baker, B., Smith, C., Neumann, C., Trader, D. J., & Parkinson, E. I. (2024). Discovery and Development of Cyclic Peptide Proteasome Stimulators. *ChemBioChem*, 25(3). <https://doi.org/10.1002/cbic.202300671>
- Nguyen, N. N., Rana, A., Goldman, C., Moore, R., Tai, J., Hong, Y., Shen, J., Walker, D. W., & Hur, J. H. (2019). Proteasome  $\beta 5$  subunit overexpression improves proteostasis during aging and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 9(1), 3170. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39508-4>
- Niture, S. K., Khatri, R., & Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2 - An update. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 66, pp. 36–44). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>
- Nizard, C., Poggioli, S., Heusèle, C., Bulteau, A. L., Moreau, M., Saunois, A., Schnebert, S., Mahé, C., & Friguet, B. (2004). Algae extract protection effect on oxidized protein level in human Stratum corneum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019, 219–222. <https://doi.org/10.1196/annals.1297.036>
- Nizynski, B., Dzwolak, W., & Nieznanski, K. (2017). Amyloidogenesis of Tau protein. *Protein Sci*, 26(11), 2126–2150. <https://doi.org/10.1002/pro.3275>
- Njomen, E., Osmulski, P. A., Jones, C. L., Gaczynska, M., & Tepe, J. J. (2018). Small Molecule Modulation of Proteasome Assembly. *Biochemistry*, 57(28). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00579>

- Njomen, E., & Tepe, J. J. (2019). Proteasome Activation as a New Therapeutic Approach to Target Proteotoxic Disorders. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00101>
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., & Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of dna synthesis using an expression screen. *Experimental Cell Research*, 211(1). <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1063>
- North, B. J., Rosenberg, M. A., Jeganathan, K. B., Hafner, A. V, Michan, S., Dai, J., Baker, D. J., Cen, Y., Wu, L. E., Sauve, A. A., van Deursen, J. M., Rosenzweig, A., & Sinclair, D. A. (2014). SIRT 2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan . *The EMBO Journal*, 33(13). <https://doi.org/10.15252/emj.201386907>
- Oddo, S. (2008). The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 12(2), 363–373. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00276.x>
- Ogrodnik, M., Carlos Acosta, J., Adams, P. D., d'Adda di Fagagna, F., Baker, D. J., Bishop, C. L., Chandra, T., Collado, M., Gil, J., Gorgoulis, V., Gruber, F., Hara, E., Jansen-Dürr, P., Jurk, D., Khosla, S., Kirkland, J. L., Krizhanovsky, V., Minamino, T., Niedernhofer, L. J., ... Demaria, M. (2024). Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation in vivo. *Cell*, 187(16), 4150–4175. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2024.05.059>
- Opoku-Nsiah, K. A., & Gestwicki, J. E. (2018). Aim for the core: suitability of the ubiquitin-independent 20S proteasome as a drug target in neurodegeneration. In *Translational Research* (Vol. 198). <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.05.002>
- Ou, H. L., Hoffmann, R., González-López, C., Doherty, G. J., Korkola, J. E., & Muñoz-Espín, D. (2021). Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection. In *Molecular Oncology* (Vol. 15, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12807>
- Pajares, M., Cuadrado, A., & Rojo, A. I. (2017). Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases. In *Redox Biology* (Vol. 11, pp. 543–553). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.006>

- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G., & Knecht, E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochemical Journal*, 316(2). <https://doi.org/10.1042/bj3160401>
- Panagiotidou, E., Gioran, A., Bano, D., & Chondrogianni, N. (2023). Neuron-specific proteasome activation exerts cell non-autonomous protection against amyloid-beta (A $\beta$ ) proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biology*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102817>
- Papaevgeniou, N., & Chondrogianni, N. (2016). UPS activation in the battle against aging and aggregation-related diseases: An extended review. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1449). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3756-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3756-1_1)
- Papaevgeniou, N., Hoehn, A., Tur, J. A., Klotz, L. O., Grune, T., & Chondrogianni, N. (2019). Sugar-derived AGEs accelerate pharyngeal pumping rate and increase the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Research*, 53(sup1), 1056–1067. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1661403>
- Papaevgeniou, N., Sakellari, M., Jha, S., Tavernarakis, N., Holmberg, C. I., Gonos, E. S., & Chondrogianni, N. (2016). 18 $\alpha$ -Glycyrrhetic acid proteasome activator decelerates aging and Alzheimer's disease progression in *caenorhabditis elegans* and neuronal cultures. *Antioxidants and Redox Signaling*, 25(16). <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6494>
- Park, H. M., Kim, J. A., & Kwak, M. K. (2009). Protection against amyloid beta cytotoxicity by sulforaphane: Role of the proteasome. *Archives of Pharmacal Research*, 32(1). <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1124-2>
- Peixoto, H., Roxo, M., Krstin, S., Röhrig, T., Richling, E., & Wink, M. (2016). An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(6). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05812>
- 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(9), 3033–3036.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.3033>
- Phipps, S. M. O., Berletch, J. B., Andrews, L. G., & Tollefsbol, T. O. (2007). Aging cell culture: Methods and observations. *Methods in Molecular Biology*, 371.  
<https://doi.org/10.1385/1-59745-361-7:9>
- Pickering, A. M., & Davies, K. J. A. (2012). Degradation of damaged proteins: The main function of the 20S proteasome. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 109, pp. 227–248). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397863-9.00006-7>
- Pickering, A. M., Koop, A. L., Teoh, C. Y., Ermak, G., Grune, T., & Davies, K. J. A. (2010). The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochemical Journal*, 432(3), 585–594. <https://doi.org/10.1042/BJ20100878>
- Pickering, A. M., Linder, R. A., Zhang, H., Forman, H. J., & Davies, K. J. A. (2012). Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$  regulator are required for adaptation to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10021–10031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277145>
- Pietsch, K., Saul, N., Chakrabarti, S., Stürzenbaum, S. R., Menzel, R., & Steinberg, C. E. W. (2011). Hormetins, antioxidants and prooxidants: Defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*, 12(4). <https://doi.org/10.1007/s10522-011-9334-7>
- Qian, M. X., Pang, Y., Liu, C. H., Haratake, K., Du, B. Y., Ji, D. Y., Wang, G. F., Zhu, Q. Q., Song, W., Yu, Y., Zhang, X. X., Huang, H. T., Miao, S., Chen, L. Bin, Zhang, Z. H., Liang, Y. N., Liu, S., Cha, H., Yang, D., ... Qiu, X. B. (2013). XAcetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*, 153(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.032>
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0909142>
- Radhakrishnan, S. K., Lee, C. S., Young, P., Beskow, A., Chan, J. Y., & Deshaies, R. J. (2010). Transcription Factor Nrf1 Mediates the Proteasome Recovery Pathway

- after Proteasome Inhibition in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 38(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.029>
- Ragonnaud, E., & Biragyn, A. (2021). Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. In *Immunity and Ageing* (Vol. 18, Issue 1).  
<https://doi.org/10.1186/s12979-020-00213-w>
- Raizen, D., Song, B. M., Trojanowski, N., & You, Y. J. (2012). Methods for measuring pharyngeal behaviors. In *WormBook: the online review of C. elegans biology*.  
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.154.1>
- Ramachandran, K. V., Fu, J. M., Schaffer, T. B., Na, C. H., Delannoy, M., & Margolis, S. S. (2018). Activity-Dependent Degradation of the Nascentome by the Neuronal Membrane Proteasome. *Molecular Cell*, 71(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.013>
- Ramachandran, K. V., & Margolis, S. S. (2017). A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(4). <https://doi.org/10.1038/nsmb.3389>
- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, 130(8).  
<https://doi.org/10.1002/ijc.27316>
- Raynes, R., Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2016). Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine*, 50, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>
- Reeg, S., & Grune, T. (2015). Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 23, Issue 3, pp. 239–255). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6062>
- Regitz, C., Dussling, L. M., & Wenzel, U. (2014). Amyloid-beta (Abeta(1)(-)(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. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400014>

- Regitz, C., Fitzenberger, E., Mahn, F. L., Dussling, L. M., & Wenzel, U. (2016). Resveratrol reduces amyloid-beta (A $\beta$ (1)(-)(4)(2))-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Nutr*, 55(2), 741–747. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0894-1>
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 7(3), 137–152. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2>
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C. L., Ulgherait, M., Hur, J. H., Ansari, W. S., Lo, T., Jones, D. L., & Walker, D. W. (2011). Modulation of longevity and tissue homeostasis by the drosophila PGC-1 homolog. *Cell Metabolism*, 14(5). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.013>
- Restif, C., Ibáñez-Ventoso, C., Vora, M. M., Guo, S., Metaxas, D., & Driscoll, M. (2014). CeleST: Computer Vision Software for Quantitative Analysis of *C. elegans* Swim Behavior Reveals Novel Features of Locomotion. *PLoS Computational Biology*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003702>
- Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Thuren, T., Everett, B., Libby, P., Glynn, R. J., Lorenzatti, A., Krum, H., Varigos, J., Siostrzonek, P., Sinnaeve, P., Fonseca, F., Nicolau, J., Gotcheva, N., Genest, J., Yong, H., Urina-Triana, M., Milicic, D., Cifkova, R., ... Gersh, B. (2017). Effect of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 390(10105). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32247-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32247-X)
- Rivett, A. J., Palmer, A., & Knecht, E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40(8). <https://doi.org/10.1177/40.8.1619280>
- Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J. L., & Ramirez-Tortosa, Mc. (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. In *Food Research International* (Vol. 105). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 192, Issue 4). <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>

- Rodriguez, K. A., Edrey, Y. H., 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(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035890>
- Roichman, A., Elhanati, S., Aon, M. A., Abramovich, I., Di Francesco, A., Shahar, Y., Avivi, M. Y., Shurgi, M., Rubinstein, A., Wiesner, Y., Shuchami, A., Petrover, Z., Lebenthal-Loinger, I., Yaron, O., Lyashkov, A., Ubaida-Mohien, C., Kanfi, Y., Lerrer, B., Fernández-Marcos, P. J., ... Cohen, H. Y. (2021). Restoration of energy homeostasis by SIRT6 extends healthy lifespan. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23545-7>
- Rollins, J. A., Howard, A. C., Dobbins, S. K., Washburn, E. H., & Rogers, A. N. (2017). Assessing health Span in *Caenorhabditis elegans*: Lessons from short-lived mutants. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 72(4). <https://doi.org/10.1093/gerona/glw248>
- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W., & Zlabinger, G. J. (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods*, 156(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90008-H](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90008-H)
- Rousseau, A., & Bertolotti, A. (2016). An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature*, 536(7615). <https://doi.org/10.1038/nature18943>
- Rousseau, A., & Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 697–712. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>
- Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R. J., Narita, M., Pérez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H., & Narita, M. (2013). Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes and Development*, 27(16). <https://doi.org/10.1101/gad.217281.113>
- Saeki, Y. (2017). Ubiquitin recognition by the proteasome. *Journal of Biochemistry*, 161, 113–124. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw091>

- Sahu, I., & Glickman, M. H. (2021). Proteasome in action: Substrate degradation by the 26S proteasome. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 49, Issue 2). <https://doi.org/10.1042/BST20200382>
- Sahu, I., Mali, S. M., Sulkshane, P., Xu, C., Rozenberg, A., Morag, R., Sahoo, M. P., Singh, S. K., Ding, Z., Wang, Y., Day, S., Cong, Y., Kleifeld, O., Brik, A., & Glickman, M. H. (2021). The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26427-0>
- Salazar-Chaparro, A., Kragness, K., Feleciano, D., & Trader, D. J. (2024). AM404 Analogs as Activators of the 20S Isoform of the Human Proteasome. *ChemBioChem*, 25(12), e202400284. <https://doi.org/10.1002/CBIC.202400284>
- Saul, N., Möller, S., Cirulli, F., Berry, A., Luyten, W., & Fuellen, G. (2021). Health and longevity studies in *C. elegans*: the “healthy worm database” reveals strengths, weaknesses and gaps of test compound-based studies. *Biogerontology*, 22(2). <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09913-2>
- Sayed, S. M. A., Siems, K., Schmitz-Linneweber, C., Luyten, W., & Saul, N. (2021). Enhanced Healthspan in *Caenorhabditis elegans* Treated With Extracts From the Traditional Chinese Medicine Plants *Cuscuta chinensis* Lam. and *Eucommia ulmoides* Oliv. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.604435>
- Scharf, A., Rockel, T. D., & Von Mikecz, A. (2007). Localization of proteasomes and proteasomal proteolysis in the mammalian interphase cell nucleus by systematic application of immunocytochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 127(6). <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0266-2>
- Schneider, E. L., & Mitsui, Y. (1976). The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3584>
- Sciorati, C., Gamberale, R., Monno, A., Citterio, L., Lanzani, C., De Lorenzo, R., Ramirez, G. A., Esposito, A., Manunta, P., Manfredi, A. A., & Rovere-Querini, P. (2020). Pharmacological blockade of TNF $\alpha$  prevents sarcopenia and prolongs survival in aging mice. *Aging*, 12(23). <https://doi.org/10.18632/aging.202200>

- Seo, H., Sonntag, K. C., & Isacson, O. (2004). Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Annals of Neurology*, 56(3), 319–328. <https://doi.org/10.1002/ana.20207>
- Sha, Z., & Goldberg, A. L. (2014). Proteasome-mediated processing of Nrfl is essential for coordinate induction of all proteasome subunits and p97. *Current Biology*, 24(14). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.004>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
- Shay, J. W. (2016). Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. In *Cancer Discovery* (Vol. 6, Issue 6). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0062>
- Shim, H. S., Horner, J. W., Wu, C. J., Li, J., Lan, Z. D., Jiang, S., Xu, X., Hsu, W. H., Zal, T., Flores, I. I., Deng, P., Lin, Y. T., Tsai, L. H., Wang, Y. A., & DePinho, R. A. (2021). Telomerase reverse transcriptase preserves neuron survival and cognition in Alzheimer's disease models. *Nature Aging*, 1(12). <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00146-z>
- Shtutman, M., Chang, B. D., Schools, G. P., & Broude, E. V. (2017). Cellular model of p21-induced senescence. *Methods in Molecular Biology*, 1534. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7_3)
- Sin, N., Kyung, B. K., Elofsson, M., Meng, L., Auth, H., Kwok, B. H. B., & Crews, C. M. (1999). Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: A useful tool for understanding proteasome biology. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9(15). [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00376-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00376-5)
- Singh, P. P., Demmitt, B. A., Nath, R. D., & Brunet, A. (2019). The Genetics of Aging: A Vertebrate Perspective. In *Cell* (Vol. 177, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.038>
- Smith, J. R., Venable, S., Roberts, T. W., Metter, E. J., Monticone, R., & Schneider, E. L. (2002). Relationship between in vivo age and in vitro aging: Assessment of 669 cell cultures derived from members of the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 57(6). <https://doi.org/10.1093/gerona/57.6.B239>

- Solis, L. M., Behrens, C., Dong, W., Suraokar, M., Ozburn, N. C., Moran, C. A., Corvalan, A. H., Biswal, S., Swisher, S. G., Bekele, B. N., Minna, J. D., Stewart, D. J., & Wistuba, I. I. (2010). Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clinical Cancer Research*, 16(14). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3352>
- Srivastava, S. (2017). The mitochondrial basis of aging and age-related disorders. In *Genes* (Vol. 8, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/genes8120398>
- Stack, C., Jainuddin, S., Elipenahli, C., Gerges, M., Starkova, N., Starkov, A. A., Jové, M., Portero-Otin, M., Launay, N., Pujol, A., Kaidery, N. A., Thomas, B., Tampellini, D., Flint Beal, M., & Dumont, M. (2014). Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, 23(14). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu080>
- Stadtman, E. R. (1992). Protein Oxidation and Aging. *Science*, 257(5074), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1355616>
- Stadtmueller, B. M., & Hill, C. P. (2011). Proteasome activators. In *Molecular Cell* (Vol. 41, Issue 1, pp. 8–19). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.020>
- Stark, M., & Behl, C. (2014). The Ginkgo biloba extract EGb 761 modulates proteasome activity and polyglutamine protein aggregation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/940186>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. In *WormBook: the online review of C. elegans biology*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Sugawara, T., & Sakamoto, K. (2020). Quercetin enhances motility in aged and heat-stressed *Caenorhabditis elegans* nematodes by modulating both HSF-1 activity, and insulin-like and p38-MAPK signalling. *PLoS ONE*, 15(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238528>
- Suzuki, G., Imura, S., Hosokawa, M., Katsumata, R., Nonaka, T., Hisanaga, S. I., Saeki, Y., & Hasegawa, M. (2020).  $\alpha$ -synuclein strains that cause distinct pathologies differentially inhibit proteasome. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.56825>

- Sykiotis, G. P., & Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. In *Science Signaling* (Vol. 3, Issue 112). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3112re3>
- Szymański, P., Markowicz, M., & Mikiciuk-Olasik, E. (2012). Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms13010427>
- Tain, L. S., Sehlke, R., Jain, C., Chokkalingam, M., Nagaraj, N., Essers, P., Rassner, M., Grönke, S., Froelich, J., Dieterich, C., Mann, M., Alic, N., Beyer, A., & Partridge, L. (2017). A proteomic atlas of insulin signalling reveals tissue-specific mechanisms of longevity assurance. *Molecular Systems Biology*, 13(9). <https://doi.org/10.15252/msb.20177663>
- Takai, H., Smogorzewska, A., & De Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current Biology*, 13(17). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00542-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00542-6)
- Tanaka, K., Yoshimura, T., & Ichihara, A. (1989). Role of Substrate in Reversible Activation of Proteasomes (Multi-Protease Complexes) by Sodium Dodecyl Sulfate1. *The Journal of Biochemistry*, 106(3), 495–500. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122880>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 263(31). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37580-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37580-x)
- Tanigawa, S., Fujii, M., & Hou, D. X. (2007). Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(11), 1690–1703. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.017>
- Thibaut, T. A., Anderson, R. T., & Smith, D. M. (2018). A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03509-0>

- Tian, X., Firsanov, D., Zhang, Z., Cheng, Y., Luo, L., Tomblin, G., Tan, R., Simon, M., Henderson, S., Steffan, J., Goldfarb, A., Tam, J., Zheng, K., Cornwell, A., Johnson, A., Yang, J. N., Mao, Z., Manta, B., Dang, W., ... Gorbunova, V. (2019). SIRT6 Is Responsible for More Efficient DNA Double-Strand Break Repair in Long-Lived Species. *Cell*, 177(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.043>
- Tissenbaum, H. A. (2012). Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 67 A(5). <https://doi.org/10.1093/gerona/gls088>
- Tissenbaum, H. A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. In *Invertebrate Reproduction and Development* (Vol. 59). <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.940470>
- Tiwari, A., & Singh, S. (2021). Computational approaches in drug designing. In *Bioinformatics: Methods and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00010-9>
- Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., Tanaka, K., & Kasahara, M. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *American Journal of Pathology*, 180(3), 963–972. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.012>
- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J. M., Viña, J., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2008). Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice. *Cell*, 135(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.034>
- Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., & Miura, M. (2009). Genetic Evidence Linking Age-Dependent Attenuation of the 26S Proteasome with the Aging Process. *Molecular and Cellular Biology*, 29(4), 1095–1106. <https://doi.org/10.1128/mcb.01227-08>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

- Trader, D. J., Simanski, S., Dickson, P., & Kodadek, T. (2017). Establishment of a suite of assays that support the discovery of proteasome stimulators. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.01.003>
- Tsakiri, E. N., Sykiotis, G. P., Papassideri, I. S., Gorgoulis, V. G., Bohmann, D., & Trougakos, I. P. (2013). Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress. *FASEB Journal*, 27(6). <https://doi.org/10.1096/fj.12-221408>
- Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M., & LaFerla, F. M. (2008). Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging*, 29(11), 1607–1618. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>
- Türker, F., Cook, E. K., & Margolis, S. S. (2021). The proteasome and its role in the nervous system. In *Cell Chemical Biology* (Vol. 28, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.003>
- Uechi, H., Hamazaki, J., & Murata, S. (2014). Characterization of the testis-specific proteasome subunit  $\alpha 4$ s in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558866>
- van Leeuwen, F. W., van Tijn, P., Sonnemans, M. A., Hobo, B., Mann, D. M., Van Broeckhoven, C., Kumar-Singh, S., Cras, P., Leuba, G., Savioz, A., Maat-Schieman, M. L., Yamaguchi, H., Kros, J. M., Kamphorst, W., Hol, E. M., de Vos, R. A., & Fischer, D. F. (2006). Frameshift proteins in autosomal dominant forms of Alzheimer disease and other tauopathies. *Neurology*, 66(2 Suppl 1), S86-92. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000193882.46003.6d>
- Vasilopoulou, M. A., Fotopoulou, T., Papaevgeniou, N., Gioran, A., Papahatjis, D., Calogeropoulou, T., Koufaki, M., & Chondrogianni, N. (2021). A novel bioinspired proteasome activator against aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.200>
- Vasilopoulou, M. A., Gioran, A., Theodoropoulou, M., Koutsaviti, A., Roussis, V., Ioannou, E., & Chondrogianni, N. (2022). Healthspan improvement and anti-

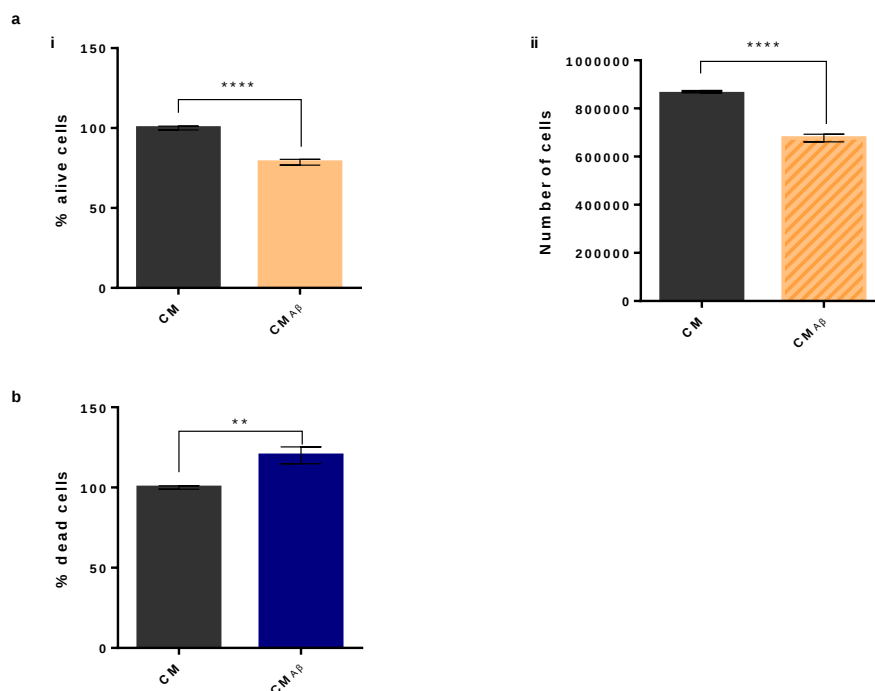
- aggregation effects induced by a marine-derived structural proteasome activator. *Redox Biology*, 56. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102462>
- Vasilopoulou, M. A., Papaevgeniou, N., & Chondrogianni, N. (2022). Proteasome fate in aging and proteinopathies. In *Proteostasis and Proteolysis*. <https://doi.org/10.1201/9781003048138-12>
- Vasilopoulou, M., Ioannou, E., Roussis, V., & Chondrogianni, N. (2021). Modulation of the ubiquitin-proteasome system by marine natural products. *Redox Biology*, 41. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.101897>
- Velagapudi, R., El-Bakoush, A., & Olajide, O. A. (2018). Activation of Nrf2 Pathway Contributes to Neuroprotection by the Dietary Flavonoid Tiliroside. *Molecular Neurobiology*, 55(10). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0975-2>
- Vernace, V. A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2007). Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *The FASEB Journal*, 21(11), 2672–2682. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6751com>
- Vijg, J., & Dong, X. (2020). Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging. In *Cell* (Vol. 182, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.024>
- Vilchez, D., Morante, I., Liu, Z., Douglas, P. M., Merkwirth, C., Rodrigues, A. P. C., Manning, G., & Dillin, A. (2012). RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature*, 489(7415), 263–268. <https://doi.org/10.1038/nature11315>
- Vilchez, D., Saez, I., & Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. In *Nature Communications* (Vol. 5, pp. 1–13). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ncomms6659>
- Wang, L., Wang, M., Hu, J., Shen, W., Hu, J., Yao, Y., Wang, X., Afzal, C. M., Ma, R., & Li, G. (2017). Protective effect of 3H-1, 2-dithiole-3-thione on cellular model of Alzheimer's disease involves Nrf2/ARE signaling pathway. *Eur J Pharmacol*, 795, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.013>
- Wang, N., Wang, E., Wang, R., Muhammad, F., Li, T., Yue, J., Zhou, Y., Zhi, D., & Li, H. (2022). Ursolic acid ameliorates amyloid  $\beta$ -induced pathological symptoms in

- Caenorhabditis elegans by activating the proteasome. *NeuroToxicology*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.12.004>
- Wang, X., Wang, X., Li, L., & Wang, D. (2010). Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400(4), 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.113>
- Wang, X., Yi, K., & Zhao, Y. (2018). Fucoidan inhibits amyloid- $\beta$ -induced toxicity in transgenic: Caenorhabditis elegans by reducing the accumulation of amyloid- $\beta$  and decreasing the production of reactive oxygen species. *Food and Function*, 9(1), 552–560. <https://doi.org/10.1039/c7fo00662d>
- Watanabe, N., & Yamada, S. (1996). Activation of 20S proteasomes from spinach leaves by fatty acids. *Plant and Cell Physiology*, 37(2). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028925>
- Webb, A. E., & Brunet, A. (2014). FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 39, Issue 4, pp. 159–169). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.003>
- Wilkinson, D. S., Taylor, R. C., & Dillin, A. (2012). Analysis of Aging in Caenorhabditis elegans. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 107). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394620-1.00012-6>
- Willcox, B. J., Donlon, T. A., He, Q., Chen, R., Grove, J. S., Yano, K., Masaki, K. H., Willcox, D. C., Rodriguez, B., & Curb, J. D. (2008). FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37). <https://doi.org/10.1073/pnas.0801030105>
- Wilmanski, T., Diener, C., Rappaport, N., Patwardhan, S., Wiedrick, J., Lapidus, J., Earls, J. C., Zimmer, A., Glusman, G., Robinson, M., Yurkovich, J. T., Kado, D. M., Cauley, J. A., Zmuda, J., Lane, N. E., Magis, A. T., Lovejoy, J. C., Hood, L., Gibbons, S. M., ... Price, N. D. (2021). Gut microbiome pattern reflects healthy ageing and predicts survival in humans. *Nature Metabolism*, 3(2). <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00348-0>

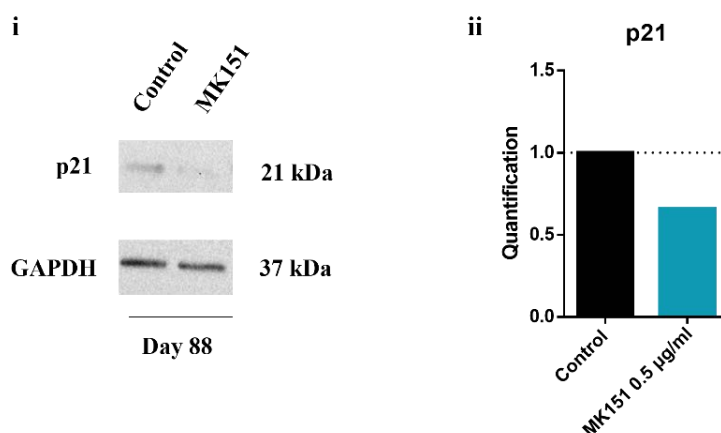
- Xie, Y., & Varshavsky, A. (2001). RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.071022298>
- Xiong, H., Pears, C., & Woollard, A. (2017). An enhanced C. elegans based platform for toxicity assessment. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10454-3>
- Yu, H., & Matouschek, A. (2017). Recognition of Client Proteins by the Proteasome. *Annual Review of Biophysics*, 46, 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033719>
- Yu, Q., Wang, Z., Tu, Y., Cao, Y., Zhu, H., Shao, J., Zhuang, R., Zhou, Y., & Zhang, J. (2024). Proteasome activation: A novel strategy for targeting undruggable intrinsically disordered proteins. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 145). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107217>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, M., Cai, F., Zhang, S., Zhang, S., & Song, W. (2014). Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) delays Alzheimer's progression in vivo. *Sci Rep*, 4, 7298. <https://doi.org/10.1038/srep07298>
- Zhang, W., Qu, J., Liu, G. H., & Belmonte, J. C. I. (2020). The ageing epigenome and its rejuvenation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0204-5>
- Zhang, X., Fu, Z., Meng, L., He, M., & Zhang, Z. (2018). The Early Events That Initiate beta-Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 10, 359. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00359>
- Zhang, Y., Du, Y., Le, W., Wang, K., Kieffer, N., & Zhang, J. (2011). Redox control of the survival of healthy and diseased cells. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 15, Issue 11, pp. 2867–2902). <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3685>

- Zheng, C., Geetha, T., & Babu, J. R. (2014). Failure of ubiquitin proteasome system: Risk for neurodegenerative diseases. In *Neurodegenerative Diseases* (Vol. 14, Issue 4, pp. 161–175). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000367694>
- Zheng, N., & Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 129–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014922>
- Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H., & Wang, X. (2016). Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 8, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00303>
- Zhong, L., & Belote, J. M. (2007). The testis-specific proteasome subunit Pro $\alpha$ 6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development*, 134(19). <https://doi.org/10.1242/dev.004770>
- Zhu, A., Ji, Z., Zhao, J., Zhang, W., Sun, Y., Zhang, T., Gao, S., Li, G., & Wang, Q. (2019). Effect of Euphorbia factor L1 on intestinal barrier impairment and defecation dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153102>

## 6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

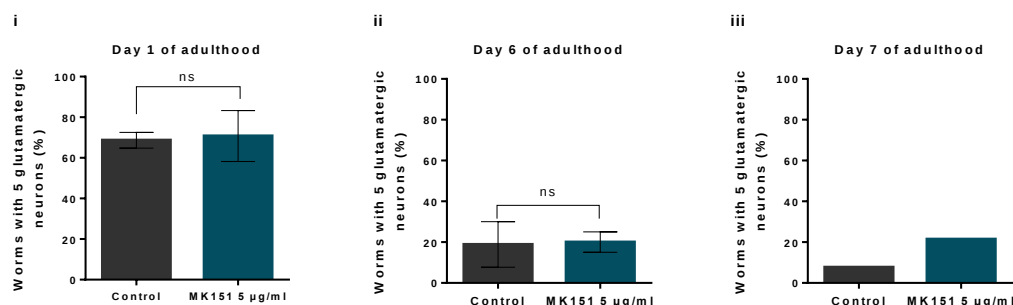


**Εικόνα 6.1:** Η ζωτικότητα των νευροβλαστικών κυττάρων *SH-SY5Y* που εκτίθενται σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει Αβ πεπτίδιο ( $CM_{A\beta}$ ) μειώνεται στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκτίθενται στο αντίστοιχο μέσο καλλιέργειας που δεν περιέχει Αβ πεπτίδια ( $CM$ ). (a) (i) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) της κυτταρικής επιβίωσης και (ii) ο αριθμός των ζωντανών νευροβλαστικών κυττάρων *SH-SY5Y* του ανθρώπου που εκτέθηκαν σε μέσο που περιέχει ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο ( $CM_{A\beta}$ ) και στο το αντίστοιχο control ( $CM$ ). Η μέση τιμή (i) του ποσοστού (%) και (ii) του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στις control καλλιέργειες ( $CM$ ) τέθηκαν ως 100%. (b) Παρουσιάζεται το ποσοστό (%) του κυτταρικού θανάτου των νευροβλαστικών κυττάρων *SH-SY5Y* του ανθρώπου που εκτέθηκαν σε μέσο που περιέχει ανθρώπινο Αβ πεπτίδιο ( $CM_{A\beta}$ ) και στο αντίστοιχο control ( $CM$ ). Τα *p*-value προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω *t*-test.



**Εικόνα 6.2:** (i) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western και (ii) ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης *p21* στους *HFL-1* ινοβλάστες που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 0.5

**μg/ml MK151 και στο διαλύτη DMSO (control) για 88 συνεχόμενες ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης της p21 στους HFL-1 εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ανθρώπου που εκτέθηκαν στο διαλύτη DMSO (control) τέθηκαν αυθαίρετα στην τιμή 1.0. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναγράφονται δεξιά από το ανοσοαποτύπωμα..**



**Εικόνα 6.3: Η ένωση MK151 προστατεύει από το νευροεκφυλισμό που προκαλείται από το Αβ<sub>1-42</sub> πεπτίδιο στους γλουταματεργικούς νευρώνες του διαγονιδιακού στελέχους UA198. (i) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την πρώτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 1 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό 70.75 ± 12.52%, ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml MK151 διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό 68.68 ± 3.86%. (ii) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την έκτη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 6 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό 18.85 ± 11.16%, ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml MK151 σε ποσοστό 20.00 ± 5.00%. (iii) Οι σκώληκες-μάρτυρες που εκτέθηκαν στον οργανικό διαλύτη DMSO (control) από τη στιγμή που γεννήθηκαν έως την έβδομη ημέρα της ενήλικης ζωής τους (Day 7 of adulthood) διατήρησαν τους 5 οπίσθιους γλουταματεργικούς νευρώνες σε ποσοστό 7.69%, ενώ οι σκώληκες που εκτέθηκαν σε 5 μg/ml MK151 σε ποσοστό 21.42%. Το p-value προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω t-test.**