



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

ΕΛΕΝΗ ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ - 2025

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ »**

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: **Ελένη Δερμιτζάκη**

Πατρώνυμο: **Ελευθέριος**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: **Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Εργαστήριο: **Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα,
Ελλάδα**

**«Evaluation of alterations in heat shock proteins expression upon aging induction
in muscle cells in culture»**

Name of student: **Eleni Dermitzaki**

Father's name: **Eleftherios**

Supervisor Professor: **Psarra Anna-Maria**

Laboratory: **Structural and Functional Biochemistry, Department of Biochemistry
and Biotechnology, University of Thessaly, School of Health Sciences, Larissa,
Greece**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ: Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα,
Ελλάδα

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα,
Ελλάδα

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας - Μεταβολισμού, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Λάρισα, Ελλάδα

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	Γήρανση των μυϊκών κυττάρων	7
1.1.1	Εισαγωγή στην κυτταρική γήρανση ως φυσιολογική διεργασία	7
1.1.2	Τύποι μυϊκών κυττάρων και ρόλος μυοβλαστών	8
1.2	Ο ρόλος και η σημασία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ	9
1.2.1	Η δράση πρωτεϊνών θερμικού σοκ στα κύτταρα	9
1.2.2	Ρόλος, λειτουργία και δομή της Hsp60	10
1.2.3	Hsp60 σε ηλικιακά σχετιζόμενα νοσήματα	11
1.2.4	Ρόλος και λειτουργία της Hsp70	12
1.2.5	Δομή και διαμορφώσεις της Hsp70	13
1.2.6	Αλλοστερικός μηχανισμός δράσης της Hsp70	14
1.2.7	Ρόλος των J-πρωτεϊνών στην εξειδίκευση των Hsp70	16
1.2.8	Ρόλος και λειτουργία της Hsp90	16
1.2.9	Ρόλος των Hsp90 σε παθολογικές καταστάσεις	17
1.2.10	Ο ρόλος της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH) και η σύνδεσή της με την Hsp70	18
1.3	Επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης με D- γαλακτόζη	20
1.3.1	Η D- γαλακτόζη ως επαγωγέας γήρανσης	20
1.3.2	Βιοχημικές μεταβολές στο μοντέλο κυτταρικής γήρανσης σε μυοβλάστες C2C12 από D- γαλακτόζη	21
1.3.3	Επαγωγή κυτταρικής γήρανσης σε μυοβλάστες C2C12 και μείωση ικανότητας διαφοροποίησης	23
1.4	Σχέση γήρανσης μυϊκών κυττάρων με μεταβολές επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ	24
1.4.1	Σύνδεση κυτταρικής γήρανσης με έκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ	24
1.4.2	Πρωτεΐνες θερμικού σοκ ως ρυθμιστές κυτταρικής γήρανσης	25
1.5	Στόχος -Σκοπός της πτυχιακής εργασίας	26
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
2.1	Οργανολογία	26
2.2	Υλικά	27
2.2.1	Χημικά/ Αντιδραστήρια	27
2.2.2	Αναλώσιμα υλικά	28
2.2.3	Παρασκευή διαλυμάτων	29
2.2.4	Αντισώματα	30

2.2.5 Κυτταρικές σειρές	31
2.2.6 Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιιεργειών	31
2.3 Μεθόδοι και τεχνικές	31
2.3.1 Βιοχημικές τεχνικές εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών	31
2.3.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων	31
2.3.1.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων	32
2.3.1.3 Επίστρωση κυττάρων	32
2.3.1.4 Χρωματομετρική μέθοδος MTT	33
2.3.1.5 Προσθήκη ουσιών	34
2.3.2 Βιοχημικές τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών	34
2.3.2.1 Συλλογή Κυττάρων/ Harvest	34
2.3.2.2 Λύση κυττάρων	34
2.3.2.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με μέθοδο Bradford και προετοιμασία δειγμάτων	34
2.3.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες	35
2.3.2.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)	35
2.3.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1 Διερεύνηση της κυτταρικής ανάπτυξης μυοβλαστών C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες.	37
3.2 Διερεύνηση των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp70 σε μυοβλάστες C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες.	39
3.3 Διερεύνηση των επιπέδων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH) σε μυοβλάστες C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες.	41
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
6. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια θεμελιώδη βιολογική διεργασία, στην οποία τα κύτταρα εισέρχονται σε μόνιμη παύση του κυτταρικού κύκλου, ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες στρες. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, διερευνώνται τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, με έμφαση στην Hsp70, κατά την επαγωγή γήρανσης μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins - Hsp), γνωστές και ως μοριακές συνοδοί, εμπλέκονται στην αναδίπλωση, σταθεροποίηση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Η έκφρασή τους επάγεται σε συνθήκες κυτταρικής καταπόνησης και διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε διεργασίες όπως το οξειδωτικό στρες, η απόπτωση, και η κυτταρική γήρανση. Για την προσομοίωση της κυτταρικής γήρανσης, αξιοποιήθηκαν μυοβλάστες C2C12 οι οποίοι επωάζονται με D-γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες. Η συγκεκριμένη ουσία δρα ως επαγωγέας της κυτταρικής γήρανσης, προκαλώντας αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οξειδωτικού στρες και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.

Αρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι η διερεύνηση της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων που έχουν επωαστεί με D-γαλακτόζη για 24 ώρες, μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών Western Blot, διερευνάται η μεταβαλλόμενη έκφραση της Hsp70 και της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH), ενός ενζύμου-κλειδί για τη μιτοχονδριακή λειτουργία και την κυτταρική επιβίωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι συγκεντρώσεις της D-γαλακτόζης που μειώνουν τα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 40% είναι 30mg/ml και 40mg/ml. Οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της ουσίας ενδιαφέροντος επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετώνται. Αναλυτικότερα, η επώαση με D-γαλακτόζη για 48 ώρες μείωσε τα επίπεδα της Hsp70 κατά 80%, πιθανώς υποδεικνύοντας την απενεργοποίηση των μηχανισμών διατήρησης της σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Όσον αφορά την SDH καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασής της, στοιχείο που υποδηλώνει αύξηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας ή του αριθμού μιτοχονδρίων, παρατήρηση που συνάδει με παρατηρήσεις σε ασπόνδυλα. Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αναδεικνύει την ευαισθησία των μυϊκών κυττάρων στην επίδραση της D-γαλακτόζης, που αποτελεί παράγοντα επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης, καθώς και την σημασία των Hsp70 και SDH ως δείκτες της μιτοχονδριακής και κυτταρικής ακεραιότητας στην κυτταρική γήρανση. Η βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν στην κυτταρική γήρανση, ενδέχεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση χρόνιων και ηλικιακά σχετιζόμενων νοσημάτων.

Λέξεις κλειδιά: Κυτταρική γήρανση, Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp70), D-γαλακτόζη, Οξειδωτικό στρες, Μυοβλάστες C2C12, SDH, Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, Κυτταρική βιωσιμότητα, Western blot, Δοκιμασία MTT.

ABSTRACT

Cellular senescence is a fundamental biological process in which cells enter a permanent stop of the cell cycle in response to various stress factors. This thesis investigates the expression levels of Heat Shock Proteins, with main focus on Hsp70, during induction of aging in cultured muscle cells. Heat Shock Proteins (Hsp), also known as molecular chaperones, are involved in the folding, stabilization and degradation of proteins. Their expression is upregulated under conditions of cellular stress and they play an important role in processes such as oxidative stress, apoptosis and cellular senescence. To stimulate cellular senescence, C2C12 myoblasts were treated with D- galactose for 24 and 48 hours. This compound is known to induce cellular aging by increasing reactive oxygen species (ROS), promoting oxidative stress and causing mitochondrial dysfunction.

The primary aim of this thesis was to evaluate the impact on cellular proliferation of cells incubated with D-galactose, using the MTT assay. Following, the Western Blot method was used to examine changes in the expression levels of Hsp70 and succinate dehydrogenase (SDH), an enzyme critical for mitochondrial function and cellular survival. The results showed that D-galactose concentrations of 30 mg/ml and 40 mg/ml effectively reduced cell viability by 40%. These concentrations also induced significant changes in the expression of the studied proteins. Specifically, an incubation of 48 hours led to a decrease in Hsp70 expression by 80%, possibly indicating loss of proper protein folding capacity. In contrast, SDH expression was increased, suggesting enhanced mitochondrial function or mitochondrial number, an observation consistent with findings in invertebrates. In conclusion, this study highlights the sensitivity of muscle cells to D-galactose, inducer of cellular senescence, and the significance of Hsp70 and SDH as indicators of mitochondrial and cellular viability in cellular senescence. A deeper understanding of the mechanisms involved in cellular aging may contribute to the development of new therapeutic strategies for chronic and age-related diseases.

Key words: Cellular senescence, Heat Shock Proteins (Hsp70), D-galactose, Oxidative stress, Myoblasts C2C12, SDH, Mitochondrial dysfunction, Cell viability, Western Blot, MTT assay.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γήρανση των μυϊκών κυττάρων

1.1.1 Εισαγωγή στην κυτταρική γήρανση ως φυσιολογική διεργασία

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια θεμελιώδη βιολογική διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο υπόκειται σε μόνιμη παύση της κυτταρικής διαίρεσης, ως απόκριση σε διάφορα είδη κυτταρικού στρες. Αποτελεί έναν εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό προστασίας των κυττάρων με στόχο να αποφευχθεί η συσσώρευση μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό και η εν δυνάμει καρκινογένεση. Τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται σε διάφορους ιστούς και όργανα και συμμετέχουν σε διαφορετικές φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις (Roger et al., 2021). Η πρώτη αναφορά αυτού του φαινομένου χρονολογείται το 1960 από τους Hayflick και Moorhead, οι οποίοι παρατήρησαν ότι η καλλιέργεια ανθρώπινων διπλοειδών κυττάρων έφτανε σε μέγιστο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων πριν διακοπεί οριστικά η ανάπτυξή τους (Calcinotto et al., 2019).

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να οφείλεται τόσο σε ενδογενείς όσο και σε εξωγενείς παράγοντες. Ένας βασικός ενδογενής μηχανισμός, είναι η σταδιακή βράχυνση των τελομερών που ορίζεται ως γήρανση λόγω αντιγραφής (replicative senescence) (Courtois-Cox et al., 2008). Λειτουργεί ως μηχανισμός προστασίας των κυττάρων από τη συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό και συμβάλλει στην διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος (Calcinotto et al., 2019). Ωστόσο, η κυτταρική γήρανση μπορεί να επέλθει και ως αποτέλεσμα εξωγενών παραγόντων όπως το οξειδωτικό στρες, η έκθεση σε ακτινοβολία ή η δράση ογκογονιδίων. Σε αυτή την περίπτωση, ορίζεται ως πρόωρη κυτταρική γήρανση (premature senescence) και δεν σχετίζεται με την αντιγραφή, αλλά με περιβαλλοντικούς και μεταλλαξιγόνους παράγοντες που ενεργοποιούν την κυτταρική απόκριση σε στρες (Serrano et al., 1997).

Τα γηρασμένα κύτταρα συνήθως χαρακτηρίζονται από μορφολογικές αλλοιώσεις στο σχήμα και μέγεθος, αυξημένη οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών και εστίες βλάβης του DNA. Επιπλέον, μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόκριση σε στρες και ουσιών όπως προφλεγμονώδεις και πρωτεολυτικοί παράγοντες, αποτελούν τον εκκριτικό φαινότυπο της κυτταρικής γήρανσης, γνωστό ως SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) (Roger et al., 2021). Συνεπώς, τα γηρασμένα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά και ικανά να εκκρίνουν παράγοντες που επηρεάζουν το περιβάλλον τους με διάφορους τρόπους.

1.1.2 Τύποι μυϊκών κυττάρων και ρόλος μυοβλαστών

Τα μυϊκά κύτταρα αποτελούν εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους που έχουν σχεδιαστεί για την πραγματοποίηση συσπάσεων που επιτρέπουν την σωματική κίνηση και ρυθμίζουν ζωτικές λειτουργίες. Στα θηλαστικά, διακρίνονται σε 3 τύπους: τα σκελετικά, καρδιακά και λεία μυϊκά κύτταρα (Sweeney & Hammers, 2018).

Οι σκελετικού μύες είναι υπεύθυνοι για την εκούσια κίνηση του σκελετού και των αρθρώσεων και είναι προσκολλημένοι στα οστά. Ο καρδιακός μυς αποτελεί το μυϊκό τοίχωμα της καρδιάς και είναι υπεύθυνος για την κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, η λειτουργία του πραγματοποιείται ακούσια. Ο σκελετικός και ο καρδιακός μυς αναφέρονται ως γραμμωτοί μύες λόγω της χαρακτηριστικής τους εμφάνισης στο οπτικό μικροσκόπιο που οφείλεται στην εσωτερική δομή επαναλαμβανόμενων σαρκομερίων που σχηματίζουν τα νημάτια ακτίνης και μυοσίνης. Τέλος, οι λείοι μύες συναντώνται στο εσωτερικό τοίχωμα διάφορων οργάνων όπως η μήτρα και τα όργανα του γαστρεντερικού συστήματος. Αξιοποιούν την συνεργασία ακτίνης και μυοσίνης για να πραγματοποιήσουν συσπάσεις και ρυθμίζουν ακούσιες λειτουργίες (Sweeney & Hammers, 2018).

Οι μυοβλάστες αποτελούν πρόδρομα μονοπύρρηνα κύτταρα των σκελετικών μυών, με δυνατότητα διαφοροποίησης σε ώριμα σκελετικά μυϊκά κύτταρα. Σε φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας η οποία διακόπτεται σε περίπτωση τραυματισμού και ανάγκης επούλωσης του μυϊκού ιστού. Σε αυτή την περίπτωση, ενεργοποιούνται από τους μεταγραφικούς παράγοντες MYOD1 (MyoD) και MYF5 και πολλαπλασιάζονται ώστε να αυξηθεί ο μυοβλαστικός πληθυσμός (Sin et al., 2016). Κρίσιμο στάδιο για την διαφοροποίησή τους, είναι η παραγωγή της μυογενίνης, μιας πρωτεΐνης απαραίτητης για την σύντηξη των μυοβλαστών σε πολυπύρρηνα κύτταρα, που ονομάζονται μυοσωλήνες. Αυτά, είναι εξαιρετικά μεταβολικά ενεργά κύτταρα που αναπτύσσονται περαιτέρω και δίνουν στην συνέχεια τις μυϊκές ίνες (Sin et al., 2016).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, αξιοποιείται η κυτταρική σειρά μυοβλαστών C2C12, η οποία προέρχεται από μυϊκό ιστό ποντικών και αποτελεί ένα αξιόπιστο μοντέλο για την μελέτη της επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης. Αυτό, καθώς οι μυοβλάστες της κυτταρικής σειράς C2C12 μπορούν να υποστούν δεκάδες κυτταρικούς διπλασιασμούς χωρίς να εμφανίζουν σημαντικές αλλοιώσεις στην ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό ή διαφοροποίηση (Kamal, Joannis, & Parise, 2023).

1.2 Ο ρόλος και η σημασία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ

1.2.1 Η δράση πρωτεϊνών θερμικού σοκ στα κύτταρα

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, (Heat Shock Proteins, Hsp) γνωστές και ως μοριακοί συνοδοί, είναι μια εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια μορίων με κύριο ρόλο την διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης εντός των κυττάρων. Κύριος ρόλος τους είναι η διευκόλυνση ορθής αναδίπλωσης άλλων πρωτεϊνών, καθώς και η απομάκρυνση εσφαλμένων πρωτεϊνικών δομών, συνεπώς έχουν κυτταροπροστατευτικό ρόλο. Η έκφρασή τους επάγεται από στρεσογόνες συνθήκες όπως θερμότητα, τοξικές ουσίες, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και οξειδωτικούς παράγοντες (Singh et al., 2024).

Παρότι αρχικά θεωρήθηκε ότι η έκφρασή τους είναι αποκλειστικά ενδοκυτταρική, αργότερα αποδείχθηκε ότι ορισμένες Hsp εκκρίνονται εξωκυτταρικά ως απόκριση στο στρες και λειτουργούν ως «σήματα κινδύνου». Συγκεκριμένα, ενεργοποιούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλώντας προφλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Τα κυριότερα μέλη της οικογένειας, είναι οι Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, οι οποίες ταξινομούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και οι μικρές Hsp (sHsp). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες, είναι γνωστές ως μοριακοί συνοδοί (chaperons), λόγω της ικανότητάς τους να διασφαλίζουν τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών, ιδιαίτερα σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Επιπλέον, εμπλέκονται σε σημαντικές διεργασίες όπως η απόπτωση, η κυτταρική σηματοδότηση και η ανοσοαπόκριση ενώ έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν και σε παθολογικές καταστάσεις.

Αξίζει να αναφερθεί, επίσης, η εμπλοκή των Hsps σε διάφορα είδη καρκίνου και συγκεκριμένα η αυξημένη έκφραση τους από καρκινικά κύτταρα. Από την μια, η υπερέκφραση των Hsps θεωρείται ότι ευνοεί την επιβίωση του όγκου αφού οδηγεί σε επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε δυσμενείς συνθήκες (υποξία, οξειδωτικό στρες). Από την άλλη, η έκκριση των Hsp στον εξωκυτταρικό χώρο λειτουργεί ως σήμα κινδύνου, με στόχο την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα και την καταστροφή τους. Σε κάθε περίπτωση, ο ρόλος των Hsp στον καρκίνο είναι πολυδιάστατος και απαιτεί περαιτέρω έρευνα για να διασαφηνιστεί με ακρίβεια.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, εξετάζεται η έκφραση της Hsp70 λόγω της εμπλοκής της σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Η μελέτη της έκφρασης της σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης, μπορεί να μας δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό και τους παράγοντες που επηρεάζονται κατά τη γήρανση των μυϊκών κυττάρων, στοχεύοντας στην κατανόηση

του ρόλου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, και της πιθανής αξιοποίησής της στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων.

1.2.2 Ρόλος, λειτουργία και δομή της Hsp60

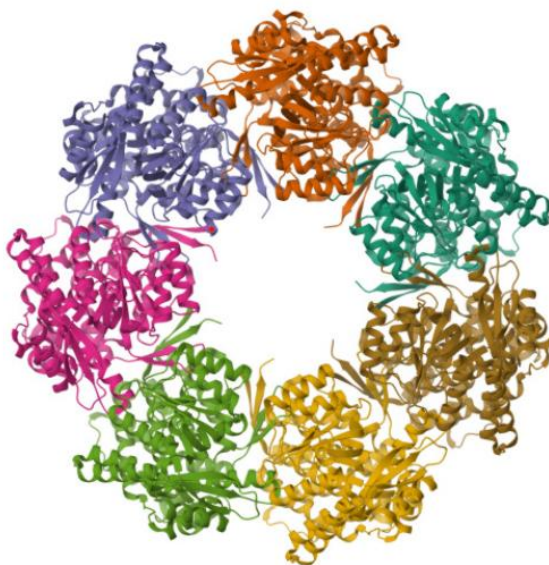
Η Hsp60 (Heat Shock Protein 60) αποτελεί μια από τις πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες θερμικού σοκ που ανήκει στην οικογένεια των μοριακών συνοδών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και την διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους. Εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια (80-85% της συνολικής ποσότητάς της) αλλά και στο κυτταρόπλασμα σε μικρότερο βαθμό (15-20%). Κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA και μεταφέρεται σε υποκυτταρικά οργανίδια εντοπισμού της, όπως τα μιτοχόνδρια αλλά και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Η οικογένεια Hsp60, περιλαμβάνει το βακτηριακής προέλευσης ομόλογο σύμπλοκο GroEl/ES, το ανθρώπινο ομόλογο σύμπλοκο TRiC ή CCT, γνωστό επίσης ως CTT και το μιτοχονδριακής προέλευσης Hsp60 (mtHSP60) (Singh et al., 2024). Επιπλέον, οι Hsp60 χωρίζονται σε δύο ομάδες, τις μοριακές συνοδούς ομάδας I και ομάδας II. Η ομάδα I είναι παρούσα σε βακτήρια (π.χ. GroEl) και σε ευκαρυωτικά οργανίδια (π.χ. mtHsp60) όπως τα μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες. Οι πρωτεΐνες αυτής της ομάδας έχουν κυλινδρική δομή και συνεργάζονται με τον συμπαραγόντα Hsp10 (αντίστοιχο του βακτηριακού GroES). Η ομάδα II, περιλαμβάνει τις μοριακές συνοδούς που συναντώνται στα αρχαία και το κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων (π.χ. CCT). Αυτές, αποτελούνται από οκτώ διαφορετικές υπομονάδες και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 50-68kDa.

Όπως αναφέρθηκε, η Hsp60 συνεργάζεται λειτουργικά με την HSP10 στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, σχηματίζοντας ένα σύστημα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο πρωτεΐνες βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 2 και μοιράζονται έναν κοινό υποκινητή, γεγονός που υποδεικνύει ότι ενδέχεται να μεταφέρθηκαν μαζί στον πυρήνα, σύμφωνα με την θεωρία της ενδοσυμβίωσης που εξηγεί την μιτοχονδριακή προέλευση (Cappello et al., 2013).

Η Hsp60 σχηματίζει ολιγομερή σύμπλοκα που αποτελούνται από δύο επταμερείς δακτυλίους από πανομοιότυπες υπομονάδες (57kDa) (Singh et al., 2024). Αυτές, σχηματίζουν μια κεντρική κοιλότητα που είναι ιδανική για την αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών, αντλώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP. Στην περίπτωση των ευκαρυωτικών κυττάρων, η δομή του συμπλόκου Hsp60-Hsp10 εμφανίζει μια ιδιαιτερότητα: σε φυσιολογικές συνθήκες, η Hsp60 αποτελείται από έναν μονό

επταμερή δακτύλιο, ενώ παρουσία ATP και Hsp10 σχηματίζει τον χαρακτηριστικό διπλό δακτύλιο, ιδανικό για την αναδίπλωση πρωτεϊνών (Hu et al. 2022).



Εικόνα 1: Δομή της ανθρώπινης μιτοχονδριακής Hsp60 (PBD Entry - 9ES3).

Κάθε μια από τις υπομονάδες, αποτελείται από τρεις περιοχές: την ισημερινή περιοχή που διαθέτει περιοχές πρόσδεσης του ATP, την ενδιάμεση περιοχή και τέλος την κορυφαία περιοχή που συνδέεται με το υπόστρωμα ή την GroES στην περίπτωση του συμπλόκου GroEl/ES.

Ως προς την λειτουργία τους, οι Hsp60 συμμετέχουν κυρίως στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών που είναι νεοσυντιθέμενες ή εσφαλμένα αναδιπλωμένες. Επιπλέον, συμμετέχουν στην πρόληψη της δημιουργίας συσσωματωμάτων σε περιόδους κυτταρικού στρες. Επομένως, είναι καίριας σημασίας για τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα και τη διατήρηση της λειτουργικότητας πρωτεϊνικών μορίων. Ωστόσο, οι Hsp60 συνδέονται και με διάφορες άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η απόπτωση, η φλεγμονή και η ανοσολογική απόκριση.

1.2.3 Hsp60 σε ηλικιακά σχετιζόμενα νοσήματα

Σύμφωνα με τους Carpello et al., 2013, η Hsp60 διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό και πολυδιάστατο ρόλο σε παθήσεις που σχετίζονται με την ηλικία. Συγκεκριμένα, ανάλογα με τον τύπο κυτταρικής σειράς, ιστού ή οργανισμού η HSP60 μπορεί να έχει προστατευτικό ή παθολογικό ρόλο. Επιπλέον, ο ρόλος της είναι πιθανόν να επηρεάζεται από την αλληλεπίδρασή της με άλλες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες ή από την έκκρισή της στον εξωκυτταρικό χώρο. Εκεί μπορεί να δρα ως σηματοδοτικό μόριο ή αντιγόνο. Παρά την έλλειψη πληροφοριών που αφορούν τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της Hsp60 και τις μεταμεταφραστικές

τροποποιήσεις που υφίσταται, θεωρείται δεδομένη η συμβολή της στην παθογένεια των καρκινικών όγκων που σχετίζονται με την ηλικία καθώς και η εμπλοκή της στα παρακάτω χρόνια νοσήματα.

Η Hsp60 θεωρείται ανερχόμενος κλινικός δείκτης για την παρακολούθηση της καρδιακής ανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, η υπερέκφρασή της στο κυτταρόπλασμα, η μετακίνηση και εντοπισμός της σε κυτταρικές μεμβράνες και η έκκρισή της από καρδιακά κύτταρα όταν βρίσκονται υπό πίεση, την καθιστούν έναν πιθανό βιοδείκτη για την συγκεκριμένη πάθηση (Carpello et al., 2013).

Επιπλέον, η HSP60 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (ATS), αν και η ακριβή της συμμετοχή παραμένει ανεξιχνίαστη. Ειδικότερα, έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη ATS λόγω της ανοσολογικής απόκρισης απέναντί της. Όμως, απαιτούνται περεταίρω μελέτες για να διασαφηνιστεί η σύνδεση μεταξύ της παραγωγής αντισωμάτων έναντι στην Hsp60 και την ενίσχυση της φλεγμονής που είναι υπεύθυνη για την εδραίωση της νόσου (Carpello et al., 2013).

Τέλος, οι ερευνητές παρατηρούν ότι η υπερέκφραση της Hsp60 και άλλων πρωτεϊνών που παράγονται όταν τα κύτταρα βρίσκονται υπό στρες, αποτελεί έναν μηχανισμό προστασίας του οργανισμού από νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Alzheimer, Parkinson και Huntington (Carpello et al., 2013). Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασής της Hsp60 είναι αυξημένα ακόμα και σε ασθενείς με ήπιο γνωστικό έλλειμμα (mild cognitive impairment), υποδεικνύοντας την πιθανή χρήση της ως πρώιμο βιοδείκτη για πρόωρη διάγνωση της ασθένειας. Αυτό, θα ήταν πολύ χρήσιμο διαγνωστικά καθώς θα επέτρεπε γρήγορη παρέμβαση και αυξημένη αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Carpello et al., 2013).

1.2.4 Ρόλος και λειτουργία της Hsp70

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp70 (70kDa), είναι κύρια συστατικά του κυτταρικού δικτύου μοριακών συνοδών και καταλυτών αναδίπλωσης πρωτεϊνών (Mayer et al. 2005). Βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς και τα υποκυτταρικά διαμερίσματα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης. Συγκεκριμένα, εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η αναδίπλωση και αποικοδόμηση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, διαμεμβρανική μεταφορά τους, ρύθμιση κυτταρικής σηματοδότησης και αντιμετώπιση του κυτταρικού στρες (Kampinga et al., 2010). Επιπλέον, οι Hsp70 λειτουργούν μέσω ενός κύκλου σύνδεσης και απελευθέρωσης υποστρωμάτων ο οποίος περιλαμβάνει την υδρόλυση ενός μορίου ATP και την αλληλεπίδραση της Hsp70 με υφρόφοβες περιοχές μερικώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Kityk et al. 2018).

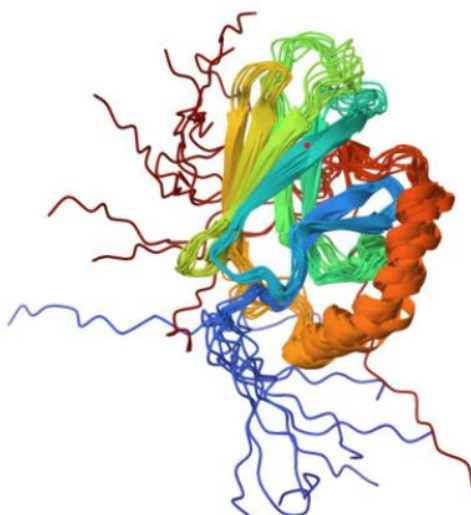
Αναλυτικότερα, οι Hsp70 αναγνωρίζουν πεπτιδικά τμήματα που εκτίθενται κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσής, σύνθεσης ή αποικοδόμησής τους. Στην συνέχεια, οι Hsp70 εναλλάσσονται μεταξύ δύο μορφών: τη μορφή που είναι συνδεδεμένη με το ATP και έχει χαμηλή συγγένεια για την πρωτεΐνη υπόστρωμα και την μορφή που είναι συνδεδεμένη με ADP και έχει υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα. Αυτή η εναλλαγή, ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες J (Hsp40), γνωστές και ως συν-συνοδοί (co-chaperones) οι οποίες κατευθύνουν τις Hsp70 στα υποστρώματά τους και μέσω των παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (nucleotide exchange factors, NEFs), καθορίζεται ο χρόνος της αλληλεπίδρασής τους.

Παρότι οι Hsp70 παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας στη δομή και στη δραστηριότητα, έχουν ποικίλες λειτουργίες. Αυτό, οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες J, οι οποίες είτε προσδένονται στα υποστρώματα και τα παραδίδουν στις Hsp70 είτε προσανατολίζουν τη λειτουργία τους σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Ωστόσο, αξιοσημείωτη είναι η συνεργασία των Hsp70 με άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως οι Hsp100 και Hsp90, γεγονός που υποδεικνύει την πολυπλοκότητα των μονοπατιών αναδίπλωσης πρωτεϊνών (Kampinga et al., 2010).

1.2.5 Δομή και διαμορφώσεις της Hsp70

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp70, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στην αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων και στη διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης και λειτουργούν με έναν ιδιαίτερα συντηρημένο μηχανισμό. Δομικά, αποτελούνται από δύο βασικές επικράτειες. Την επικράτεια σύνδεσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding Domain, NBD) με μοριακό βάρος 45kDa και την επικράτεια σύνδεσης υποστρώματος (Substrate Binding Domain, SBD), 30kDa. Αυτές, συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός συντηρημένου υδρόφοβου συνδέσμου (Interdomain Linker) (Clerico et al., 2019).

Η NBD επικράτεια, εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την ακτίνη και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες οι οποίες συντονίζουν την δέσμευση και υδρόλυση του ATP. Η SBD επικράτεια, απαρτίζεται από την β -sandwich υπομονάδα που περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος και από το α -ελικοειδές καπάκι (α -lid), που ρυθμίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στην περιοχή δέσμευσης (Clerico et al., 2019).



Εικόνα 2: Δομή του Substrate Binding Domain (SBD) της Hsp70, από Homo Sapiens (PDB Entry - 5XI9).

Για να δράσει η Hsp70, απαιτείται εναλλαγή μεταξύ δύο μορφών, της μορφής σύνδεσης με ATP και της μορφής σύνδεσης με ADP οι οποίες καθορίζουν τη συγγένεια της πρωτεΐνης με το πεπτιδικό υποστρώμα (Clerico et al., 2019). Συγκεκριμένα, στην ADP-συνδεδεμένη μορφή, οι επικράτειες NBD και SBD είναι δομικά αποσυνδεδεμένες και οι υπομονάδες βSBD και α-ελικοειδές καπάκι σχηματίζουν μια σταθερή και κλειστή δομή, οδηγώντας σε υψηλή συγγένεια σύνδεσης του υποστρώματος και χαμηλό ρυθμό αποδέσμευσής του. Στην συνέχεια, με τη σύνδεση του ATP αλλάζει η διαμόρφωση της πρωτεΐνης: συγκεκριμένα, αποσυνδέονται η βSBD και το α-ελικοειδές καπάκι και σχηματίζεται δομική επαφή μεταξύ των επικρατειών SBD και NBD. Έτσι, η πρωτεΐνη μεταβαίνει σε μια διαμόρφωση που ευνοεί την ταχεία σύνδεση και απελευθέρωση υποστρώματος, με χαμηλή συγγένεια για αυτό. Συνεπώς, μέσω της υδρόλυσης του ATP και της απελευθέρωσης ADP, η Hsp70 εναλλάσσεται μεταξύ των δύο δυναμικών μορφών και υιοθετεί διαφορετικές διαμορφώσεις που της επιτρέπουν να επιτελέσει τις λειτουργίες της (Clerico et al., 2019).

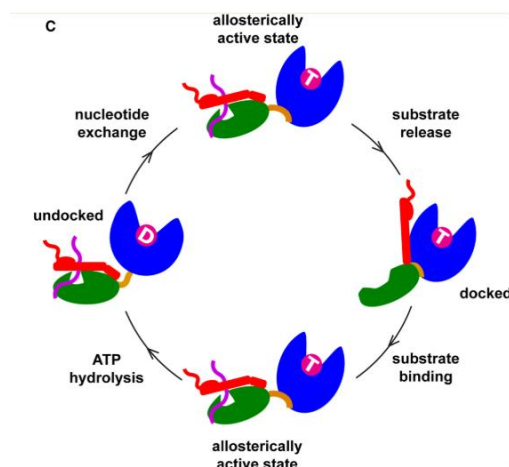
1.2.6 Αλλοστερικός μηχανισμός δράσης της Hsp70

Ιδιαίτερης σημασίας, αποτελεί ο αλλοστερικός μηχανισμός δράσης της Hsp70 που ρυθμίζει τη λειτουργία της ως μοριακή συνοδός. Αναλυτικότερα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο επικρατειών (NBD, SBD), καθορίζεται από δύο συγκεκριμένα δομικά στοιχεία: του α-ελικοειδούς καπακιού (α-lid) και του συντηρημένου υδρόφοβου συνδέσμου (Interdomain Linker). Αυτά τα στοιχεία, επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ των τομέων και ρυθμίζουν τη σύνδεση του

πεπτιδικού υποστρώματος ανάλογα με την δέσμευση του νουκλεοτιδίου ATP ή ADP (Clerico et al., 2019).

Ο σύνδεσμος, αποτελείται από μια υφρόφιλη N- τελική περιοχή και από μια εξαιρετικά συντηρημένη υδρόφοβη αλληλουχία. Στην διαμόρφωση της Hsp70 που είναι συνδεδεμένη με ADP, ο σύνδεσμος είναι ευέλικτος και μπορεί να αλληλεπιδράσει με την SBD επικράτεια, η οποία βρίσκεται σε κατάσταση υψηλής συγγένειας σύνδεσης με το υπόστρωμα. Αντίθετα, στην διαμόρφωση σύνδεσης με ATP, ο σύνδεσμος συνδέεται ισχυρά με την υπομονάδα IIA της επικράτειας NBD, σχηματίζοντας μια δομή αντιπαράλληλου β-κλώνου και ενεργοποιώντας την δράση ATP-άσης. Έτσι, μεταδίδονται αλλοστερικά σήματα που προκαλούν αποσταθεροποίηση της περιοχής δέσμευσης υποστρώματος στην επικράτεια SBD και μειωμένη συγγένεια σύνδεσης.

Έπειτα, το α-ελικοειδές καπάκι (α-lid), αποτελεί επίσης έναν αλλοστερικό ρυθμιστή της Hsp70. Όταν η SBD επικράτεια είναι συνδεδεμένη με ADP και εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με το υπόστρωμα, το α-lid συνδέεται ισχυρά με την υπομονάδα βSBD και σταθεροποιεί το σύμπλοκο. Παρουσία ATP, το α-lid αποσυνδέεται από την βSBD υπομονάδα και αλληλεπιδρά με την επικράτεια NBD, διευκολύνοντας την ταχεία αποδέσμευση του υποστρώματος (Clerico et al., 2019).



Εικόνα 3: Ο αλλοστερικός κύκλος λειτουργίας της Hsp70 (Clerico et al., 2019).

1.2.7 Ρόλος των J-πρωτεϊνών στην εξειδίκευση των Hsp70

Οι J-πρωτεΐνες ή Hsp40, αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια συνοδών πρωτεϊνών, που δρουν συνεργατικά με τις Hsp70, ρυθμίζοντας την λειτουργία τους και την εξειδίκευσή τους. Όλες οι J-πρωτεΐνες διαθέτουν μια κοινή συντηρημένη J-επικράτεια (J-domain), η οποία διεγείρει την δράση ATP-άσης της Hsp70 και ενεργοποιεί την ταχεία αποδέσμευση του πεπτιδικού υποστρώματος. Ωστόσο, τα υπόλοιπα τμήματα των J-πρωτεϊνών, διαφέρουν σημαντικά και προσδίδουν ποικιλομορφία στην δομή και δράση τους, ενώ τις καθιστούν βασικούς ρυθμιστές της εξειδίκευσης των Hsp70 (Kamringa & Craig, 2010).

Αρχικά, οι J-πρωτεΐνες scYdj1 και scSis1 που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα της ζύμης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών. Μάλιστα, κρίνεται απαραίτητη η παρουσία όλων των επικρατειών για να επιτευχθεί η ορθή αναδίπλωση και να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Παράδειγμα, αποτελεί η J-πρωτεΐνη hDNAJB11 που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των θηλαστικών και μεταβιβάζει τα πεπτιδικά υποστρώματα στην Hsp70 για αναδίπλωση (Kamringa & Craig, 2010).

Ωστόσο, αξιοσημείωτος είναι ο ρόλος των J-πρωτεϊνών στην πρόληψη της συσσωμάτωσης άλλων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, οι hDNAJB6 και hDNAJB8 διαθέτουν περιοχές πλούσιες σε σερίνη και έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπουν την συσσωμάτωση πεπτιδίων που περιέχουν γλουταμίνη σε μεγάλη ποσότητα. Σε αντίθετες περιπτώσεις, ορισμένες J-πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την ουβικιτίνη και οδηγούν μετουσιωμένες ή εσφαλμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στην αποικοδόμησή τους (Kamringa & Craig, 2010).

Συνοψίζοντας, οι J-πρωτεΐνες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τόσο την εξειδίκευση όσο και την λειτουργία των Hsp70. Αυτό, καθώς προσδιορίζουν τον τόπο, τον χρόνο και τον τρόπο δράσης τους, μέσω της δομικής και λειτουργικής ποικιλομορφίας τους.

1.2.8 Ρόλος και λειτουργία της Hsp90

Η οικογένεια πρωτεϊνών Hsp90, αποτελείται από εξαιρετικά συντηρημένα μόρια που εξαρτώνται από το ATP και εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπλέον, είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών, δηλαδή της ισορροπίας στην σύνθεση, αναδίπλωση και αποικοδόμησή τους. Εντοπίζονται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, με κυριότερες μορφές την Hsp90α και Hsp90β στο

κυτταρόπλασμα, την GRP94 στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την TRAP1 στα μιτοχόνδρια. Συνδέονται, επίσης, με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως αρκετούς τύπους καρκίνου, ιογενείς λοιμώξεις, φλεγμονές και νευροεκφυλιστικά νοσήματα (Hoter et al., 2018).

Η Hsp90 λειτουργεί ως ομοδιμερές και κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις βασικές και συντηρημένες περιοχές: την N-τελική περιοχή (NTD) που είναι υπεύθυνη για την σύνδεση και υδρόλυση του ATP, την μεσαία περιοχή (MD) για σύνδεση των υποστρωμάτων και την C-τελική περιοχή (CTD), υπεύθυνη για τον διμερισμό της πρωτεΐνης και δέσμευση καλμοδουλίνης. Μια επιπλέον περιοχή συνδέει την N-τελική με την μεσαία, και ονομάζεται «φορτισμένη περιοχή σύνδεσης» (Charged Linker Region). Έχει μεταβλητό μήκος και σύνθεση αμινοξέων και έχει προταθεί ότι αυξάνει την ευελιξία και αποτελεσματικότητα της Hsp90. Συνοψίζοντας, η φαινομενικά απλή πρωτεϊνική δομή, κρύβει τεράστια πολυπλοκότητα λόγω της μοναδικής διαμόρφωσης της και της ποικιλομορφίας των λειτουργιών που παίζει, τόσο εσωτερικά όσο και εξωτερικά του κυττάρου (Hoter et al., 2018).

Η λειτουργία της Hsp90 ρυθμίζεται μέσω τριών κύριων μηχανισμών: την μεταγραφική ρύθμιση, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τις πρωτεΐνες συν-συνοδούς (co-chaperons). Κάθε ένας από αυτούς, παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της Hsp90. Αρχικά, η μεταγραφική ρύθμιση των Hsp επιτυγχάνεται με τους παράγοντες θερμικού σοκ (HSF), οι οποίοι συνδέονται στα στοιχεία θερμικού σοκ (HSE) και διεγείρουν την μεταγραφή των γονιδίων Hsp. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούνται σε συνθήκες θερμικού σοκ και οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της Hsp90α σε σχέση με της Hsp90β. Ο δεύτερος μηχανισμός, σχετίζεται με τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται η Hsp90, όπως φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση και ακετυλίωση, οι οποίες επηρεάζουν την λειτουργία της ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Τέλος, οι συν-συνοδοί πρωτεΐνες συνεργάζονται με την Hsp90 για να επιτελέσουν τη διαδικασία αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, βοηθούν στην αναγνώριση και επεξεργασία των υποστρωμάτων με υψηλή εξειδίκευση.

1.2.9 Ρόλος των Hsp90 σε παθολογικές καταστάσεις

Η οικογένεια των Hsp90 εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και οι ιογενείς λοιμώξεις (Hoter et al., 2018).

Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν ποικίλους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μεταγραφικής ρύθμισης και της απόπτωσης.

Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται από την οικογένεια Hsp90 για την αναδίπλωση και ωρίμανση των πρωτεϊνών τους, ενώ παράλληλα υπόκεινται σε ανεξέλεγκτες κυτταρικές διαιρέσεις. Συγκεκριμένα, συχνά υποστρώματα των Hsp90 είναι κινάσες σηματοδότησης, υποδοχείς στεροειδών ορμονών και μεταγραφικοί παράγοντες, που αποτελούν στοιχεία μεγάλης σημασίας για την εδραίωση και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Επομένως, σε πολλά είδη καρκίνου παρατηρείται αυξημένη έκφραση των Hsp90, που οφείλεται στην υπερπαραγωγή μεταλλαγμένων πρωτεϊνών (Whitesell & Lindquist, 2005).

Επιπλέον, η Hsp90 διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στα νευρικά κύτταρα, αφού συνεισφέρει στην πρόληψη συσώρευσης ελλαττωματικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Στην ασθένεια Parkinson, τόσο η Hsp90 όσο και η Hsp70 εμποδίζουν τη δημιουργία αμυλοειδών συσσωματωμάτων, επομένως καθίστανται ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Όμως, στην νόσο Alzheimer η Hsp90 φαίνεται ότι ενισχύει την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau γεγονός που οδηγεί στην δημιουργία τοξικών συσσωματωμάτων και στην επιδείνωση της νόσου. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι ο ρόλος της Hsp90 στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα είναι διφορούμενος, και δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως (Luo et al., 2010).

Τέλος, αξιοσημείωτος είναι ο ρόλος της Hsp90 σε περιπτώσεις ιογενών και παρασιτικών λοιμώξεων, ευνοώντας την επιβίωση και την αναπαραγωγή των παθογόνων. Αναλυτικότερα, πολλές ιικές πρωτεΐνες όπως οι ιικές πολυμεράσες εξαρτώνται από την Hsp90 για την σωστή αναδίπλωσή και ωρίμανσή τους. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση ιικών πρωτεϊνών και ο ρυθμός των μεταλλάξεων καθιστούν την παρουσία της Hsp90 απαραίτητη για την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

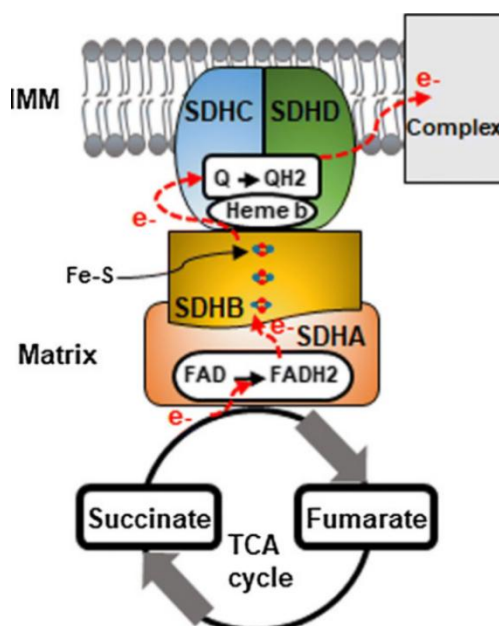
1.2.10 Ο ρόλος της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH) και η σύνδεσή της με την Hsp70

Για να διατηρηθεί η μιτοχονδριακή ακεραιότητα και λειτουργικότητα σε συνθήκες στρες και γήρανσης, είναι απαραίτητη η σωστή λειτουργία ενζύμων όπως η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού (Succinate Dehydrogenase, SDH). Αυτό, καθώς το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει τόσο στον κύκλο του Krebs όσο και στην αναπνευστική αλυσίδα, επομένως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική βιωσιμότητα. Για να εξασφαλιστεί αυτή, είναι απαραίτητη η δράση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsps), όπως η Hsp70, οι οποίες διασφαλίζουν την ορθή αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Επιπλέον, είναι πιθανό το οξειδωτικό στρες που προκύπτει από δυσλειτουργική δράση της SDH να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των

Ηsrs, τονίζοντας έτσι την στενή και αλληλένδετη σχέση μεταξύ του ενεργειακού μεταβολισμού και της κυτταρικής προστασίας.

Η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού (SDH), γνωστή και ως μιτοχονδριακό σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας ή οξειδοαναγωγή ηλεκτρικού-ουβικινόνης, αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό ένζυμο για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Συγκεκριμένα, καταλύει την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό στον κύκλο του Krebs και ταυτόχρονα τροφοδοτεί με ηλεκτρόνια την αναπνευστική αλυσίδα μέσω μεταφοράς τους στην ουβικινόνη. Αυτή, ανάγεται σε ουβικινόλη και στην συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας. Η ροή ηλεκτρονίων δημιουργεί ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό, απαραίτητο για την παραγωγή ενέργειας με την μορφή ATP (Sun et al., 2005).

Η SDH, δομείται από τέσσερις υπομονάδες (SDHA, SDHB, SDHC και SDHD) οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Η υπομονάδα SDHA φέρει το συνένζυμο FAD, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων και οξειδώνει το ηλεκτρικό σε φουμαρικό ενώ ταυτόχρονα ανάγεται σε FADH₂. Στην συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην υπομονάδα SDHB, η οποία φέρει τρία συμπλέγματα σιδήρου-θείου (Fe-S clusters). Αυτά, φροντίζουν για την ελεγχόμενη μεταφορά των ηλεκτρονίων στον τελικό δέκτη, την ουβικινόνη, η οποία εντοπίζεται στις υπομονάδες SDHC και SDHD που είναι υπεύθυνες για την αγκυροβόληση του ενζύμου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Moosavi et al., 2023).



Εικόνα 4: Η δομή και λειτουργία του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας (SDH) (Moosavi et al., 2023).

Η σωστή συναρμολόγηση του ενζύμου SDH απαιτεί την συνεργασία τεσσάρων συμπαραγόντων για τη σταδιακή ένωση των υπομονάδων, την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου FAD καθώς και των συμπλόκων σιδήρου-θείου (Fe-S clusters). Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι διαταραχές στην διαδικασία συναρμολόγησης του συμπλόκου II είναι πιθανό να εμπλέκονται με ένα πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όμως δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως ακόμη ο ρόλος των παραγόντων συναρμολόγησης (Moosavi et al., 2023).

Σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα της SDH, διαδραματίζουν αδιαμφισβήτητα οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αναδίπλωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, όπως οι υπομονάδες που απαρτίζουν το ένζυμο. Επιπλέον, η δυσλειτουργία των Hsp είναι πιθανό να διαταράξει την ορθή συναρμολόγηση του συμπλόκου της SDH και να ενισχυθεί η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Ως αποτέλεσμα, διαταράσσεται η κυτταρική και μιτοχονδριακή ομοιόσταση και επιδεινώνεται το οξειδωτικό στρες (Bezawork-Geleta et al., 2020). Για αυτό, η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp70 και της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH), είναι ιδιαίτερης σημασίας και δύναται να αποκαλύψει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη σύνδεση της επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης και των μηχανισμών άμυνας του κυττάρου.

1.3 Επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης με D- γαλακτόζη

1.3.1 Η D- γαλακτόζη ως επαγωγέας γήρανσης

Η D- γαλακτόζη είναι αναγωγικό σάκχαρο και αλδοεξόζη, που συναντάται σε πλήθος τροφών όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το μέλι, τα φρούτα και ορισμένα λαχανικά. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο άνθρωπος έχει την ικανότητα να μεταβολίσει έως και 50 γραμμάρια ημερησίως χωρίς να εμφανιστούν ανεπιθύμητες παρενέργειες. Ωστόσο, η παρατεταμένη πρόσληψή της έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), μέσω της οξειδάσης της γαλακτόζης, το οποίο στην συνέχεια προκαλεί οξειδωτικό στρες, φλεγμονώδεις αποκρίσεις, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κυτταρική απόπτωση (Azman et al., 2019).

Πρόκειται για ένα αναγωγικό σάκχαρο που αντιδρά με τις ελεύθερες αμίνες πρωτεϊνών και οδηγεί στον σχηματισμό των προϊόντων AGEs (τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης). Τα AGEs, είναι μόρια που προκύπτουν από τη μη ενζυμική αντίδραση σακχάρων με πρωτεΐνες, λιπίδια ή νουκλεϊκά οξέα και καταστρέφουν ή αλλάζουν την δομή πρωτεϊνών επάγοντας φλεγμονή και οξειδωτικό στρες.

Λόγω των παραπάνω δεδομένων, η D- γαλακτόζη έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο πρόκλησης πρόωρης γήρανσης σε πειραματόζωα, κυρίως τρωκτικά. Συγκεκριμένα, μελέτες αποκάλυψαν ότι η χρόνια χορήγηση D- γαλακτόζης έχει ως αποτέλεσμα τον νευροεκφυλισμό, γνωστική δυσλειτουργία, μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα και αυξημένη κυτταρική γήρανση, όπως αποδείχθηκε από αλλαγή επιπέδων βιοδεικτών. Επιπλέον, η D- γαλακτόζη έχει συσχετιστεί με εκφυλιστικές αλλοιώσεις σε πολλαπλά όργανα όπως η καρδιά, οι νεφροί, το ήπαρ και το δέρμα γεγονός που την καθιστά ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη της γήρανσης σε επίπεδο ιστών.

1.3.2 Βιοχημικές μεταβολές στο μοντέλο κυτταρικής γήρανσης σε μυοβλάστες C2C12 από D- γαλακτόζη

Για τη δημιουργία του μοντέλου κυτταρικής γήρανσης *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν μυοβλάστες C2C12 οι οποίοι επώαστηκαν σε 111mM D- γαλακτόζης για 48 ώρες, από τους Tian et al., 2023. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχθηκε από τους ερευνητές καθώς φαίνεται ότι επάγει μυϊκή ατροφία και κυτταρική γήρανση στα επιθυμητά επίπεδα.

Αρχικά, οι ερευνητές παρατήρησαν την αύξηση δραστηριότητας της β-γαλακτοζιδάσης (SA-β-gal), που αποτελεί έναν κοινό δείκτη κυτταρικής γήρανσης, στα κύτταρα C2C12 που επώαστηκαν με D- γαλακτόζη, επιβεβαιώνοντας έτσι την δράση της ως επαγωγέας γήρανσης. Αυτή η παρατήρηση, επιβεβαιώθηκε και από τους Wang et al., 2022 οι οποίοι σε μυοβλάστες C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη, παρατήρησαν παρόμοια αποτελέσματα. Τα γηρασμένα κύτταρα, βρίσκονταν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0/G1 και εμφάνιζαν συσσωρευμένες βλάβες στο DNA.

Έπειτα, παρατηρήθηκε και από τις δύο ερευνητικές ομάδες ότι η επώαση των κυττάρων C2C12 με D- γαλακτόζη, οδήγησε σε μείωση της ικανότητας διαφοροποίησης τους σε μυοσωληνίσκους. Αυτό, καθώς η D- γαλακτόζη μείωσε την έκφραση των παραγόντων MyoD και Myogenin (MyoG), οι οποίοι είναι απαραίτητα στοιχεία για την κυτταρική διαφοροποίηση. Έτσι, όχι μόνο επηρεάζεται η κυτταρική βιωσιμότητα και αλλά και η φυσιολογική λειτουργία διαφοροποίησης, γεγονός που συμβάλει στην μυϊκή ατροφία.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της D- γαλακτόζης στο οξειδωτικό στρες. Βρέθηκε ότι στα κύτταρα που επώαστηκαν με την ουσία ενδιαφέροντος, μειώθηκε σημαντικά η έκφραση αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η καταλάση (CAT), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px), με αποτέλεσμα την απώλεια αναγωγικής ικανότητας των

κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από την ερευνητική ομάδα των Wang et al., 2022, οι οποίοι μετά από υποδόρια χορήγηση D- γαλακτόζης σε ποντικούς για 4 εβδομάδες, σημείωσαν μερική απώλεια της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων που συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων SOD, Cu/Zn-SOD και Mn-SOD καθώς και του δείκτη GSH-Px.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του παράγοντα NRF2, που αποτελεί βασικό μεταγραφικό ρυθμιστή των αντιοξειδωτικών γονιδίων, γεγονός που μειώνει περεταίρω την ικανότητα του κυττάρου να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες. Παράλληλα, καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικών ROS, καθώς και του φωσφορυλιωμένου p65 που είναι ένα βασική υπομονάδα του παράγοντα NF-κΒ. Έτσι, ενισχύεται ακόμα περισσότερο η ανισορροπία του οξειδωαναγωγικού περιβάλλοντος του κυττάρου.

Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα των Wang et al., 2022 παρατήρησε ότι η ενδοπεριτοναϊκή ένεση D- γαλακτόζης σε δόση 150–200 mg/kg/ημέρα για 4 έως 8 εβδομάδες, αλλάζει τα επίπεδα δεικτών που σχετίζονται με την απόπτωση σε καρδιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, αυξάνεται ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων και ενεργοποιούνται οι δύο κύριες οδοί απόπτωσης: η ενδογενής (επαγόμενη από μιτοχόνδρια) και η εξωγενής (επαγόμενη από υποδοχείς). Η ενδογενής αποπτωτική οδός εξαρτάται από τη δράση της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2. Συγκεκριμένα, ο προ-αποπτωτικός παράγοντας Bax δημιουργεί πόρους στην μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, γεγονός που ενεργοποιεί την κασπάση 3 και οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση. Η χορήγηση D-γαλακτόζης, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του παράγοντα Bax και της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 στα καρδιακά κύτταρα των ποντικών. Όσον αφορά την εξωγενή οδό, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της κασπάσης 8 και του συμπλέγματος DISC (death-inducing signaling complex), έπειτα από χορήγηση της ουσίας ενδιαφέροντος (Liou et al., 2014) (Wang et al., 2022).

Τέλος, το μονοπάτι p38/p38 έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης, ιδιαίτερα σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Φαίνεται ότι η επώαση των μυοβλαστών C2C12 με D- γαλακτόζη, οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση του p38 που αποτελεί έναν ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης στο στρες και επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p53. Αυτή με την σειρά της, ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο μέσω ρύθμισης προ-αποπτωτικών γονιδίων όπως το Bax (Wang et al., 2022).

Συνοψίζοντας, η χορήγηση D- γαλακτόζης προκαλεί κυτταρική γήρανση στους μυοβλάστες C2C12 μέσω επαγωγής οξειδωτικού στρες, φλεγμονής, αναστολής διαφοροποίησης σε μυοσωληνίσκους και ενεργοποίησης της απόπτωσης μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών.

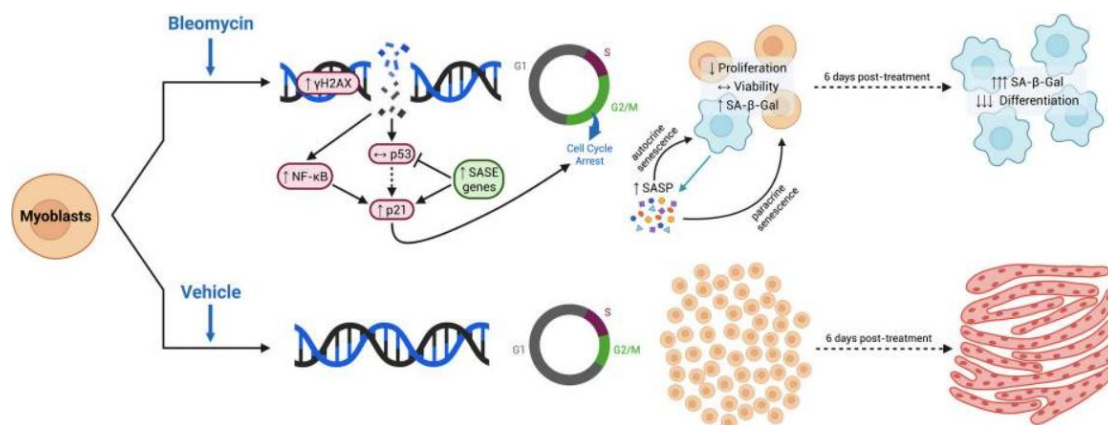
1.3.3 Επαγωγή κυτταρικής γήρανσης σε μυοβλάστες C2C12 και μείωση ικανότητας διαφοροποίησης

Σύμφωνα με τους Kamal et al. 2023, προτείνεται ένα μοντέλο γήρανσης των μυοβλαστών C2C12 μετά από έκθεση σε χημειοθεραπευτικό παράγοντα (bleomycin) και αξιολογείται η αλλαγή επιπέδων δεικτών που σχετίζονται με την γήρανση, σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (Kamal et al. 2023).

Αρχικά, η έκθεση στην ουσία επιφέρει σημαντική βλάβη στο DNA όπως αποδεικνύεται από την αυξημένη έκφραση του γH2AX, που αποτελεί έναν κοινό δείκτη για τον εντοπισμό διπλής ρήξης στους κλώνους DNA. Η βλάβη αυτή, ενεργοποιεί την έκφραση του p21 και την αύξηση των επιπέδων της αντίστοιχης πρωτεΐνης που αποτελεί έναν αναστολέα της κυτταρικής διαίρεσης. Ωστόσο, τα επίπεδα του p53 παρέμειναν ίδια, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή ενεργοποίηση του p21 μέσω εναλλακτικών οδών σηματοδότησης όπως αυτή που περιλαμβάνει τον παράγοντα Nf-κB (Nicolae et al., 2018). Ως αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης του p21, οι μυοβλάστες υφίστανται παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M και παρατηρείται σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χωρίς όμως να ενεργοποιούνται αποπτωτικά μονοπάτια (Kamal et al. 2023).

Η γήρανση των μυοβλαστών, συνοδεύεται από την έκκριση παραγόντων που ενισχύουν στην αυτοκρινή και παρακρινή εξάπλωση της γήρανσης. Η χρώση με SA-β-Gal, δείχνει ότι τα ποσοστά των γερασμένων κυττάρων αυξάνονται σταδιακά, φτάνοντας στο 88%, ενώ οι μυοβλάστες που δεν υποβλήθηκαν σε έκθεση στην ουσία, δεν εμφανίζουν βλάβες στο DNA και διαφοροποιούνται σε μυοσωλήνες. Τέλος, τα γερασμένα κύτταρα εκκρίνουν προ-φλεγμονώδη μόρια όπως κυτοκίνες και χημειοκίνες που σχετίζονται με τον εκκριτικό φαινόμενο της γήρανσης (SASP), και επιβεβαιώνουν περαιτέρω τα ευρήματα των ερευνητών (Kamal et al. 2023).

Παρά τα σημαντικά ευρήματα της μελέτης, η ερευνητική ομάδα εκφράζει τις ανησυχίες της σχετικά με την απόλυτη αξιοπιστία του προτεινόμενου μοντέλου γήρανσης. Αρχικά, πρόκειται για μια *in vitro* πειραματική προσέγγιση που είναι πιθανόν να εμφανίζει αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με το *in vivo* περιβάλλον των ιστών, λόγω της πολυπλοκότητας του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης. Επιπλέον, η κυτταρική σειρά μυοβλαστών C2C12 που αξιοποιείται προέρχεται από ποντικό και ίσως να μην αποτελεί μια ακριβή αναπαράσταση των διεργασιών που πραγματοποιούνται σε ανθρώπινους σκελετικούς μυς. Τέλος, οι ερευνητές τονίζουν την ανάγκη χρήσης πολλαπλών δεικτών γήρανσης, καθώς παρατηρούνται ασυμφωνίες μεταξύ κοινών βιοδεικτών όπως p21, p53 και SA-β-Gal (Kamal et al. 2023).



Εικόνα 5: Μοντέλο κυτταρικής γήρανσης σε μυοβλάστες μετά από έκθεση σε χημειοθεραπευτικό παράγοντα (bleomycin) (Kamal et al. 2023).

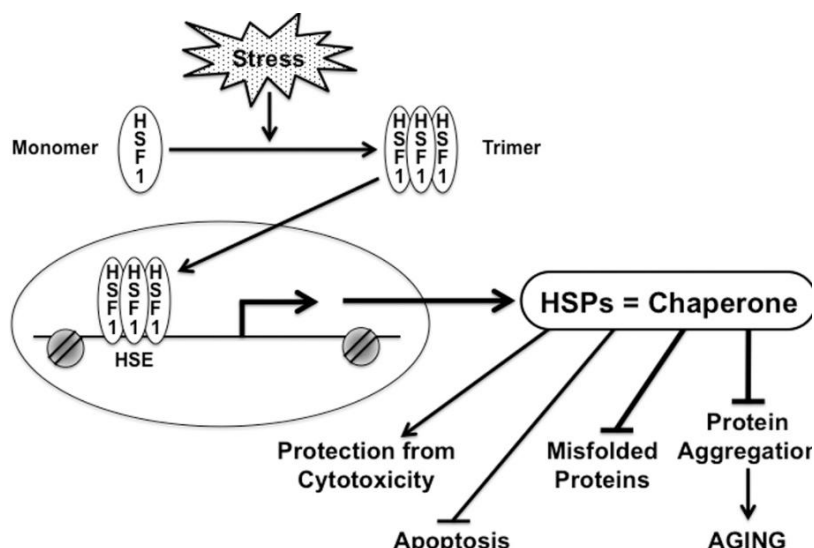
1.4 Σχέση γήρανσης μυϊκών κυττάρων με μεταβολές επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ

1.4.1 Σύνδεση κυτταρικής γήρανσης με έκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Η κυτταρική γήρανση, αποτελεί την μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου και επιφέρει σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μόρια όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp) που είναι υπεύθυνα για την ορθή αναδίπλωση πρωτεϊνών και πρόληψη συσσωματωμάτων, κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικά. Μάλιστα, η έκφραση των Hsp70 και Hsp90 φαίνεται να επάγεται σε πολλές συνθήκες κυτταρικού στρες, προωθώντας έτσι την κυτταρική επιβίωση.

Ιδιαίτερα σημαντικός για την λειτουργία των Hsp, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HSF1 ο οποίος σε συνθήκες στρες, απελευθερώνεται από το σύμπλοκο Hsp90-Hsp40 και υφίσταται τριμερισμό και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Έτσι, ενεργοποιείται και οδηγείται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις Hsp (Murshid, Eguchi, & Calderwood, 2013).

Σύμφωνα με τους Murshid, Eguchi, & Calderwood, 2013, η σύνδεση της έκφρασης Hsp με την κυτταρική γήρανση είναι ένα αμφιλεγόμενο θέμα. Συγκεκριμένα, σε ιστούς όπως νευρώνες και μύες παρατηρείται μείωση της έκφρασης Hsps και HSF1 κατά την γήρανση, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά στην ικανότητα των κυττάρων να αναδιπλώνουν ορθά τις πρωτεΐνες. Ως αποτέλεσμα, ευνοείται ο σχηματισμός αδιάλυτων συσσωματωμάτων που οδηγούν στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων (νόσος του Huntington).



Εικόνα 6: Ενεργοποίηση του HSF1 από στρες, και επαγωγή έκφρασης HSPs (Murshid, Eguchi, & Calderwood, 2013).

Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι σε συγκεκριμένους οργανισμούς η έκφραση των Hsps επάγεται στην κυτταρική γήρανση. Συγκεκριμένα στην *Drosophila*, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των Hsp22 και Hsp70, η οποία προϋποθέτει ενεργοποίηση του HSF1. Έτσι, υπονοείται ότι η έκφραση των Hsps δρα ως μηχανισμός άμυνας του κυττάρου έναντι σε στρεσογόνες συνθήκες που προκαλούν αλλοίωση της δομής των πρωτεϊνών.

Συνοψίζοντας, ο ρόλος των Hsps στην κυτταρική γήρανση είναι διττός και διαφέρει ανάλογα με τον τύπο κυττάρων και τους παράγοντες που την προκάλεσαν περίσταση. Σε κάθε περίπτωση, όμως, αποτελεί έναν μηχανισμό επιβίωσης του κυττάρου και διατήρησης της πρωτεϊνικής ομοιόστασης.

1.4.2 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ ως ρυθμιστές κυτταρικής γήρανσης

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, αποτελούν αδιαμφισβήτητα κρίσιμους ρυθμιστές της κυτταρικής γήρανσης και επιβίωσης. Αυτό, οφείλεται κυρίως στην ικανότητά τους για επαναδίπλωση μορίων με εσφαλμένες διαμορφώσεις, στην αποτροπή για απόπτωση και στην συμβολή πρόληψης δημιουργίας συσσωματωμάτων που οδηγούν στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων. Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντική φαίνεται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HSF1 σε στρεσογόνες συνθήκες, που επάγει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις Hsp, ενισχύοντας έτσι την κυτταρική προσαρμογή και επιβίωση.

1.5 Στόχος -Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Η διασαφήνιση της σχέσης μεταξύ των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και της κυτταρικής γήρανσης, μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που να συμβάλλουν στην καταπολέμηση και πρόληψη των συμπτωμάτων της γήρανσης. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα πτυχιακή εργασία, εστιάζει στην μελέτη της έκφραση της Hsp70 σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με D- γαλακτόζη, σε κυτταρική σειρά μυοβλαστών C2C12. Παράλληλα, διερευνάται η έκφραση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH), ενός βασικού ενζύμου που συμμετέχει στον κύκλο του Krebs αλλά και στην αναπνευστική αλυσίδα, με στόχο την διασαφήνιση της σύνδεσης του ενεργειακού μεταβολισμού και της κυτταρικής γήρανσης.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Οργανολογία

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αξιοποιήθηκαν συγκεκριμένες συσκευές και εργαστηριακά όργανα τα οποία παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Εργαστηριακό Όργανο	Κατασκευαστής / Μοντέλο
Multimode Plate Reader	Enspire multimode plate reader
Αναδευτήρας (Vortex)	Bio Vortex V1
Ανάστροφο Μικροσκόπιο	A. Kruss Optronic Germany
Αυτόματος πιπεταδόρος	HTC Lab solution
Επιτραπέζια μικρή φυγόκεντρος (Quick spin)	Nippon Genetics Europe GmbH
Επωαστήρας κυτταροκαλλιιεργειών	Thermo Electron Corporation
Ζυγός	Kern EW
Ζυγός	Kern 440-47N
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής/ Απαγωγός	Tel Star AV-30/70
Θερμαινόμενη πλάκα (Heat Block)	Kisker
Μαγνητικός Αναδευτήρας (Stirrer)	Nuova thermolyne
Οριζόντιος Αναδευτήρας	Heidolph Rotamax
Πεχάμετρο	Metrohm 827 pH lab
Πλάκα Neubauer	HBG Germany
Πλαστική ράβδος (scraper)	Thermo Fisher Scientific

Σκοτεινός θάλαμος και σελ εμφάνισης μεμβρανών	W.B Kodak, Fuji film
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς	Biorad mini-trans Blot
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN tetra cell
Συσκευή υπερήχων (Sonicator)	Heischer Ultrasound Technology, model UP400S
Τροφοδοτικό	Wealtec Elite 200
Υδατόλουτρο κυτταροκαλλιιεργειών	P. Selecta
Φασματοφωτόμετρο	Spectronic 20 GENESYSTEM
Φυγόκεντρος κυτταροκαλλιιεργειών	Jouan BR4

Πίνακας 1: Συσκευές και εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιική εργασία.

2.2 Υλικά

2.2.1 Χημικά/ Αντιδραστήρια

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2), παρατίθενται τα χημικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή αντιδραστηρίων και την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
D-Galactose	Sigma
Acrylamide/Bis 40% (Acr)	Bio-Rad
Ammonium persulfate (APS)	Serva
Bradford (5X)	Bio-Rad
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Brophenolol blue	Fluka
Developer	Fuji
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Enhanced ChemiLuminescence (ECL)	Santa Cruz
Ethanol 100%	Sigma
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Scharlau
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Fixer	Fuji
Glycerol	KaloChem

Glycine	Serva
Hydrochloric acid (HCl)	Scharlau
Isopropanol	Sigma
L-Glutamine 200mM (L-Gln) (100X)	Gibco
Methanol 100%	Sigma
Penicillin/Streptomycin (P/S) (5000U/mL)	Gibco
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Serva
Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X)	Gibco
Protease inhibitors	Roche
Protein ladder	Proteintech
Skimmed milk powder	Regilait
Sodium chloride (NaCl)	Scharlau
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva
Triton X-100	AppliChem
Trypsin-EDTA 5% (10X)	Gibco
Tween 20	Sigma
β-mercaptoethanol	Riedel de Haen

Πίνακας 2: Χημικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία.

2.2.2 Αναλώσιμα υλικά

Στον Πίνακα 3, περιέχονται όλα τα αναλώσιμα υλικά που αξιοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Αναλώσιμα Υλικά	Εταιρεία
Γυάλινες πιπέτες (Pasteur)	Kimble
Βαθμονομημένα Σωληνάρια (Falcon) (15mL, 50mL)	Sarstedt
Διηθητικά χαρτιά (Whatman)	Sigma
Σωληνάρια για μεταφορά των κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (-80oC) (cryovials) (1,5mL και 2mL)	Sarstedt
Φιλμ ανίχνευσης σήματος	FUJI MEDICAL
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45μM, 0,22μM)	Amersham™ Protran™
Πλαστικά Σιφώνια (2mL, 5mL, 10mL, 25mL)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια (eppendorf) (1.5 mL, 2.0 mL)	Sarstedt
Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (6, 96 θέσεων)	Sarstedt
Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων (T25, T75)	Sarstedt

Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (60x15mm)	Corning
Ρύγχοι πιπετών (tips) (0.2-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Sarstedt

Πίνακας 3: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία.

2.2.3 Παρασκευή διαλυμάτων

Στον Πίνακα 4, παρατίθενται οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Διαλύματα
Lysis Buffer Περιέχει 20 mM Tris pH 7.5, 0.5% (v/v) Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Εμπλουτίζεται με 1mM DTT, 0.1 mM PMSF και διάλυμα Protease Inhibitors στην απαιτούμενη συγκέντρωση. Αποθήκευση στους 4°C.
Διάλυμα Bradford 1X Προκύπτει από αραιώση του διαλύματος Bradford 5X σε dH ₂ O και παραγωγή νέου διαλύματος Bradford με τελική συγκέντρωση 1X.
Sample Buffer 4X Περιέχει 1 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) SDS, 1% (v/v) Bromophenol blue σε dH ₂ O. Ακολουθεί ανάδευση και θέρμανση του τελικού διαλύματος. Το διάλυμα που προκύπτει μοιράζεται σε aliquots στα οποία προστίθεται 5% (v/v) β-mercaptoethanol. Αποθήκευση στους -20°C.
Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) Προστίθενται 725mL dH ₂ O, 250mL Διαλύματος Α και 25mL Διαλύματος Β, για την παραγωγή 1000mL διαλύματος. Αποθήκευση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.
Διάλυμα σταθεροποίησης σήματος (Fixer solution) Προστίθενται 750mL dH ₂ O, 225mL Διαλύματος Α και 25mL Διαλύματος Β. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hydrochloride (Tris-HCl) pH 6,8 1,5M Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris base σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH (6,8) με την προσθήκη πυκνού HCl 12M. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hydrochloride (Tris-HCl) pH 8,8 1,5M Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris base σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH (8,8) με την προσθήκη πυκνού HCl 12M. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 1X Περιέχει 20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0,05% (v/v) SDS σε dH ₂ O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-buffered saline (TBS) 10X Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris base σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH (7,4-7,6) με την

προσθήκη πυκνού HCl 12M. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 10X Περιέχει 14,4% (w/v) Glycine και 3% (w/v) Tris base σε dH ₂ O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) 1X Περιέχει 10 % (v/v) TBS 10X και 0.06% (v/v) Tween 20 σε dH ₂ O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 1X Περιέχει 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0,1% (v/v) SDS σε dH ₂ O. Αποθήκευση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 4: Οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα πτυχιακή εργασία.

2.2.4 Αντισώματα

Στον Πίνακα 5, παρατίθενται τα πρωτογενή αντισώματα που αξιοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western Blot και στον πίνακα 6, παρατίθενται τα δευτερογενή αντισώματα.

Αντίσωμα	Συγκέντρωση (v/v)	Πηγή παραγωγής	Μοριακό Βάρος (kDa)	Εταιρεία
Heat Shock Protein 70 (Hsp70)	1:250	Mouse	70	Santa Cruz
Succinate Dehydrogenase (SDH)	1:5000	Mouse	130	Invitrogen
β-actin	1:2000	Mouse	42	ProteinTech

Πίνακας 5: Τα πρωτογενή αντισώματα που αξιοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Αντίσωμα έναντι	Συγκέντρωση (v/v)	Εταιρεία
Mouse IgG-HRP	1:50.000	Pierce Antibodies

Πίνακας 6: Τα δευτερογενή αντισώματα που αξιοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

2.2.5 Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι μυοβλάστες C2C12 που προέρχονται από ποντικό (ευγενική προσφορά της κας. Καρατζαφέρη). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χαρακτηρίζεται από υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό και μπορεί να υποβληθεί σε διπλασιασμούς χωρίς να χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησής της. Για αυτούς τους λόγους, αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο για την μελέτη επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με χορήγηση D- γαλακτόζης (Kamal, Joannis, & Parise, 2023).

2.2.6 Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιιεργειών

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς C2C12, παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση & Οδηγίες Χρήσης
Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose with phenol red (DMEM) 1X	• Περιέχονται 4 gr/L D-Glucose, L-glutamate, phenol red και πυροσταφυλικό. • Για την παραγωγή πλήρους θρεπτικού υλικού προστίθενται: – 10% v/v FBS – 1% v/v L-Gln – 1% v/v P/S • Αποθήκευση: στους 4°C

Πίνακας 7: Θρεπτικό μέσο που αξιοποιήθηκε για την καλλιέργεια των μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς C2C12.

2.3 Μεθόδους και τεχνικές

2.3.1 Βιοχημικές τεχνικές εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών

2.3.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αξιοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C2C12 η οποία καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο DMEM (high glucose), το οποίο περιέχει 4gr/L D-Glucose και πυροσταφυλικό. Σε αυτά, προστίθενται 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln και 1% v/v P/S.

Τα cryovial περιέχουν μυοβλάστες C2C12 με 90% FBS και 10% DMSO. Διατηρούνται στους -80°C και ξεπαγώνουν με βύθιση σε υδατόλουτρο. Έπειτα,

αναμειγνύεται μια ποσότητα από το cryovial με θρεπτικό και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό, και μεταφέρεται σε 25mm² φλάσκα η οποία τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37 °C και 5% CO₂.

2.3.1.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο αξιοποιείται ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην φλάσκα και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Συγκεκριμένα, η θρυψινοποίηση είναι απαραίτητη όταν η φλάσκα φτάσει σε κατάσταση κορεσμού 80-90%. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό των κυττάρων και έπειτα προστίθεται ποσότητα θρυψίνης που δρα για 3min στον επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Ακολουθεί παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας. Για να διακοπεί η δράση της θρυψίνης, προστίθεται στην φλάσκα θρεπτικό μέσο σε όγκο 4 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο της θρυψίνης και γίνεται μεταφορά του περιεχομένου σε falcon. Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1000rpm για 5min, αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε ποσότητα θρεπτικού μέσου.

2.3.1.3 Επίστρωση κυττάρων

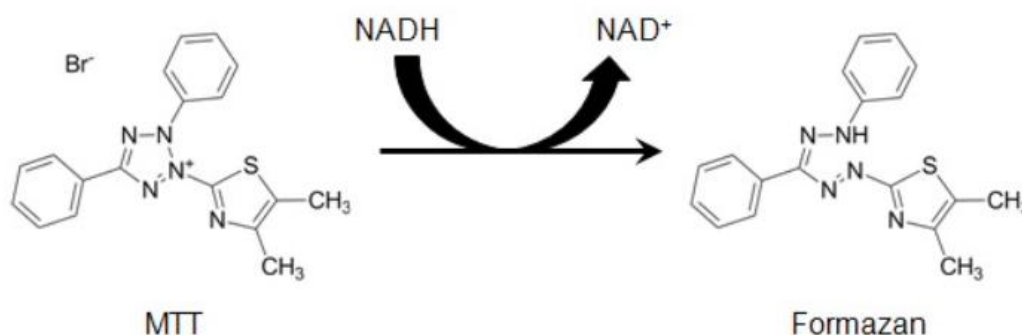
Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται η επίστρωση των κυττάρων σε 6 well-plates. Συγκεκριμένα, επιλέγεται να επιστρωθούν 35.000 κύτταρα ανά συνθήκη.

Αρχικά, 10μl από την καλλιέργεια κυττάρων μεταφέρονται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και γίνεται μέτρηση των κυττάρων με παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όγκο υγρού δείγματος (π.χ. καλλιέργεια κυττάρων). Πρόκειται για μια γυάλινη πλάκα, στην εσοχή της οποίας τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα από την καλλιέργεια κυττάρων και καλύπτεται με μια γυάλινη καλυπτρίδα. Στην συνέχεια, με την βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου, μετρούνται τα κύτταρα στα 4 τεταρτημόρια του πλέγματος, υπολογίζεται ο μέσος όρος και πολλαπλασιάζεται με τον όρο 10⁴ ώστε να γίνει αναγωγή σε ml. Διαιρείται ο αριθμός των κυττάρων που απαιτούνται (35.000 cells/well) με τον αριθμό των κυττάρων του δείγματος και υπολογίζεται η ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί από την καλλιέργεια. Κατόπιν, υπολογίζεται ο όγκος του θρεπτικού μέσου μέσω του τύπου: Τελικός όγκος = Όγκος θρεπτικού μέσου + Όγκος καλλιέργειας κυττάρων. Τέλος, οι ποσότητες θρεπτικού μέσου και καλλιέργειας κυττάρων μεταφέρονται σε νέο falcon και τα κύτταρα επιστρώνονται σε 6 well-plates ισόποσα. Ακολουθεί παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο και επώαση σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

2.3.1.4 Χρωματομετρική μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT, είναι μια δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων που χρησιμοποιείται για την μέτρηση μεταβολικής δραστηριότητας και κυτταροτοξικότητας. Βασίζεται στην μετατροπή του υποστρώματος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) σε χρωμοφόρο προϊόν με μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης, μέσω της δράσης μιτοχονδριακών αφυδρογονασών. Στην συνέχεια, οι μωβ κρύσταλλοι διαλύονται με την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη (ισοπροπανόλη) και η συγκέντρωσή τους προσδιορίζεται μέσω της απορρόφησης τους σε $\lambda = 570\text{nm}$ (Riss et al. 2004).

Συγκεκριμένα, κύτταρα επιστρώνονται σε 96 well-plate, παρουσία του θρεπτικού μέσου DMEM 1X (high glu) με 4gr/L D-Glucose, πυροσταφυλικό και εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln και 1% v/v P/S. Στην συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ για 24 ώρες και ακολουθεί προσθήκη της D- γαλακτόζης για 24 και ώρες, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Το 96-well plate μεταφέρεται στον επωαστήρα και μετά τη λήξη των χρονικών διαστημάτων προστίθεται το αντιδραστήριο MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml για 3 ώρες, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Ακολουθεί η αφαίρεση των ουσιών και η προσθήκη του οργανικού διαλύτη (ισοπροπανόλη). Έπειτα, γίνεται ανάδευση για 30mins σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου και μετρήσεις απορρόφησης στο φωτόμετρο Multimode Plate Reader. Συγκεκριμένα, μετριέται η απορρόφηση σε $\lambda = 570\text{nm}$ για τους κρυστάλλους και σε $\lambda = 690\text{nm}$ για τον θόρυβο (background). Έτσι, επιλέγονται οι επιθυμητές συγκεντρώσεις της D- γαλακτόζης (30mg/ml και 40mg/ml) που μειώνουν την κυτταρική βιωσιμότητα σε επιθυμητά επίπεδα.



Εικόνα 7: Η μετατροπή του αντιδραστήριου MTT σε έγχρωμο προϊόν (μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης) μέσω των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών (Riss et al. 2004).

2.3.1.5 Προσθήκη ουσιών

Αρχικά, πραγματοποιείται επίστρωση κυττάρων σε 6 well-plates παρουσία θρεπτικού μέσου. Η D- γαλακτόζη, διαλυτοποιείται σε ποσότητα θρεπτικού μέσου και οι επιθυμητές συγκεντρώσεις επιτυγχάνονται μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε κλίβανο με συνθήκες 37°C και 5% CO₂ για 24 ώρες και προσθήκη της D- γαλακτόζης σε συγκεκριμένες ποσότητες και συγκεντρώσεις (30mg/ml και 40mg/ml) για τα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών.

2.3.2 Βιοχημικές τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών

2.3.2.1 Συλλογή Κυττάρων/ Harvest

Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων (harvest) από τα plates. Αρχικά, αφαιρείται η D- γαλακτόζη και το θρεπτικό μέσο DMEM από τα wells, και στην συνέχεια προστίθενται 700μl PBS 1X σε θερμοκρασία 4°C. Στην συνέχεια, με χρήση ενός πλαστικού εργαλείου (scraper) τα κύτταρα συλλέγονται από τα wells και τοποθετούνται σε erpendorf. Προστίθενται επιπλέον 700μl PBS και η περίσσεια των κυττάρων τοποθετείται στο erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4°C για 5mins σε 2.000 rpm, και τα κύτταρα που βρίσκονται σε μορφή ιζήματος υφίστανται περεταίρω επεξεργασία για την προετοιμασία δειγμάτων.

2.3.2.2 Λύση κυττάρων

Τα ιζήματα των κυττάρων μεταφέρονται σε πάγο και στην συνέχεια προστίθεται σε αυτά Lysis buffer (διάλυμα λύσης κυττάρων). Αυτό περιέχει Tris-HCl 20mM PH=7.5, Triton-X 100 0.5% v/v, NaCl 250mM, EDTA 3mM, και εμπλουτίζεται με 1mM DTT, 0.1 PMSF και Protease Inhibitors. Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο vortex για τη διάσπαση του ιζήματος και επώαση των κυττάρων με το διάλυμα λύσης για 30min. Στην συνέχεια γίνεται περεταίρω επεξεργασία με υπερήχους για 1 sec σε 5 επαναλήψεις, που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 35 sec.

2.3.2.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με μέθοδο Bradford και προετοιμασία δειγμάτων

Η χρωματομετρική μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Συγκεκριμένα, το χρώμα του αρχικού αντιδραστήριου είναι καφέ και όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα, το χρώμα μεταβάλλεται σε μπλε. Το αρχικό stock 5X υφίσταται αραιώση σε τελική συγκέντρωση 1X. Στην συνέχεια, σε 1μl από κάθε συνθήκη προστίθενται 1ml από το αντιδραστήριο Bradford 1X και ακολουθεί

επώαση σε σκοτεινό μέρος για 20-40min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μέτρηση των απορροφήσεων σε $\lambda=595\text{nm}$ και αφού οι απορροφήσεις καταγραφούν σε Microsoft Office Excel, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω της πρότυπης καμπύλης BSA. Τέλος, τα πρωτεϊνικά δείγματα μεταφέρονται σε νέα eppendorf με sample buffer (τελική συγκέντρωση 1X) και Tris-HCl και αποθηκεύονται στους -20°C .

2.3.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Αρχικά, επιστοιβάζονται σε πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) με χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και στην συνέχεια διαχωρίζονται στην πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Το SDS είναι μια ανιονική απορρυπαντική ουσία η οποία συνδέεται με τις πρωτεΐνες σε αναλογία με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται στο gel πολυακρυλαμιδίου διαχωρίζει τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες καθώς αυτές μεταφέρονται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+).

Πηκτή επιστοιβάξης (stacking)	Πηκτή διαχωρισμού (seperating)
ddH ₂ O	ddH ₂ O
0,125 M Tris-HCl pH 6,8	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
SDS 0,1% (w/v)	SDS 0,1% (w/v)
Acr 4% (w/v)	Acr 10% ή 12% (w/v)
APS 1% (w/v)	APS 1% (w/v)
TEMED 0,04% (v/v)	TEMED 0,04% (v/v)

Πίνακας 8: Σύσταση πηκτής επιστοιβάξης (stacking) και πηκτής διαχωρισμού (seperating).

Τα δείγματα, θερμαίνονται στους 95°C για 5mins ώστε να αποδιαταχθούν οι τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών και να μην συμβάλλουν στον διαχωρισμό τους. Έπειτα, μια ποσότητα των δειγμάτων μεταφέρεται στα πηγαδάκια της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 90V, παρουσία του Running Buffer 1X.

2.3.2.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση Western Blot είναι μια διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών που επιτρέπει τον ποιοτικό χαρακτηρισμό τους και τον

προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους. Αρχικά, πραγματοποιείται διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω ηλεκτρικού πεδίου. Στην συνέχεια, γίνεται blocking και έπειτα επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα για την πρωτεΐνη στόχο. Ακολουθεί σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος που φέρει ένζυμο (HRP) για ανάπτυξη και ανίχνευση σήματος.

- **Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου μεταφέρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για εξισορρόπηση (Transfer buffer). Επιπλέον, απομακρύνεται η πηκτή επιστοίβαξης με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας, καθώς αυτή δυσκολεύει την μεταφορά πρωτεϊνών, και ακολουθεί η δημιουργία μίας μορφής “sandwich”. Συγκεκριμένα, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου έρχεται σε άμεση επαφή με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και περικλείονται από διηθητικά χαρτιά Wattman και 2 σφουγγάρια. Η συσκευή της ηλεκτρομεταφοράς ρυθμίζεται στα 0.35^A για 70min.

- **Μπλοκάρισμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Blocking)**

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε διάλυμα με TBST και ακολουθεί το blocking, ώστε να αποφευχθεί η σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις σύνδεσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται διάλυμα άπαχου αποξηραμένου γάλακτος σε συγκέντρωση 10%, διαλυμένο σε TBST και πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης σε αυτό για 1 ώρα, υπό ανάδευση.

- **Επώαση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα**

Αφού ολοκληρωθεί το blocking, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα για την πρωτεΐνη στόχο. Το αντίσωμα είναι αραιωμένο σε επιθυμητή συγκέντρωση σε διάλυμα άπαχου αποβουτυρωμένου γάλακτος και TBST, και παραμένει σε επαφή με την μεμβράνη για 16 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 mins με TBST ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος, και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 5 mins και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος.

- **Εμφάνιση σήματος**

Αυτό το στάδιο, βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση της ραπανίδος), και με την προσθήκη του υποστρώματος ECL

(αποτελείται από ECLA και ECLB σε αναλογία 1:1) πραγματοποιείται η αντίδραση εκπομπής φωτός, σε σκοτεινό θάλαμο. Έπειτα από 3 mins, η μεμβράνη μεταφέρεται σε κασετίνα έκθεσης και τοποθετούνται σε αυτή φωτοευαίσθητα X-ray films για συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο. Ακολουθεί εμφάνιση των φιλμ σε αντιδραστήριο Developer για την εμφάνιση του σήματος, ύστερα σε νερό και τέλος σε αντιδραστήριο Fixer για την μονιμοποίηση του σήματος.

2.3.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

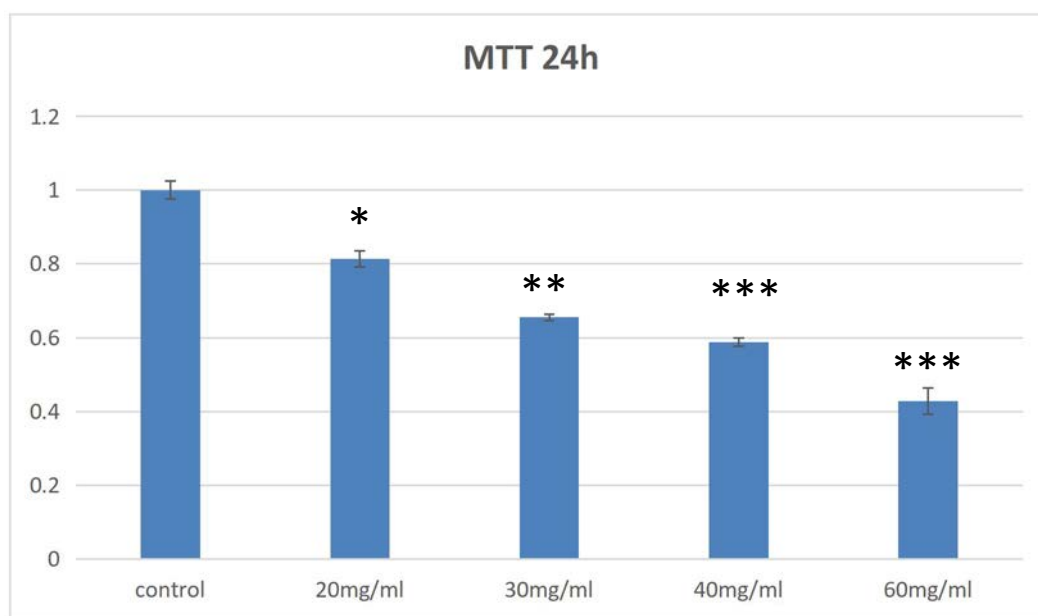
Για την επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα υπολογιστικά προγράμματα. Συγκεκριμένα, αξιοποιήθηκε το Microsoft Office Excel για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας MTT, για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford, για τον υπολογισμό κατάλληλων ποσοτήτων των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση, καθώς και για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western Blot. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Image J ώστε να γίνει η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών και να ακολουθήσει η περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τέλος, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την δοκιμασία MTT πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού StatPlus και συγκεκριμένα μέσω του One-Way Analysis of Variance-Tukey B (ANOVA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διερεύνηση της κυτταρικής ανάπτυξης μυοβλαστών C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες.

Αρχικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι η διερεύνηση της μεταβολής της κυτταρικής ανάπτυξης μυοβλαστών C2C12 που έχουν επωαστεί με την D- γαλακτόζη για 24 ώρες, μέσω της δοκιμασίας MTT. Συγκεκριμένα, κύτταρα επιστρώθηκαν σε δύο 96άρια τρυβλία για 24ωρη επώαση με την ουσία ενδιαφέροντος (3.000 cells/well), όλα παρουσία θρεπτικού. Οι συνθήκες ήταν: Control (κύτταρα παρουσία θρεπτικού μέσου, χωρίς ουσία ενδιαφέροντος), 20mg/ml D- γαλακτόζης, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml. Μετά την λήξη της 24ωρης επώασης, προστέθηκε στις συνθήκες το αντιδραστήριο MTT σε συγκέντρωση 0.5mg/ml. Στην συνέχεια, έγινε αφαίρεση των ουσιών και των νεκρών κυττάρων και προσθήκη του οργανικού διαλύτη ισοπροπανόλη, ο οποίος διασπά

τους κρυστάλλους φορμαζάνης που σχηματίζονται από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών – μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Έπειτα από επώαση στο σκοτάδι και ανάδευση για 30min, ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 570nm και 690nm, στο Multimode Plate Reader.



Διάγραμμα 1: Αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων D-γαλακτόζης στον ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης μυοβλαστών C2C12, έπειτα από 24ωρη επώαση. Το διάγραμμα προκύπτει από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το λογισμικό StatPlus και ως Control ορίζεται η συνθήκη όπου απουσιάζει η D-γαλακτόζη και αντιστοιχεί στην τιμή 1. Οι τιμές εκφράζονται ως M.O. $\pm$ S.D. (n=4-5) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η έκθεση των κυττάρων με D-γαλακτόζη επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητά τους, όπως εκτιμάται με βάση τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σταδιακή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της D-γαλακτόζης, υποδεικνύοντας ότι η κυτταροτοξικότητα της ουσίας ενδιαφέροντος σχετίζεται με την δόση της. Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση 20mg/ml προκάλεσε περίπου 20% στατιστικά σημαντική ($p \leq 0.05$, *) μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με την συνθήκη Control. Η συγκέντρωση 30 mg/ml οδήγησε σε περίπου 35% μείωση ($p \leq 0.01$, **), ενώ στην συγκέντρωση 40 mg/ml, η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται κατά 40% ($p \leq 0.001$, ***). Τέλος, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 60 mg/ml παρατηρείται η μεγαλύτερη απώλεια βιωσιμότητας κατά 60% με στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p \leq 0.001$, ***).

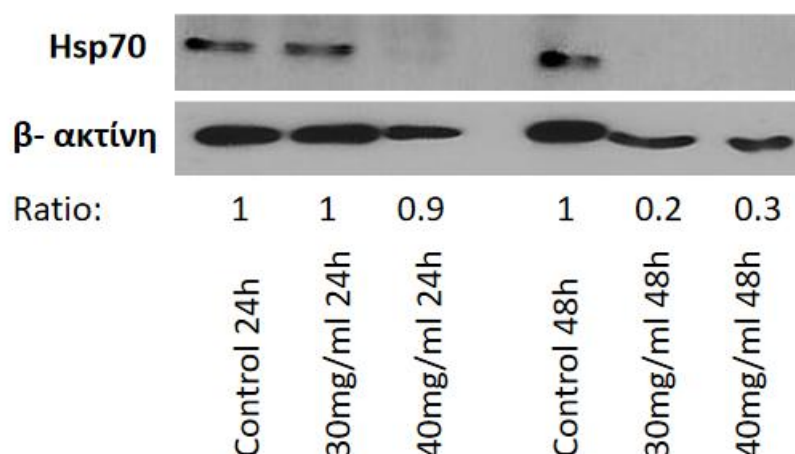
Τα δεδομένα δείχνουν ότι η D-γαλακτόζη προκαλεί έντονο κυτταρικό στρες και μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού StatPlus, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των p-values και την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των πειραματικών συνθηκών και της συνθήκης Control.

3.2 Διερεύνηση των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp70 σε μυοβλάστες C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες.

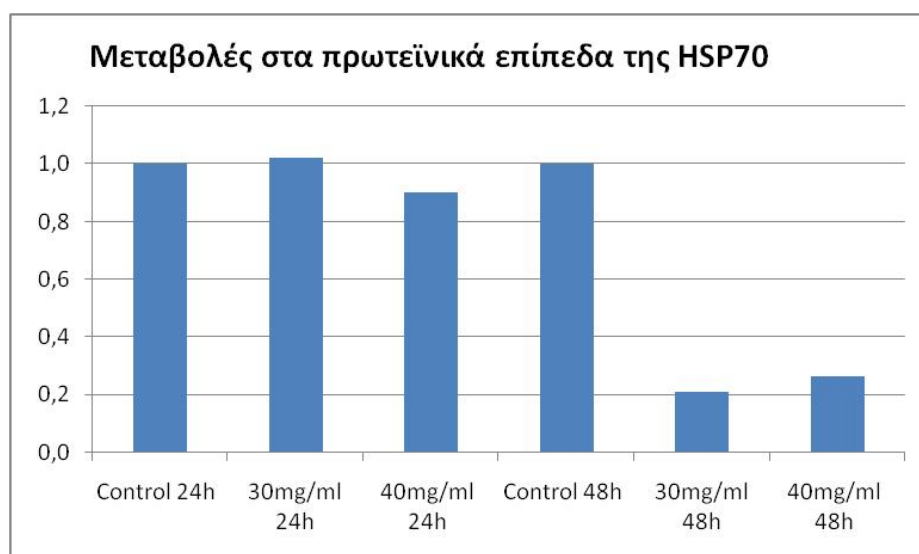
Επόμενος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ήταν η διερεύνηση των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp70 σε μυοβλάστες C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες. Συγκεκριμένα, κύτταρα επιστρώθηκαν σε 6-well plates (35.000 cells/well) και καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προσθήκη της D- γαλακτόζης σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στους κατάλληλους όγκους.

Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν, υποβλήθηκαν σε λύση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών τους. Έπειτα, ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τέλος, με την ανοσοαποτύπωση κατά Western ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp70.

Στην εικόνα 8 και στο διάγραμμα 2, απεικονίζονται οι αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Hsp70, που προκύπτουν λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε D- γαλακτόζη σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, σε 24h και 48h επώαση. Ως 1 ορίζεται ο λόγος της έντασης των ζωνών της Hsp70 προς την ένταση των ζωνών της β-ακτίνης, και αντιστοιχεί στο control. Από την εικόνα, παρατηρείται ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Hsp70 στην συνθήκη 30mg/ml 24h, δεν μεταβάλλονται σε σχέση με την συνθήκη control. Ωστόσο, στην συνθήκη 40mg/ml 24h υπάρχει μια μικρή μείωση της έντασης στη πρωτεϊνική ζώνη της Hsp70 (10%), κανονικοποιούμενης ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της β ακτίνης. Στην συνέχεια, στις συνθήκες 30mg/ml και 40mg/ml για 48h, παρατηρείται αξιοσημείωτη μείωση της έντασης, συγκεκριμένα 80% και 70% αντίστοιχα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η επώαση των μυοβλαστών C2C12 με D- γαλακτόζη, επιφέρει απώλεια της ικανότητας των κυττάρων να πραγματοποιήσουν ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 8: Πρωτεϊνικά επίπεδα της Hsp70 σε μυοβλάστες C2C12, μετά από 24ωρη και 48ωρη έκθεση σε D- γαλακτόζη σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml. Οι λόγοι (Ratio) προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών της Hsp70 με την αντίστοιχη της β-ακτίνης, μέσω του προγράμματος Image J.

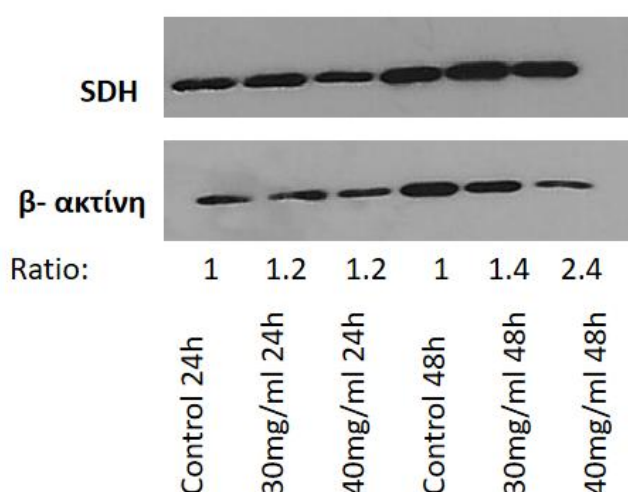


Διάγραμμα 2: Οι κανονικοποιημένες μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Hsp70, που προκύπτουν από επώαση των μυοβλαστών C1C12 με D-γαλακτόζη σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml. Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με την βοήθεια του Microsoft Excel.

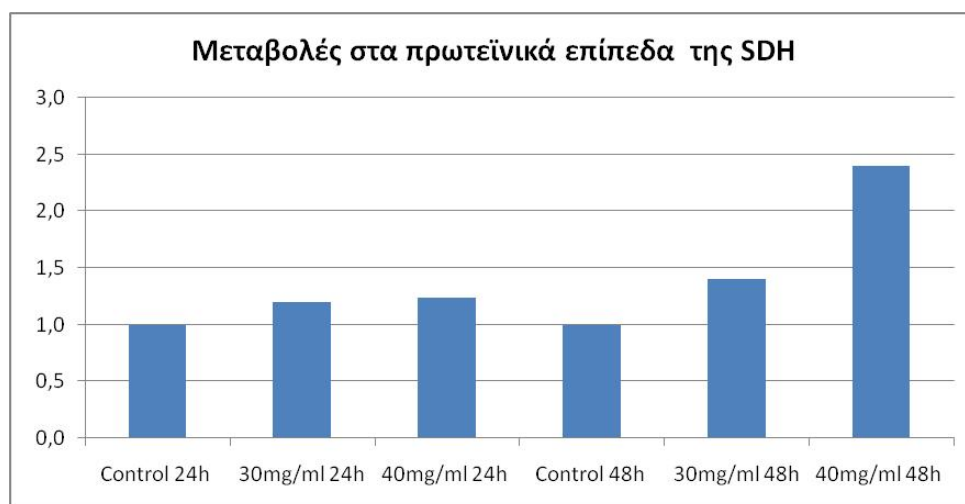
3.3 Διερεύνηση των επιπέδων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH) σε μυοβλάστες C2C12 που έχουν επωαστεί με D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες.

Τελευταίος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας, είναι να διερευνηθούν οι μεταβολές στα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH), έπειτα από επώαση των μυοβλαστών C2C12 με 30mg/ml και 40mg/ml D- γαλακτόζη για 24 και 48 ώρες. Οι μεταβολές παρουσιάζονται στην Εικόνα 9 και στο Διάγραμμα 3 που ακολουθούν.

Συγκεκριμένα, στις συνθήκες 30mg/ml και 40mg/ml 24h παρατηρείται αύξηση της έντασης της πρωτεϊνικής ζώνης SDH κατά 20%. Έπειτα, στις συνθήκες 30mg/ml και 40mg/ml 48h η ένταση της πρωτεϊνικής ζώνης αυξάνεται ακόμη περισσότερο, κατά 40%. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η χορήγηση της D- γαλακτόζης σε μυοβλάστες C2C12 επιφέρει αύξηση στην έκφραση των μιτοχονδριακών ενζύμων, που πιθανόν υποδεικνύει αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων, παρατήρηση που συμφωνεί με παρατηρήσεις σε μοντέλα κυτταρικής γήρανσης σε νηματοειδές *C. elegans* (Palikaras, Lionaki, & Tavernarakis, 2015).



Εικόνα 9: Πρωτεϊνικά επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH) σε μυοβλάστες C2C12, μετά από 24ωρη και 48ωρη έκθεση σε D- γαλακτόζη στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Οι λόγοι (Ratio) προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών της SDH με την αντίστοιχη της β-ακτίνης, μέσω του προγράμματος Image J.



Διάγραμμα 3: Οι μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH, που προκύπτουν από επώαση των μυοβλαστών C1C12 με D-γαλακτόζη σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml κανονικοποιημένες ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα β ακτίνης. Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με την βοήθεια του Microsoft Excel.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία, στοχεύει στην αξιολόγηση της επίδρασης που έχει η χορήγηση D- γαλακτόζης, παράγοντας επαγωγής γήρανσης, σε μυοβλάστες C2C12. Συγκεκριμένα, η D- γαλακτόζη αποτελεί έναν προσομοιωτή επαγωγής κυτταρικής γήρανσης σε κυτταρικό επίπεδο και αποτελεί χρήσιμο μοντέλο επαγωγής κυτταρικής γήρανσης για τη διερεύνηση των μηχανισμών που την διέπουν. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν οι μεταβολές σε επίπεδο πρωτεϊνών θερμικού σοκ Hsp70 και της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού (SDH). Οι συγκεκριμένοι παράγοντες (Hsp70 και SDH) επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν κρίσιμους παράγοντες της διατήρησης της σωστής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και παραγόντων που σχετίζονται με αυτό όπως οξειδωτικού στρες και απόπτωση.

Αναλυτικότερα, η Hsp70 είναι μια από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins) (Mayer et al. 2005). Η έκφρασή της επάγεται σε συνθήκες θερμικού και μεταβολικού στρες και συμβάλλει στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων και γενικότερα στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (Clerico et al., 2019). Επιπλέον, σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως οι μύες, παρατηρείται μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ κατά την γήρανση, γεγονός που υποδεικνύει την

αδυναμία την κυττάρων να ανταπεξέλθουν στις δυσμενείς συνθήκες και να φροντίσουν για την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Αντίθετα, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη έκφραση των HSPs ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες και αμυντικό μηχανισμό στην αλλοίωση των πρωτεϊνικών δομών (Murshid, Eguchi, & Calderwood, 2013). Σε κάθε περίπτωση, στο πλαίσιο της κυτταρικής γήρανσης που προσομοιώνεται με την χορήγηση D- γαλακτόζης, είναι πιθανό, και ίσως αναμενόμενο, σε πιο προχωρημένο στάδιο να επάγεται μείωση της έκφρασης της Hsp70, λόγω εξάντλησης των αμυντικών μηχανισμών του κυττάρου.

Έπειτα, μελετάται η έκφραση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού ή αλλιώς SDH. Πρόκειται για ένα ένζυμο-κλειδί για τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό που ανήκει στο σύμπλοκο II της μιτοχονδριακής αλυσίδας. Συνεπώς, η ενεργότητά του αποτελεί έναν δείκτη της κυτταρικής ακεραιότητας και βιωσιμότητας. Δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι η χορήγηση κυττάρων με D- γαλακτόζη επιφέρει βλάβες στην λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, είναι πιθανόν να προκαλεί αύξηση της έκφρασης των μιτοχονδριακών ενζύμων όπως η SDH, ως έναν έκτακτο μηχανισμό αντιστάθμισης κυττάρου έναντι στην προκληθείσα βλάβη. Η αύξηση των επιπέδων της πιθανόν να υποδηλώνει αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μοντέλα κυτταρικής γήρανσης όπως το νηματοειδές *C. elegans* (Palikaras, Lionaki, & Tavernarakis, 2015).

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT, έδειξαν σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από 24 ώρες επώασης με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις D- γαλακτόζης (30mg/ml και 40mg/ml). Τα παραπάνω δρουν ως ένδειξη της κυτταρικής καταπόνησης που επάγει η χορήγηση D- γαλακτόζης, μέσω παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και πρόκλησης οξειδωτικού στρες, και επιβεβαιώνουν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε πειραματικά μοντέλα επαγωγής κυτταρικής γήρανσης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των βιβλιογραφικών αναφορών ως προς την κυτταροτοξική δράση της συγκεκριμένης ουσίας, επιβεβαιώνονται περαιτέρω (Azman, K. F., & Zakaria, R. 2019).

Στην συνέχεια, μελετάται η επίδραση της χορήγησης D- γαλακτόζης στην έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων (Hsp70 και SDH), μέσω της ανοσοαποτύπωσης Western Blot. Όσον αφορά την Hsp70, παρατηρείται σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της στις συνθήκες 30mg/ml και 40mg/ml 48h. Ωστόσο, στις συνθήκες των 24h δεν φαίνονται σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο χρόνος επώασης με την ουσία που επάγει κυτταρική γήρανση διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην έκφραση του συγκεκριμένου μορίου.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, αποτελούν ενδεικτικούς παράγοντες ότι, πράγματι, η επώαση των μυοβλαστών C2C12 με D- γαλακτόζη επιφέρει επιβλαβείς επιπτώσεις στην κυτταρική ακεραιότητα, με αποτέλεσμα η ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, που αποτελεί βασική λειτουργία των Hsp, να μην επιτελείται σε επαρκές επίπεδο και να συμβάλει στην κυτταρική γήρανση, διαταράσσοντας την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Ωστόσο, ενώ δεν αποκλείεται σε σύντομες περιόδους καταπόνησης η πρόκληση οξειδωτικού στρες να επάγει την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Murshid, Eguchi, & Calderwood, 2013), φαίνεται ότι το συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο των 48h αποτελεί το σημείο εξάντλησης του κυττάρου και απώλειας της πρωτεϊνικής ομοιόστασης. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η Hsp70 αποτελεί πράγματι έναν δυναμικό δείκτη του κυτταρικού στρες, και τα επίπεδα της ενδεχομένως μεταβάλλονται ανάλογα με την διάρκεια και την ένταση της καταπόνησης που οδηγούν σε κυτταρική γήρανση.

Αντίστοιχα, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταβαλλόμενη έκφραση της SDH σε συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με επώαση των μυοβλαστών C2C12 με D- γαλακτόζη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western Blot, η έκφραση της SDH αυξάνεται στις συνθήκες 30mg/ml και 40mg/ml, τόσο στις 24h όσο και στις 48h. Ωστόσο, όπως αναμένεται η αύξηση έκφρασης είναι μεγαλύτερη στο δεύτερο χρονικό πλαίσιο (20% και 40% αντίστοιχα).

Σε μια απόπειρα ερμηνείας των παραπάνω δεδομένων, η αυξημένη ένταση πρωτεϊνικών ζωνών στις συνθήκες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης δικαιολογείται απόλυτα, αν λάβει κανείς υπόψιν τον καίριο ρόλο της SDH στον μιτοχονδριακό μεταβολισμό και στην κυτταρική ακεραιότητα. Αναλυτικότερα, πρόκειται για ένα ένζυμο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στον κύκλο του Krebs όσο και στην αναπνευστική αλυσίδα. Επομένως, η αυξημένη παρουσία και ενεργότητά του υποδεικνύει μια πιθανή απόπειρα του κυττάρου να επιτύχει μια προσαρμοστική απόκριση. Με ενίσχυση της ενεργειακής απόδοσης και της μιτοχονδριακής λειτουργίας, πιθανόν το κύτταρο αντισταθμίζει το κυτταρικό στρες που υφίσταται και προσπαθεί να ανταπεξέλθει στις δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν. Τα παραπάνω, επιβεβαιώνουν την δήλωση των Zakharchenko et al. (2012), ότι σε πρώιμα στάδια καταπόνησης, τα κύτταρα ενεργοποιούν περεταίρω την μιτοχονδριακή λειτουργία, πριν εγκατασταθούν πλήρως τα αποτελέσματα της καταπόνησης. Συνεπώς, η αυξημένη έκφραση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού μπορεί να ερμηνευθεί ως μια προσπάθεια αντιστάθμισης του κυτταρικού στρες και διατήρησης της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Επίσης, η έκφραση των επιπέδων της SDH πιθανόν να υποδηλώνει αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μοντέλα κυτταρικής

γήρανσης όπως το νηματοειδές *C elegans* (Palikaras, Lionaki, & Tavernarakis, 2015). Συγκεκριμένα, σε συνθήκες στρες και γήρανσης παρατηρείται σταδιακή απορρύθμιση της μιτοφαγίας, γεγονός που οδηγεί σε συσσώρευση μιτοχονδρίων και αύξηση της συνολικής μιτοχονδριακής μάζας. Αυτή η αύξηση, ενδέχεται να αποτελεί έναν αντιρροπιστικό μηχανισμό μέσω του οποίου το κύτταρο επιχειρεί να διατηρήσει την μεταβολική ισορροπία και την ακεραιότητά του. Καθώς η SDH αποτελεί βασικό συστατικό της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, η αυξημένη έκφρασή της μπορεί να αντικατοπτρίζει όχι μόνο αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, αλλά και την παρουσία περισσότερων μιτοχονδρίων, ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ μιτογένεσης και μιτοφαγίας.

Συνοψίζοντας, τόσο η Hsp70 όσο και η SDH αποτέλεσαν χρήσιμους δείκτες για την μελέτη της επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης με την χορήγηση D-γαλακτόζης σε μυοβλάστες C2C12. Επιπλέον, συνέβαλλαν στην καλύτερη κατανόηση του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης και των διφορούμενων αποκρίσεων που μπορεί να προκληθούν στο κύτταρο. Τέλος, οι μεταβολές στην έκφραση τους αποδεικνύουν την χρησιμότητα του *in vitro* μοντέλου επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης για τη μελέτη μηχανισμών που σχετίζονται με τη γήρανση σε μυϊκό ιστό και την κυτταρική γήρανση.

Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εστιάσουν στην χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων D-γαλακτόζης ως χορηγούμενη ουσία στα κύτταρα, ή να τροποποιήσουν τα χρονικά πλαίσια έκθεσης. Έτσι, πιθανώς να διερευνηθεί μια πορεία αρχικής αύξησης και έπειτα μείωσης έκφρασης της Hsp70. Παράλληλα, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη περισσότερων δεικτών της μιτοχονδριακής ακεραιότητας, πέραν από την SDH, ώστε να αποδοθεί μια πληρέστερη εικόνα της σύνδεσης μεταξύ ενεργειακού μεταβολισμού και κυτταρικής γήρανσης. Τέλος, στα παραπάνω πλαίσια, θα μπορούσαν να μελετηθούν πιθανοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που να συμβάλλουν στην πρόληψη της εγκατάστασης του φαινομένου κυτταρικής γήρανσης από D-γαλακτόζη. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα στην βαθύτερη κατανόηση του περίπλοκου φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης και να συμβάλει στην εύρεση αποτελεσματικών μηχανισμών πρόληψής της.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Azman, K. F., & Zakaria, R. (2019). D-Galactose-induced accelerated aging model: An overview. *Biogerontology*, 20(6), 763–782.
2. Bezawork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., Pacak, K., & Neuzil, J. (2020). Mitochondrial Complex II: At the crossroads. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 121, 105710.
3. Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047–1078.
4. Cappello, F., Macario, E. C., Marino Gammazza, A., Bonaventura, G., Carini, F., Czarnecka, A. M., Farina, F., Zummo, G., & Macario, A. J. L. (2013). Hsp60 and human aging: Les liaisons dangereuses. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18, 626–637.
5. Clerico, E. M., Meng, W., Pozhidaeva, A., Bhasne, K., Petridis, C., & Gierasch, L. M. (2019). Hsp70 molecular chaperones: Multifunctional allosteric holding and unfolding machines. *Cell Stress & Chaperones*, 24(5), 825–839.
6. Clerico, E. M., Meng, W., Pozhidaeva, A., Bhasne, K., Petridis, C., & Gierasch, L. M. (2021). Hsp70 molecular chaperones: Multifunctional allosteric holding and unfolding machines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(6), 129971.
7. Courtois-Cox, S., Jones, S. L., & Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 27(20), 2801–2809.
8. Gutschmann-Conrad, A., Heydari, A. R., You, S., & Richardson, A. (1998). The expression of heat shock protein 70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects. *Experimental Cell Research*, 241(2), 404–413.
9. Hoter, A., El-Sabban, M. E., & Naim, H. Y. (2018). The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 10.
10. Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., & Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Reports Medicine*, 3(8), 100677.
11. Kamal, M., Joannis, S., & Parise, G. (2023). Bleomycin-treated myoblasts undergo p21-associated cellular senescence and have severely impaired differentiation. *GeroScience*, 45(6), 2445–2461.
12. Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8), 579–592.
13. Kityk, R., Kopp, J., & Mayer, M. P. (2018). Molecular mechanism of J-domain-triggered ATP hydrolysis by Hsp70 chaperones. *Molecular Cell*, 69(2), 227–237.e4.
14. Liou, C. M., Tsai, S. C., Kuo, C. H., Ting, H., & Lee, S. D. (2014). Cardiac Fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis after chronic cocaine abuse. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 5988–6001.
15. Luo, W., Sun, W., Taldone, T., Rodina, A., & Chiosis, G. (2010). Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration*, 5, Article 24.
16. Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670–684.
17. Moosavi, B., Berry, E. A., Zhu, X.-L., Yang, W.-C., & Yang, G.-F. (2023). The assembly of succinate dehydrogenase: A key enzyme in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1864(1), 148866.

18. Murshid, A., Eguchi, T., & Calderwood, S. K. (2013). Stress proteins in aging and life span. *International Journal of Hyperthermia*, 29(5), 442–447.
19. Nicolae, C. M., O'Connor, M. J., Constantin, D., & Moldovan, G.-L. (2018). NFκB regulates p21 expression and controls DNA damage-induced leukemic differentiation. *Oncogene*, 37(27), 3647–3656.
20. Pahlavani, M. A., Harris, M. D., Moore, S. A., Weindruch, R., & Richardson, A. (1995). The expression of heat shock protein 70 decreases with age in lymphocytes from rats and rhesus monkeys. *Experimental Cell Research*, 219(2), 339–347.
21. Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2015). Coupling mitogenesis and mitophagy for longevity. *Autophagy*, 11(8), 1428–1430.
22. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, & L. Minor (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
23. Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). Mechanisms and regulation of cellular senescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75–95.
24. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell*, 88(5), 593–602.
25. Sin, J., Andres, A. M., Taylor, D. J. R., Weston, T., Hiraumi, Y., Stotland, A., Kim, B. J., Huang, C., Doran, K. S., & Gottlieb, R. A. (2016). Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy*, 12(2), 369–380.
26. Singh, M. K., Shin, Y., Ju, S., Han, S., Choe, W., Yoon, K.-S., Kim, S. S., & Kang, I. (2024). Heat shock response and heat shock proteins: Current understanding and future opportunities in human diseases (N. Nikolaidis, Ed.). *International Journal of Molecular Sciences*.
27. Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043–1057.
28. Sweeney, H. L., & Hammers, D. W. (2018). Muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), a023200.
29. Tian, S., Zhao, H., Guo, H., Feng, W., Jiang, C., & Jiang, Y. (2023). Propolis ethanolic extract attenuates D-gal-induced C2C12 cell injury by modulating Nrf2/HO-1 and p38/p53 signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6408.
30. Wang, H.-H., Sun, Y.-N., Qu, T.-Q., Sang, X.-Q., Zhou, L.-M., Li, Y.-X., & Ren, F.-Z. (2022). Nobiletin prevents D-galactose-induced C2C12 cell aging by improving mitochondrial function. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11963.
31. Wang, S.-S., Zhang, X., Ke, Z.-Z., Wen, X.-Y., Li, W.-D., Liu, W.-B., Zhuang, X.-D., & Liao, L.-Z. (2022). D-galactose-induced cardiac ageing: A review of model establishment and potential interventions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(21), 5332–5344.
32. Whitesell, L., & Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 761–772.
33. Zakharchenko, M. V., Zakharchenko, A. V., Khunderyakova, N. V., Tutukina, M. N., Simonova, M. A., Vasilieva, A. A., Romanova, O. I., Fedotcheva, N. I., Litvinova, E. G., Maevsky, E. I., Zinchenko, V. P., Berezhnov, A. V., Morgunov, I. G., Gulayev, A. A., & Kondrashova, M. N. (2012). Burst of succinate dehydrogenase and α-ketoglutarate dehydrogenase activity in concert with the expression of genes coding for respiratory chain proteins underlies short-term beneficial physiological stress in

6. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες στην δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα. Η υποστήριξή της, η καθοδήγηση και οι επιστημονικές της γνώσεις αποτέλεσαν σημαντικό στήριγμα σε κάθε στάδιο της πτυχιακής εργασίας μου και συνέβαλαν ουσιαστικά στην εξέλιξή μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον δρ. Λεωνίδα Δημήτριο και τη δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, για την επιστημονική τους καθοδήγηση και τη καίρια συμβολή τους στη μαθησιακή μου πορεία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σταυρούλα Σουϊλεμέζη, μέλος της ίδιας ερευνητικής ομάδας, για την πολύτιμη βοήθεια, τη διαρκή διάθεση για συνεργασία και τη στήριξη που μου παρείχε σε καθημερινή βάση. Η παρουσία της στο πλευρό μου έκανε τη διαδικασία της εργαστηριακής απασχόλησης πιο κατανοητή και δημιουργική. Ευχαριστώ επίσης θερμά τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την καλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους φίλους μου, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου και με ενθάρρυναν σε κάθε βήμα αυτής της απαιτητικής διαδρομής, δείχνοντας κατανόηση και υπομονή. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στην οικογένειά μου για την αδιάλειπτη αγάπη, τη συμπαράσταση και τη δύναμη που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια.