



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ  
ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**ΣΥΝΟΜΙΛΙΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΣΤΡΕΣ  
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Ι ΤΗΣ  
ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

Περικλής Μιχαηλίδης, Νοσηλευτής, ΑΜ: 7113042000020  
Στραβοπόδης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας  
Κυττάρου & Ανάπτυξης

Αθήνα

2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
(ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑΣ), ΑΘΗΝΑ, 2022

ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΒΟΥΤΣΙΝΑΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α΄, ΑΘΗΝΑ, 2022

ΈΜΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΟΥ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ΄, ΑΘΗΝΑ, 2022

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

## Ελληνική Περίληψη

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μία μιτοχονδριακή λειτουργία, η οποία αποτελεί μία θεμελιώδη και ταυτόχρονα άκρως απαραίτητη διαδικασία για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Διάφοροι χημικοί παράγοντες, όπως η ροτενόνη, μπορούν να προκαλέσουν αναστολή του πρώτου συμπλόκου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με σκοπό τη μεγαλύτερη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Απότοκο του ανωτέρω είναι η ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, εξαιτίας της δημιουργίας και συσσώρευσης βλαβών στο γενετικό υλικό και στις πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων.

Τα κύτταρα, ωστόσο, δύνανται να αναγνωρίσουν και να ανταποκριθούν στην εν λόγω μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ενεργοποιώντας τέσσερεις μηχανισμούς ανταπόκρισης σε στρες. Ο λόγος για τη μιτοχονδριακή ανταπόκριση κατά τη μη ορθή αναδίπλωση πρωτεϊνών (mitochondrial Unfolded Protein Response, MTUPR), την ολοκληρωμένη ανταπόκριση σε στρες (Integrated Stress Response, ISR), την κυτοσολική ανταπόκριση σε στρες θερμικού σοκ (Heat Shock Response, HSR) και την αντιοξειδωτική ανταπόκριση σε στρες (Antioxidant Stress Response, ASR). Στην ουσία, πρόκειται για την ενεργοποίηση γονιδίων, των οποίων η δράση αφορά τη διευθέτηση των προβλημάτων και την εν γένει αποκατάσταση της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης.

Στόχο της συγκεκριμένης διπλωματικής μεταπτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη της ενδεχόμενης επαγωγής των τεσσάρων προηγούμενων μηχανισμών ανταπόκρισης υπό την παρουσία στρες μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, η οποία οφείλεται στην παραγωγή περίσσειας ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η αναστολή του πρώτου συμπλόκου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα οργανίδια αυτά, έλαβε χώρα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, ινοσαρκώματος (HT1080) και μελανώματος (WM266-4), με τη βοήθεια του χημικού παράγοντα ροτενόνη. Το χημικό αυτό προξενεί σημαντική μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μέσω της επαγωγής της δημιουργίας οξειδωτικού στρες.

Στην ουσία, η μελέτη της επίδρασης της ροτενόνης εστίασε στην έκφραση των γονιδίων σε επίπεδο μεταγραφώματος αυτών των μηχανισμών απάντησης σε μιτοχονδριακό στρες. Όπως είναι φυσικό, βέβαια, το κύτταρο επιδιώκει να ανταποκριθεί σε αυτό και κατ' επέκταση να το καταπολεμήσει. Σε αντίθετη περίπτωση, οι μιτοχονδριακές βλάβες οι οποίες υφίστανται λόγω

αυτής της μορφής κυτταρικού στρες, είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα καθιστούν απειλητικό παράγοντα για την επιβίωσή τους.

Διαπιστώθηκε πως ο χημικός μας παράγοντας ήταν σε θέση να ενεργοποιήσει όλα τα γονίδια ενδιαφέροντος για την ανά χείρας εργασία, τα οποία εμπλέκονται στους τέσσερις προαναφερόμενους μηχανισμούς (ISR, MTUPR, HSR και ASR) και στους δύο τύπους κυττάρων. Αντίθετα, μοναδική εξαίρεση υπήρξε στην κυτταρική σειρά του ινোসαρκώματος, στην οποία δε βρέθηκε ικανοποιητική μεταγραφή του γονιδίου της *LONP-1* (*LON Peptidase 1-LONP-1*), γονίδιο το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι του μιτοχονδριακού UPR. Παρ' όλα αυτά, δεν πρέπει να υποτιμηθεί το γεγονός πως η τοξικότητα στα κύτταρα αυτά, ήταν εμφανής.

Τέλος, τα δεδομένα, τα οποία μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα εργασία είναι πως η ροτενόνη αποτελεί έναν ικανό χημικό παράγοντα για την ενεργοποίηση των ακολούθων μονοπατιών, του μιτοχονδριακού UPR, του ISR, του HSR και τέλος του ASR στις υπό μελέτη καρκινικές κυτταρικές σειρές (HT1080) και (WM266-4), ινোসαρκώματος καθώς και μελανώματος, αντίστοιχα. Γεγονός, το οποίο δηλώνει πως η ροτενόνη αποτελεί έναν ικανό χημικό, το οποίο δύναται να χρησιμοποιηθεί ως πιθανή φαρμακευτική ουσία ή να συμπεριληφθεί ως συνδυασμός μαζί με άλλους φαρμακευτικούς παράγοντες για θεραπεία κατά του καρκίνου.

**Λέξεις-κλειδιά:** σύμπλοκο I, ροτενόνη, στρες, πρωτεόσταση

## Αγγλική Περίληψη

Oxidative phosphorylation is a mitochondrial function, which is a fundamental and at the same time highly necessary process for the proper functioning of cells. Various chemical agents, such as rotenone, can cause inhibition of the first complex of the electron transport chain, with the aim of greater production of reactive oxygen species (ROS). A consequence of the above is the reduction of mitochondrial function, due to the creation and accumulation of damage to the genetic material and proteins of the mitochondria.

Cells, however, can recognize and respond to this mitochondrial dysfunction by activating four stress response mechanisms. This concerns the mitochondrial unfolded protein response (MTUPR), the integrated stress response (ISR), the cytosolic heat shock response (HSR) and the antioxidant stress response (ASR). It is all about the activation of genes, whose action concerns the settlement of problems and the general restoration of mitochondrial proteostasis.

The aim of this specific master's thesis is to study the possible induction of the four previous response mechanisms in the presence of misfolded protein stress, which is due to the production of excess oxygen free radicals. The inhibition of the first complex of oxidative phosphorylation in these organelles, took place in the cancer cell lines, fibrosarcoma (HT1080) and melanoma (WM266-4), with the help of the chemical agent rotenone. This chemical causes significant mitochondrial dysfunction by inducing the generation of oxidative stress.

In other words, the study of the effect of rotenone focused on the gene expression at the transcriptome level of these mitochondrial stress response mechanisms. Naturally, of course, the cell seeks to respond to this and fight it. Otherwise, the mitochondrial damage that occurs due to this form of cellular stress is particularly harmful to the proper functioning of the cells, while at the same time becoming a threatening factor for their survival.

It was found that our chemical agent was able to activate all the genes of interest for the task, which are involved in the four mechanisms (ISR, MTUPR, HSR and ASR) in both cell types. On the contrary, the only exception was in the fibrosarcoma cell line, in which no satisfactory transcription of the LONP-1 gene was found, a gene involved in the mitochondrial UPR pathway. Nevertheless, the fact that the toxicity in these cells was evident should not be underestimated.

Finally, the data that can be extracted from the present work is that rotenone is a capable chemical agent for the activation of the following pathways, the mitochondrial UPR, the ISR, the HSR and finally the ASR in the cancer cell lines under study (HT1080) and (WM266-4), fibrosarcoma as well as melanoma, respectively. This fact, which indicates that rotenone is a capable chemical, which can be used as a potential drug substance or included as a combination together with other drug agents for cancer treatment.

**Keywords:** complex I, rotenone, stress, proteostasis

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---



Η βασική έρευνα στην τομέα της Βιολογίας έχει γνωρίσει μεγάλη άνθηση τον τελευταίο αιώνα και συνεχίζει να σημειώνει πρόοδο πάνω στην πολύ αυτή μικρή μονάδα ζωής, η οποία ονομάζεται κύτταρο και στους μηχανισμούς που τη διέπουν.

Το παρόν έργο σε αυτήν τη μορφή αποτέλεσε μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία με αντικείμενο τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, η οποία παρατηρείται σε διαφορετικά μονοπάτια ανταπόκρισης σε στρεσογόνες συνθήκες κατά τη μη ορθή πρωτεϊνική αναδίπλωση που συμβαίνει από τη μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, εξαιτίας της αναστολής του πρώτου συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας.

Είναι υψίστης σημασίας να τονιστεί, ώστε να γίνει αντιληπτό ότι, όσον αφορά στο πλαίσιο και στους άξονες της βιολογικής έρευνας, κρίνεται άκρως αναγκαία η κριτική σκέψη, η υπομονή, η ακρίβεια, ο επιστημονικός ανθρωπισμός καθώς και η κατανόηση των εργαστηριακών τεχνικών και των βιολογικών συστημάτων, μιας και σε αυτά στηρίζονται τα ερευνητικά αποτελέσματα, και, υπό αυτήν την έννοια η εξέλιξη και η πρόοδος της έρευνας.

Για τη συγγραφή αυτής της εργασίας, οφείλω πολλά στον κύριο Βουτσινά Γεράσιμο, τον κύριο Στραβοπόδη Δημήτριο και στην κυρία Αναστασιάδου Έμα, οι οποίοι με παρότρυναν να ασχοληθώ με το εν λόγω και πολλά υποσχόμενο αυτό θέμα, ενώ υπήρξαν ακοίμητοι φρουροί για την εξασφάλιση της ομαλής διεξαγωγής του επιστημονικού αυτού έργου, ενώ παρακολούθησαν ακάματα και με ιδιαίτερη ευαισθησία και ενσυναίσθηση την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

# **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

---

Ολοκληρώνοντας την εν λόγω διπλωματική εργασία, αναπόφευκτα φτάνει στο τέλος του ένα ταξίδι δύο χρόνων. Βέβαια, δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ελαφρά τη καρδία με έναν απλό επιθετικό προσδιορισμό, επειδή θα ήταν άδικος και καθόλα ανεπαρκής. Η εκπαιδευτική μου αυτή διαδρομή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί δίχως το διετές πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με τίτλο «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική. Μέσω αυτής μου της πορείας, αναφορικά με τον κόσμο της βιολογίας, ο θεωρητικός μου οπλισμός ενισχύθηκε, ενώ ο πρακτικός γιγαντώθηκε σε τέτοιο βαθμό που μου επέτρεψε να καταφέρω να ωριμάσω γνωστικά, αλλά και ερευνητικά.

Κρίνεται απαραίτητο να ευχαριστήσω προσωπικώς όλους του καθηγητές, τους επιστήμονες καθώς, τους συνεργάτες και σε όσα άτομα έβαλαν το λιθαράκι τους προκειμένου να υπάρξει αυτό το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, διότι προσφέρει στους εκάστοτε συμμετέχοντες να εξελιχθούν σε μελλοντικούς επιστήμονες της γενιάς τους. Επιπροσθέτως, ένα θερμό ευχαριστώ δικαιωματικά ανήκει στην κυρία Αναγνωστοπούλου, η οποία παρά τις αρκετές αντιξοότητες κατάφερε να είναι η ψυχή του εν λόγω προγράμματος με το να συντονίζει και να ρυθμίζει τις καταστάσεις, ώστε όλα να κυλούν εύρυθμα και ανεμπόδιστα.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να αφιερώσω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον κύριο Δημήτριο Στραβοπόδη, Αναπληρωτή Καθηγητή και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας. Πάντοτε πρύθυμος και βοηθητικός, κατάφερε να παρέχει καθοριστική βοήθεια σε ζητήματα, τα οποία προέκυπταν, με σκοπό να εξασφαλιστεί η ομαλή διεξαγωγή της εργασίας και της συνεργασίας μας.

Εν συνεχεία, ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει δίκαια στην κυρία Έμα Αναστασιάδου ερευνήτρια Γ, η οποία δέχθηκε να αποτελέσει το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής. Δίχως τη συμμετοχή της και το προσωπικό ενδιαφέρον της δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία.

Ωστόσο, οι μεγαλύτερες ευχαριστίες μου αφορούν έναν κύριο, του οποίου η συνεισφορά ωρίμασε εμένα προσωπικά ως εκκολαπτόμενο επιστήμονα, αλλά και ως άνθρωπο. Ο λόγος για τον Ερευνητή Α' και υπεύθυνο του εργαστηρίου Μοριακής Καρκινογένεσης και Γενετικής Σπανίων Παθήσεων, Δρ. Γεράσιμο Βουτσινά. Λίγοι άνθρωποι με το κύρος του κύριου Βουτσινά θα δέχονταν στο εργαστήριό τους και θα εμπιστεύονταν έναν μεταπτυχιακό φοιτητή, όπως έκανε ο ίδιος με μεγάλη προθυμία και ευχαρίστηση. Οι συμβουλές του, το προσωπικό του ενδιαφέρον,

η προθυμία και η ευγενική φύση του κύριου Βουτσινά αποτέλεσαν τα χαρακτηριστικά, τα οποία προσέφεραν στην εργασία μία πιο επιστημονική διάσταση και σε εμένα τη χαρά και την τιμή να συναναστρέφομαι με έναν άνθρωπο με μεγάλη ευγένεια ψυχής.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω βέβαια τον τεχνικό του εργαστηρίου μας, τον κύριο Σωκράτη Αυγέρη, ο οποίος ήταν πάντοτε πρόθυμος να μου προσφέρει πληροφορίες και χρήσιμες συμβουλές που ενίσχυσαν την εκμάθησή μου στις πειραματικές τεχνικές.

Ολοκληρώνοντας θα επιθυμούσα να εκφράσω το πιο μεγάλο και θερμό ευχαριστώ στην οικογένειά μου. Αν και η στήριξη, η οποία μου έχει προσφερθεί και συνεχίζει να μου παρέχει δεν ανταποδίδεται με ευχαριστίες, δηλώνω πως είμαι κάτι περισσότερο από ευγνώμων και τυχερός για τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Όλγα καθώς και για την αδελφή μου Ελένη-Μαρία, οι οποίοι επενδύουν σε εμένα και κατ' επέκταση στα όνειρα, στους στόχους και στις φιλοδοξίες μου. Τους αγαπώ και τους ευχαριστώ με θέρμη και ταυτόχρονα ελπίζω να καταφέρω να τους ανταποδώσω έστω και ένα τμήμα από την αγάπη και τη στήριξη που τόσο απλόχερα έχω λάβει!

Μιχαηλίδης Περικλής

Αθήνα, Οκτώβριος 2022

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ .....	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	20
1.1 Γενικά για τα Μιτοχόνδρια.....	21
1.2 Μορφολογία-Δομή Μιτοχονδρίου .....	21
1.3 Προέλευση Μιτοχονδρίου.....	23
1.4 Λειτουργία Μιτοχονδρίων .....	24
1.4.1 Παραγωγή Ενέργειας .....	24
1.4.2 Μιτοχονδριακό Γενετικό Υλικό.....	29
1.4.3 Μιτοχονδριακό ριβοσωμικό RNA .....	30
1.4.4 Μιτοχονδριακό μεταφορικό RNA .....	30
1.4.5 Μιτοχονδριακό Αγγελιοφόρο RNA .....	31
1.4.6 Μιτοχόνδρια και αντιγραφή μιτοχονδριακού DNA.....	31
1.5 Μιτοχόνδρια και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.....	33
1.6 Οξειδωτικό stress.....	36
1.7 Δραστικές ρίζες οξυγόνου-ROS .....	36
1.8 Μιτοχόνδρια και Ασθένειες .....	37
1.9 Συστήματα Ανταπόκρισης σε Στρες.....	38
1.9.1 Ολοκληρωμένη Ανταπόκριση σε Στρες (Integrated Stress Response-ISR) ....	38
1.9.2 Μιτοχονδριακή Απόκριση Μη Αναδιπλωμένων Πρωτεϊνών (MTUPR).....	44
1.9.3 Απόκριση Θερμικού Σοκ (Heat Shock Response-HSR) .....	52
1.9.4 Αντιοξειδωτική Απόκριση (Antioxidant Response) .....	54
1.10 Καρκίνος και MTUPR.....	56
1.11 Θεραπεία κατά του καρκίνου και MTUPR.....	57
1.12 Ροτενόνη και Παραγωγή ROS.....	58
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	60
2.1 ΣΚΟΠΟΣ .....	61
Υλικά και Μέθοδοι.....	62
3.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	63

3.1.1	Κυτταρικές Σειρές .....	63
3.1.2	Διατήρηση και Ανακαλλιέργεια .....	63
3.1.3	Κατάψυξη και Απόψυξη Κυττάρων.....	65
3.1.4	Χημικοί Παράγοντες.....	67
3.1.5	Μελέτη RNA .....	67
3.1.6	Ποσοτικοποίηση και Έλεγχος Ποιότητας RNA.....	68
3.1.7	Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription - RT).....	70
3.1.8	Ποσοτική PCR (Quantitative PCR – qPCR) .....	71
3.1.9	Στατιστική Ανάλυση.....	74
3.1.10	Ανάλυση MTT.....	74
3.2	Εργαστήριο και Εξοπλισμός .....	76
3.2.1	Συσκευές.....	76
3.2.2	Γυάλινα και Πλαστικά Είδη .....	77
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>		<b>78</b>
4.1	Αποτελέσματα .....	79
4.2	Δοκιμασία MTT .....	79
4.2.1	MTT για τα HT1080 .....	79
4.2.2	MTT για τα WM266-4 .....	80
4.3	Μελέτη έκφρασης μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες ροτενόνης με τη χρήση qPCR.....	81
4.3.1	Μελέτη έκφρασης μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες ροτενόνης σε κύτταρα ινοσαρκώματος HT1080 με τη χρήση qPCR .....	81
4.3.2	Μελέτη έκφρασης μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες ροτενόνης σε κύτταρα μεταστατικού μελανώματος WM266-4 με τη χρήση qPCR .....	86
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>		<b>92</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>		<b>97</b>

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

---

AAA+	ATPases Associated with Diverse Cellular Activities
ACTB	Beta-Actin
ADP	Adenosine Diphosphate
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF 1	Apoptotic protease activating factor 1
ARE	Antioxidant Response Elements
ATFS 1	Stress Activated Transcription Factor 1
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosine Triphosphate
BCL2	B-cell lymphoma 2
BRAF	proto-oncogene B-Raf and v-Raf murine sarcoma
BZIP	Basic Leucine Zipper Domain
CARE	C/EBP ATF Response Element
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CRYAB	Alpha-crystallin B chain
CYTHSP	Cytosolic Heat Shock Protein
$\Delta$ OTC	Ornithine Transcarbamylase
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EIF	translation initiation factor 2



EIF2 $\alpha$	eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ER	Endoplasmic Reticulum
ERO	Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase
ETC	Electron Transport Chain
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FADD	FAS-associated protein with death domain
FADH	Flavin Adenine Dinucleotide Hydride
FBS	Fetal bovine serum
FMN	Flavin Mononucleotide
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34-
GCN	General Control Nonderepressible 2
HMOX1	Heme Oxygenase 1
HO-1	Heme Oxygenase 1
HRI	Heme - Regulated Inhibitor
HSF 1	Heat Shock Factor 1
HSF	Heat shock transcription factors
HSP70	Heat-Shock Cognate Protein
HSP	Heavy Strand Promoter
HSR	Heat Shock Response
IMM	Inner Mitochondrial Membrane
ISR	Integrated Stress Response
JNK	c-Jun N-terminal Kinases

LONP-1	LON Peptidase 1
LSP	Light Strand Promoter
mtSSB	mitochondrial Single Stranded DNA-Binding Protein
MTUPR	mitochondrial Unfolded Protein Response
MAC	Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel
MCL	Mantle Cell Lymphoma
MPP	mitochondrial Processing Peptidase
MSRs	mitochondrial stress responses
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence
MMLV	MoLONey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MTHSP	Mitochondrial Heat Shock Protein
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydride
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCR	Non Coding Region
NFE2L2	Nuclear Factor Erythroid-derived 2-Like 2
NLS	Nuclear Localization Sequence
NQO1	Quinone Oxidoreductase 1
NRF2	Nuclear Factor Erythroid-devoid 2-Related Factor 2
OH	H-strand DNA Replication
OL	Origin for L-strand DNA Replication
OMM	Outer Mitochondrial Membrane
ORF	Open Reading Frame

OXPHOS	Oxidative Phosphorylation
PAM	Presequence Translocase-Associated Motor
PARP	polyADP Ribose Polymerase
PERK	Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase
PD	Parkinson's Disease
PKR	Protein Kinase R
PMAIP1	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
POL $\gamma$	DNA polymerase gamma
POLRMT	RNA polymerase mitochondrial
PQC	Protein Quality Control
QH2	Ubiquinol
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcription
SOD	Superoxide dismutases
SRXN	Sulfiredoxin 1
TIM	Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane
TOM	Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane
TRAP1	TNF Receptor Associated Protein 1
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
UPRER	Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response
UTR	Untranslated Region

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Γενικά για τα Μιτοχόνδρια

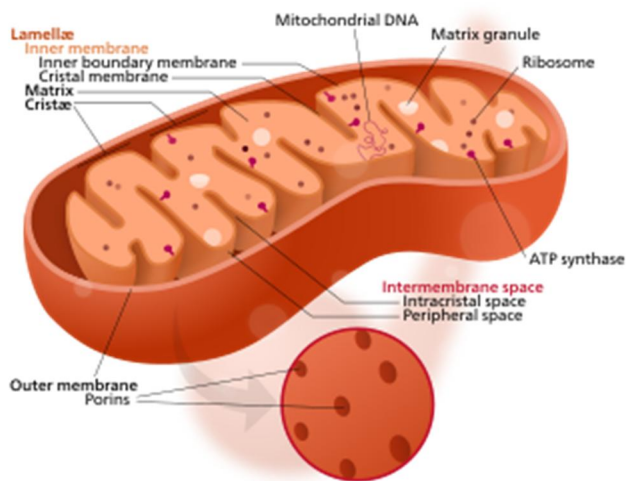
Η επιστημονική κοινότητα ανά τον κόσμο έχει ασχοληθεί και εξακολουθεί να ασχολείται με πληθώρα βιοϊατρικών θεμάτων, τα οποία βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε όλους της άμεσα. Αδιαμφισβήτητα, ένα από τα κύρια ζητήματα που μονοπολούν το ενδιαφέρον των ερευνητών δεν είναι άλλο από το μιτοχόνδριο. Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια υψηλής ρύθμισης και κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην παραγωγή της ενέργειας, επίσης φέρουν εις πέρας ένα μεγάλο αριθμό μεταβολικών λειτουργιών, για παράδειγμα τον μεταβολισμό των προσλαμβανόμενων από την τροφή υδατανθράκων και λιπαρών οξέων, τα οποία μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης πρόκειται να μετατραπούν σε ATP. [1] Το λήμμα μιτοχόνδριο αποτελεί μία σύνθετη λέξη και συνίσταται από τις ελληνικές «μίτος» που σημαίνει κουβάρι και «χόνδρος» δηλαδή κοκκίο.

## 1.2 Μορφολογία-Δομή Μιτοχονδρίου

Όπως το μέγεθος έτσι και το σχήμα των μιτοχονδρίων δεν είναι σταθερό, αλλά διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο, το μεταβολικό προφίλ καθώς και με τις ενεργειακές ανάγκες του εκάστοτε κυττάρου. Κατά βάση λαμβάνουν σφαιρικό ή επίμηκες σχήμα με κυμαινόμενες διαστάσεις από 1 έως 10 μm σε μήκος και 0,3 έως 1 μm σε διάμετρο. Αναντίρρητα, σε όλα τα κύτταρα που διακατέχονται από υψηλό οξειδωτικό μεταβολισμό, τα υποκυτταρικά οργανίδια αυτά γίνονται αρκετά μεγάλα και επιμήκη. Τα μιτοχόνδρια δίκαια διακρίνονται για την δομική τους πολυπλοκότητα, αφού απαρτίζονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (OMM – Outer Mitochondrial Membrane) και την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IMM – Inner Mitochondrial Membrane). Ο χώρος ο οποίος διαμορφώνεται μεταξύ των δύο αυτών μεμβρανών λέγεται διαμεμβρανικός χώρος. Πολύ σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι στην εσωτερική μεμβράνη, όπου λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σχηματίζονται πολυάριθμες πτυχωσεις, οι οποίες με τη σειρά τους δομούν τη μιτοχονδριακή μήτρα ή μιτοχονδριακό στρώμα (matrix). Στον χώρο αυτό απαντάται το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό (mitochondrial DNA), διάφορα ριβοσώματα καθώς και πληθώρα ενζύμων για την κατάλυση αντιδράσεων του μεταβολισμού (κύκλος κιτρικού οξέος).

Σε αυτό το σημείο κρίνεται απαραίτητο να παρατεθούν ορισμένα στοιχεία για τα άνωθεν μιτοχονδριακά τμήματα. Η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (OMM) είναι σχετικά

διαπερατή. Σε αυτή βρίσκονται πρωτεΐνες μεταφοράς, όπως για παράδειγμα οι πορίνες. Οι πρωτεΐνες αυτές αφήνουν μόρια με μοριακό βάρος έως και 10 kDa να διέλθουν ελεύθερα. Ένζυμα εδράζονται και εδώ, μετατρέποντας λιπίδια σε χημικές ενώσεις που δύνανται να μεταβολιστούν από το οργανίδιο. Αντίθετα, στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IMM) τα μικρά ιόντα δε μπορούν να περάσουν. Αυτό το γεγονός είναι μεγίστης σημασίας για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, εφόσον κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία ηλεκτροχημική διαβάθμιση για το χρονικό διάστημα που παράγονται κυτταρικοί μεταβολίτες υψηλής ενέργειας. Οι πολυάριθμες αναδιπλώσεις της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ή αλλιώς ακρολοφίες αυξάνουν την επιφάνεια της μεμβράνης και εκεί βρίσκονται ένζυμα για την παραγωγή ενέργειας όπως η συνθετάση ATP, καθώς και τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Στον διαμεμβρανικό χώρο βρίσκονται: α) το ATP που παράγεται από τις μιτοχονδριακές λειτουργίες, β) μεταβολικά μόρια μετά τη διέλευση τους από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, και γ) ιόντα που αντλούνται από τη μήτρα κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. [2] Τέλος, η μήτρα είναι ένας κοκκιώδης χώρος που βρίσκεται εσωτερικά από τις αναδιπλώσεις της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η μήτρα διαθέτει: α) DNA και ένζυμα για τη διαδικασία της μεταγραφής, β) RNA, γ) ριβοσώματα, δ) ένζυμα για την οξείδωση των λιπαρών οξέων, τον κύκλο του Krebs (κύκλο κιτρικού οξέος), και τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλοσυνένζυμο A, και ε) κοκκία ασβεστίου. [3]

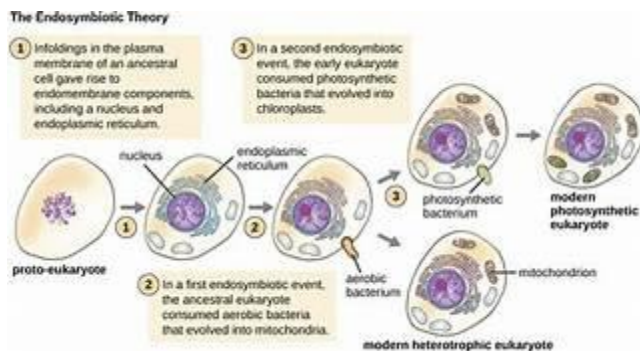


**Εικόνα 1:** Η δομή-μορφολογία ενός μιτοχονδρίου. Πηγή:

<https://www.peirsoncenter.com/articles/mitochondria-why-theyre-important-and-what-they-need-to-function>.

### 1.3 Προέλευση Μιτοχονδρίου

Όλα τα άνωθεν ευρήματα συναινούν υπέρ της θεωρίας της ενδοσυμβίωσης, σύμφωνα με την οποία μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες αποτελούν απογόνους αερόβιων προκαρυωτών, που συμβιώνουν με ένα αρχέγονο ευκαρυωτικό κύτταρο ξενιστή, το οποίο αρχικά ήταν αναερόβιο ή λάμβανε την ενέργεια του από τη γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται πως τα μιτοχόνδρια προήλθαν από τα πρωτεοβακτήρια που βάσει φυλογενετικών αναλύσεων σε γονίδια μιτοχονδριακού DNA αποτελούν τον εγγύτερο συγγενή των μιτοχονδρίων. [4] Συνεπώς, το κύτταρο-ξενιστής απέκτησε την δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο μέσω του προκαρυώτη. Η συγκεκριμένη σχέση συνεχίστηκε, διότι αφενός ο ξενιστής πριμοδοτείται από τον αερόβιο προκαρυώτη στην παραγωγή ενέργειας, αφετέρου το προκαρυωτικό κύτταρο ευνοείται από το προστατευτικό περιβάλλον του ευκαρυωτικού κυττάρου. Βέβαια, με την πάροδο των ετών, πολλές λειτουργίες του κυττάρου-προκαρυώτη χρησιμοποιήθηκαν από το κύτταρο-ξενιστή, έως ότου αρκετά προκαρυωτικά γονίδια ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό του ξενιστή. [5]



**Εικόνα 2:** Σύμφωνα με την θεωρία της ενδοσυμβίωσης, οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων προήλθαν από την πρόσληψη βακτηρίων από κάποιο αρχικό κύτταρο ξενιστή. Αυτοί οι προκαρυωτικοί οργανισμοί δημιούργησαν μια συμβιωτική σχέση με τον ξενιστή τους, η οποία τελικά οδήγησε τα βακτήρια να εξελιχθούν σε χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια, αντίστοιχα. Πηγή: <https://www.differencebetween.com/difference-between-endosymbiont-and-vs-endophyte/>.

## 1.4 Λειτουργία Μιτοχονδρίων

Τα υποκυτταρικά οργανίδια αυτά είναι κρίσιμης σημασίας για το κύτταρο, αφού εμπλέκονται σε ζωτικές για αυτό λειτουργίες. Πιο αναλυτικά, κάθε μιτοχονδριακό τμήμα (λόγου χάρη εσωτερική μεμβράνη, εξωτερική μεμβράνη, μήτρα, διαμεμβρανικός χώρος) εξυπηρετεί συγκεκριμένες διαδικασίες, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις βασικές για το κύτταρο λειτουργίες εντοπίζονται σε διαφορετικά τμήματα του εν λόγω οργανιδίου. Πρωτίστως, ο λόγος σύμφωνα με τον οποίο είναι πιο γνωστά τα μιτοχόνδρια είναι ότι τα ίδια αποτελούν εργοστάσια παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια λειτουργούν ως αποκλειστική μηχανή παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης για ένα κύτταρο. Άρα, το κύτταρο εξαρτάται πλήρως από τα οργανίδια αυτά μιας και είναι τα μόνα υπεύθυνα για την ενεργειακή παραγωγή. Επιπροσθέτως, μία ακόμα αδιαμφισβήτητα σημαντική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η συμβολή τους στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή αλλιώς απόπτωση. [3]

### 1.4.1 Παραγωγή Ενέργειας

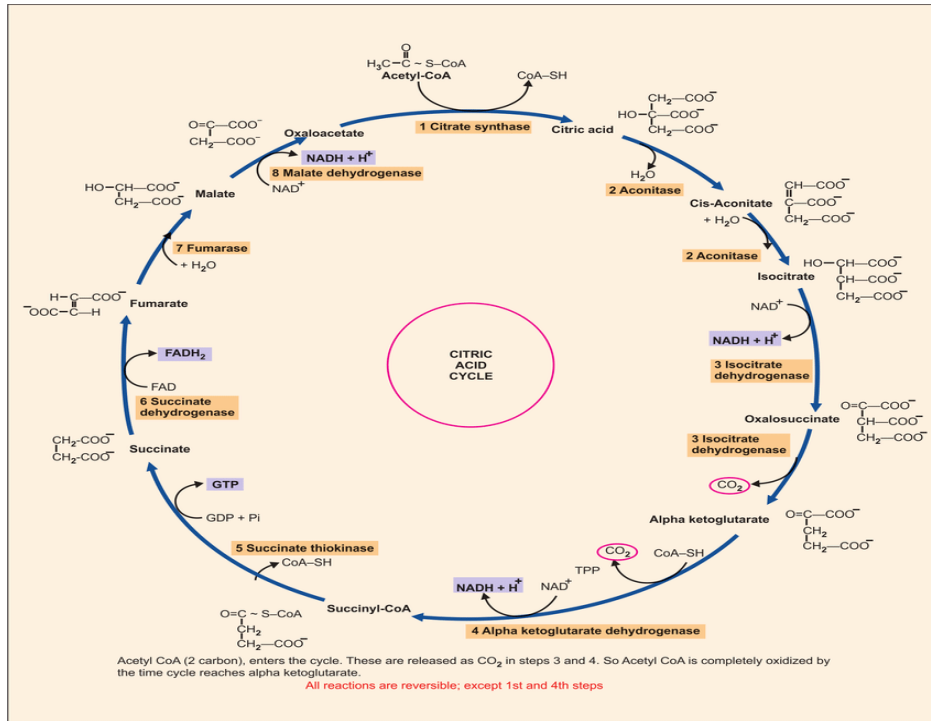
Τα μιτοχόνδρια, ως οργανίδια παραγωγής ενέργειας, είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Ειδικότερα, τα μιτοχόνδρια φαίνεται να συμβάλλουν στην κυτταρική λειτουργία με δύο δυνατούς τρόπους όσον αφορά τη δημιουργία ενέργειας: α) μέσω της σύνθεσης τριφωσφορικής αδενοσίνης ή ATP (άμεσος), και β) με τη βοήθεια των μορίων NADH κι FADH<sub>2</sub>, τα οποία λειτουργούν ως φορείς ηλεκτρονίων (έμμεσος).

#### 1.4.1.1 Κύκλος Κιτρικού Οξέος

Ο κύκλος του Krebs ή εναλλακτικά ο κύκλος του κιτρικού οξέος αποτελεί μία κυκλική σειρά από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και λαμβάνει χώρα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Στόχος του κύκλου του Krebs αποτελεί η συγκέντρωση υψηλής ενέργειας ηλεκτρονίων, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την παρουσία οξυγόνου. Για να φέρει εις πέρας ένα μιτοχόνδριο τον κύκλο του κιτρικού οξέος απαιτούνται πληθώρα ενζύμων εντός της μιτοχονδριακής μήτρας. Ο τρόπος σύμφωνα με τον οποίο ο κύκλος του κιτρικού οξέος παρέχει ενέργεια είναι διά μέσου της παραγωγής NADH κι FADH<sub>2</sub>. Αυτά λειτουργούν με τη σειρά τους ως μεταφορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και υδρογόνου και θα μετατραπούν σε ATP ύστερα από άκρως αερόβιες συνθήκες. Για να γίνει αυτό θα λάβουν μέρος σε αρκετές αντιδράσεις, εισερχόμενα στην



εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, στην οποία βρίσκονται τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Τέλος, αυτή οδηγεί σε οξειδωτική φωσφορυλίωση της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) για να παραχθεί τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). [6]



Εικόνα 3: Ο κύκλος του κιτρικού οξέος. Πηγή: Kannan Vaidyanathan et.al., 2017.

### 1.4.1.2 Τριφωσφορική Αδενοσίνη (ATP)

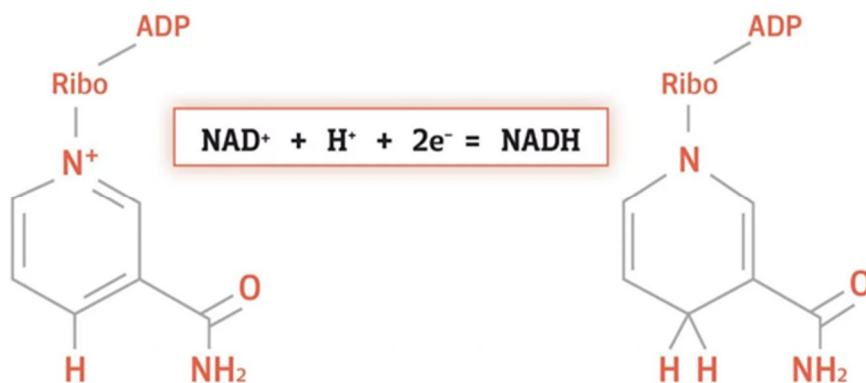
Εντός της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, μεταξύ άλλων λαμβάνει χώρα και η μεταφορά των ηλεκτρονίων, ρόλος της οποίας είναι η σύνθεση ATP. Εναρκτήριο μόριο αυτής της διαδικασίας είναι το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης NADH, το οποίο μετατρέπει το NAD (δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης) από NADH (ανηγμένη μορφή) σε NAD<sup>+</sup> (οξειδωμένη μορφή). Το NAD *απαρτίζεται* από δύο νουκλεοσίδια, τα οποία ενώνονται με πυροφωσφορικό δεσμό. Οι νουκλεοζίτες (ή νουκλεοσίδια) περιέχουν ο καθένας ένα δακτύλιο ριβόζης. Στην ουσία, ο ένας είναι συνδεδεμένος με Αδενίνη στο πρώτο άτομο άνθρακα (θέση 1') και ο άλλος στην ίδια θέση έχει το νικοτιναμίδιο. Πρακτικά, αυτή η ένωση δέχεται ή δωρίζει το ισοδύναμο του H<sup>-</sup>. [7] Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν την απομάκρυνση δύο ατόμων υδρογόνου από

το αντιδρόν (R), με τη μορφή ενός ιόντος υβριδίου ( $H^-$ ) και ενός πρωτονίου ( $H^+$ ) ( $RH_2 + NAD^+ \rightarrow NADH + H^+ + R$ ). Από το ζεύγος ηλεκτρονίων υβριδίου, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο θετικά φορτισμένο άζωτο του δακτυλίου νικοτιναμιδίου του  $NAD^+$  και το δεύτερο άτομο υδρογόνου μεταφέρεται στο άτομο άνθρακα  $C_4$  απέναντι από αυτό το άζωτο το πρωτόνιο απελευθερώνεται στο διάλυμα, ενώ το αναγωγικό  $RH_2$  οξειδώνεται και το  $NAD^+$  ανάγεται σε  $NADH$  με μεταφορά του υβριδίου στον νικοτιναμιδικό δακτύλιο. Από το μόριο  $NADH$ , λοιπόν, αφαιρείται ένα υβρίδιο υδρογόνου  $H^-$  (αρνητικά φορτισμένο άτομο υδρογόνου) και προσφέρονται δύο ηλεκτρόνια ( $e^-$ ) και ένα πρωτόνιο ( $p$ ). Με τον όρο υβρίδιο αναφερόμαστε σε ένα άτομο υδρογόνου ( $H$ ) που διαθέτει ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο, δηλαδή αφορά ένα ουδέτερο άτομο υδρογόνου ( $H$ ), το οποίο συγκρατεί ένα ακόμα ηλεκτρόνιο, γεγονός που δίνει στο υβρίδιο ένα συνολικά αρνητικό φορτίο:  $H + e^- = H^-$ . Στην περίπτωσή μας, το ουδέτερο μόριο  $NADH$  δημιουργείται ύστερα από την προσθήκη ενός υβριδίου ( $H^-$ ) σε ένα θετικά φορτισμένο μόριο  $NAD^+$ :  $NAD^+ + H^- = NADH$ .

Έπειτα, το σύμπλοκο και τα κέντρα θείου-σιδήρου παρουσιάζουν σύνδεση με μία ομάδα φλαβίνης, η οποία επιτρέπει στα ηλεκτρόνια να διέλθουν με τελικό σκοπό να φτάσουν στην ουβικινόνη (Q). Επιπροσθέτως, με την αγωγή των  $FADH_2$ , καθώς και του συμπλόκου II της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης, τα ηλεκτρόνια μπορούν να μπουν στην αναπνευστική αλυσίδα. Αυτός ο τρόπος καθιστά δυνατή την είσοδο των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, διότι ομοίως με την πρώτη οδό τα ηλεκτρόνια θα αποδοθούν στην ουβικινόνη. [8] Η ουβικινόνη (2,3-διμεθοξυ-5-μεθυλ-6-πολυπρενυλ-1,4-βενζοκινόνη) ή  $CoQ_{10}$  που αποτελεί ένα πλήρως υδρόφοβο ένζυμο βρίσκεται σε πλούσιες σε λιπίδια περιοχές της μεμβράνης και είναι αρκετά μικρή και ευδιάλυτη στη μεμβράνη. Ένας από τους ρόλους της είναι η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο κυτοχρωματικό σύμπλοκο BC1. Εδώ, τα άτομα σιδήρου που περιέχονται στην αίμη αποτελούν τον φορέα των ηλεκτρονίων. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια λαμβάνονται από το κυτόχρωμα και μεταφέρονται σε ένα μόριο που λέγεται κυτοχρωμική οξειδάση. [9] Εδώ, γίνεται λήψη 4 πρωτονίων από το υδάτινο περιβάλλον και 4 ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c που οδηγούνται σε ένα μόριο  $O_2$  και τελικά δομούν δύο μόρια νερού. Ως απότοκο της όλης διαδικασίας είναι να αντλούνται 4 πρωτόνια από τη μήτρα των μιτοχονδρίων προς το διαμεμβρανικό χώρο με σκοπό να δημιουργήσουν τελικά την ηλεκτροχημική διαβάθμιση των πρωτονίων από την οξειδάση. [10]

Τελικά, στο πρώτο σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας αφαιρούνται δύο ηλεκτρόνια από το NADH, τα οποία μεταφέρονται στην ουβικινόνη (Q). Η τελευταία, καθιστά ένα λιποδιαλυτό φορέα και σχηματίζει μαζί με τα δύο ηλεκτρόνια ένα μόριο, το οποίο ονομάζεται ουμπικινόλη (QH<sub>2</sub>). Το προϊόν αυτό διαχέεται ελεύθερα εντός της μεμβράνης και το σύμπλοκο I μπορεί και μετατοπίζει τέσσερα πρωτόνια (H<sup>+</sup>) κατά μήκος της μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται μια βαθμίδωση πρωτονίων. Το σύμπλεγμα I αποτελεί μία από τις κύριες θέσεις στις οποίες συμβαίνει διαρροή ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο, αποτελώντας έτσι μία από τις κύριες θέσεις παραγωγής υπεροξειδίου. [11] Η πορεία των ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο αυτό είναι η ακόλουθη: Το NADH οξειδώνεται σε NAD<sup>+</sup>, μέσω αναγωγής του μονονουκλεοτιδίου φλαβίνης σε FMNH<sub>2</sub>, σε ένα βήμα δύο ηλεκτρονίων. Το FMNH<sub>2</sub> στη συνέχεια οξειδώνεται σε δύο στάδια ενός ηλεκτρονίου, μέσω ενός ενδιάμεσου, της ημικινόνης. Κάθε ηλεκτρόνιο μεταφέρεται έτσι από το FMNH<sub>2</sub> σε ένα σύμπλεγμα Fe-S, και από το σύμπλεγμα Fe-S στην ουβικινόνη (Q). Η μεταφορά του πρώτου ηλεκτρονίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας του Q (ημικινόνη) και η μεταφορά του δεύτερου ηλεκτρονίου μειώνει το σχηματισμό αυτόν της ημικινόνης στη μορφή ουμπικινόλης (QH<sub>2</sub>). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, τέσσερα πρωτόνια μετατοπίζονται από τη μιτοχονδριακή μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο. [11] Καθώς τα ηλεκτρόνια κινούνται μέσα από το σύμπλοκο, παράγεται ρεύμα ηλεκτρονίων κατά μήκος του του συμπλόκου, πλάτους 180 Angstrom, εντός της μεμβράνης. Αυτό είναι το ρεύμα που τροφοδοτεί την ενεργή μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων στον διαμεμβρανικό χώρο ανά δύο ηλεκτρόνια από το NADH. [12]

Συμπερασματικά, δύο ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το μόριο NADH στο σύμπλοκο I, έτσι ώστε τα τέσσερα ιόντα H<sup>+</sup> να μπορούν να αντληθούν στην εσωτερική μεμβράνη. Το NADH οξειδώνεται στη μορφή NAD<sup>+</sup>, η οποία μπορεί και ανακυκλώνεται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Τα ηλεκτρόνια οδηγούνται από το σύμπλεγμα I σε ένα μόριο-φορέα, την ουβικινόνη (Q), η οποία ανάγεται σε QH<sub>2</sub>. Η ουβικινόλη είναι αυτή, η οποία πρόκειται να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο σύμπλεγμα III.



**Εικόνα 4:** Τα μόρια NAD και NADH. Πηγή: <https://www.nad.com/nad-vs-nadh>.

### 1.4.1.3 Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συνεχής ανάγκη για NAD<sup>+</sup> και FAD κάνουν τον κύκλο του Krebs να υλοποιείται υποχρεωτικά υπό αερόβιες συνθήκες. Τα μόρια NAD<sup>+</sup> και FAD τα οποία λειτουργούν ως δέκτες ηλεκτρονίων επανασηματίζονται κάθε φορά που η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγεί τα ηλεκτρόνια από τα NADH και FADH<sub>2</sub> στο O<sub>2</sub>, με ταυτόχρονη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP. Αυτή η διαδικασία αποκαλείται οξειδωτική φωσφορυλίωση. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό πως η φωσφορυλίωση του ADP σε ATP καθώς και η αναπνευστική αλυσίδα ή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transport Chain-ETC) είναι διαδικασίες ακλόνητα συνυφασμένες η μία με την άλλη για την επίτευξη της παραγωγής ενέργειας. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ό,τι στη μήτρα. Αυτό οδηγεί σε μία φυσική κίνηση των πρωτονίων από τον έναν χώρο στον άλλο, δια μέσου ενός μορίου που αποκαλείται συνθάση ATP. Λογικά, προκύπτει ότι από την κίνηση των πρωτονίων δημιουργείται ενέργεια, η οποία δε χρησιμοποιείται πουθενά αλλού πέρα από την παραγωγή του ATP. [13]

## 1.4.2 Μιτοχονδριακό Γενετικό Υλικό

Για πολλά χρόνια το γενετικό υλικό που είχε τραβήξει τα βλέμματα της επιστημονικής κοινότητας δεν ήταν άλλο από το πυρηνικό. Παρόλα αυτά το 1981 ο ερευνητής Anderson δημοσιοποίησε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), το οποίο είναι ανθεκτικότερο του πυρηνικού DNA και βρίσκεται σε εκατοντάδες έως και χιλιάδες αντίτυπα ανά κύτταρο. Τα μιτοχόνδρια μπορούν με το γενετικό υλικό τους να καλύψουν ορισμένες από τις λειτουργικές ανάγκες τους. Παρόλα αυτά, πολλά γονίδια αναγκαία για την κυτταρική λειτουργία βρίσκονται στον πυρήνα του κυττάρου. Για αυτόν ακριβώς το λόγο οι επιστήμονες έχουν αποδώσει στα μιτοχόνδρια τον χαρακτηρισμό ημιαυτόνομα, ακριβώς γιατί ενώ διαθέτουν δικό τους DNA, συνεπώς και πρωτεΐνες, παράλληλα χρειάζονται επιπλέον πρωτεϊνικά μόρια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γενετικό υλικό. [14] Πιο συγκεκριμένα, το μιτοχονδριακό DNA του ανθρώπου είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA που αποτελείται από 16.569 ζεύγη βάσεων, ενώ σε σύγκριση με αυτό του πυρήνα, διαθέτει κωδικές αλληλουχίες, οι οποίες βρίσκονται μία και μόνο μία φορά σε όλο το μήκος του. Σημαντικό και ιδιαίτερο στοιχείο αποτελεί το γεγονός πως στο μιτοχονδριακό γενετικό υλικό δε ανευρίσκονται ιντρόνια ούτε ψευδογονίδια. Επίσης, ύστερα από μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μιτοχονδριακού DNA παρατηρήθηκε πως ή δεν απαντώνται καθόλου νουκλεοτίδια μεταξύ των μιτοχονδριακών γονιδίων ή βρίσκονται ένα έως λίγα μόνο. Στη συνέχεια, όπως αναφέρθηκε κάθε κύτταρο διαθέτει χιλιάδες μόρια mtDNA. Κάθε ένα κωδικοποιεί μία περιοχή ελέγχου η οποία διαθέτει μία αρχή αντιγραφής και υποκινητές. Επίσης, σε αυτό κωδικοποιούνται ένα μεγάλο (16S) και ένα μικρό (12S) μόριο rRNA, 22 tRNA και 13 πολυπεπτίδια. Όλα τα μιτοχονδριακά πολυπεπτίδια έχουν σχέση με την αναπνευστική διαδικασία και αφορούν τα σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), ενώ οι αντιδράσεις της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο πλαίσιο της πρώτης, αποτελούν τις κύριες διαδικασίες για την παραγωγή ATP από τα μιτοχόνδρια. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη λειτουργικά για τα κύτταρα, ωστόσο αποτελεί μία εξελικτικά περιορισμένη διαδικασία. [15], [16] Επίσης, είναι αρκετά σημαντικό πως το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται στο παιδί μόνο από τη μητέρα του. Γεγονός που καθιστά πως Αυτό σημαίνει ότι όλοι οι απόγονοι μίας οικογένειας, αφού έχουν κοινό θηλυκό πρόγονο, διαθέτουν ταυτόσημη αλληλουχία DNA στα υποκυτταρικά αυτά οργανίδια. Ένα ζήτημα που προκύπτει είναι πως το mtDNA διακρίνεται για

τον υψηλό ρυθμό μεταλλαγών, γεγονός που οδηγεί σε παθολογικές μεταλλαγές και ουδέτερους πολυμορφισμούς. [17]

### **1.4.3 Μιτοχονδριακό ριβοσωμικό RNA**

Σε αντιδιαστολή με το πυρηνικό σύστημα μετάφρασης, το οποίο είναι αρκετά σύνθετο (μέχρι πέντε υπομονάδες rRNA), το μιτοχονδριακό είναι αρκετά πιο απλό. Πιο αναλυτικά, αποτελείται από τις ριβοσωμικές υπομονάδες 12S και 16S, οι οποίες βρίσκονται σε ένα μόνο αντίγραφο στο μιτοχονδριακό γενετικό υλικό. [18]

### **1.4.4 Μιτοχονδριακό μεταφορικό RNA**

Ο εξελικτικός ρυθμός των μιτοχονδριακών tRNAs είναι πιο μεγάλος από αυτόν των πυρηνικών για το λόγο ότι τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν tRNA δέχονται αρκετά λιγότερους λειτουργικούς καθώς και δομικούς περιορισμούς, αλλά παράλληλα υφίστανται πιο πολλές φθορές. Παρόλα αυτά ο ρυθμός εξέλιξης των γονιδίων που εκφράζουν πρωτεϊνικά μόρια είναι αρκετά πιο γρήγορος. Η ταχύτητα εξέλιξης ποικίλει και στα μιτοχονδριακά tRNAs αλλά και σε διάφορες περιοχές στη δομή τους. Όπως έχει φανεί οι βρόγχοι είναι πιο σταθεροί και είναι αυτοί που θα δώσουν τις περιοχές των αντικωδικονίων. Οι αμέσως σταθερότερες περιοχές είναι αυτές των κορμών. Ακόμη, οι βρόγχοι T και D είναι αυτοί που παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μεταβολές σε μέγεθος και σε αλληλουχία των tRNAs. Τέλος, η ανομοιομορφία της ταχύτητας εξέλιξης σε αυτά τα μόρια ίσως να είναι αποτέλεσμα του ότι τα tRNAs που γειτνιάζουν με το 5' άκρο γονιδίων και κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είναι σημαντικά τμήματα για τη μεταγραφή των μορίων αυτών. [19] Άρα, αυτές οι αλληλουχίες είναι συντηρημένες, εφόσον αποτελούν σημαντικά τμήματα. Αυτό σημαίνει ότι μόνο τα νουκλεοτιδικά τμήματα που κωδικοποιούν αυτά τα tRNAs διακατέχονται από σχετικά μικρό ρυθμό εξέλιξης και αλλαγής. [20]

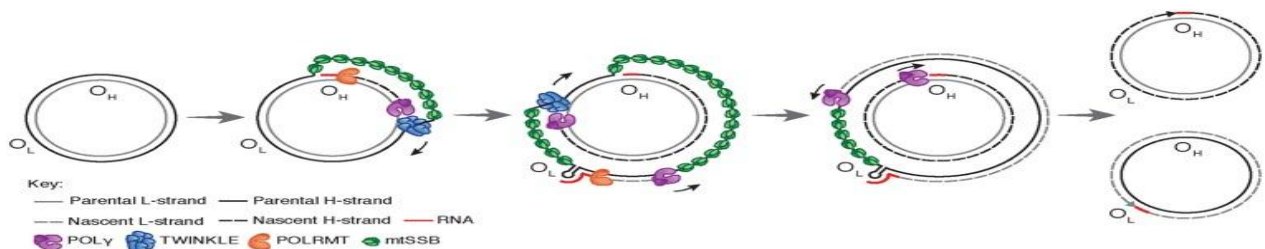
### 1.4.5 Μιτοχονδριακό Αγγελιοφόρο RNA

Όπως έχει ήδη ειπωθεί, ο εξελικτικός ρυθμός των γονιδίων τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνες είναι πολύ μεγαλύτερος από τα γονίδια που κωδικοποιούν RNA. Στην πραγματικότητα, η μεγαλύτερη διαφορά εντοπίζεται στο δεδομένο ότι υπάρχουν δομικοί και λειτουργικοί περιορισμοί που διέπουν κάθε αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλυσίδα αυτών των γονιδίων. Επομένως, οι διαφοροποιήσεις ελέγχονται έμμεσα από την αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία και όχι από τη νουκλεοτιδική. Το αποτέλεσμα καθίσταται σαφές υπό το δεδομένο πως ο γενετικό κώδικας είναι εκφυλισμένος. Αυτό σημαίνει πως οι κωδικές αλληλουχίες των αμινοξέων, δηλαδή οι τριπλέτες, δύνανται να εκφραστούν από ένα ή και πάνω από ένα κωδικόνια DNA. Παρόλα αυτά κρίνεται απαραίτητο να τονιστεί πως η ανωτέρω κατάσταση δε βρίσκει εφαρμογή στα tRNAs τα οποία είναι δεδομένο ότι πρόκειται να επηρεαστούν από όποια αλλαγή γίνει στα νουκλεοτίδια. [19]

### 1.4.6 Μιτοχόνδρια και αντιγραφή μιτοχονδριακού DNA

Το ευρύτερο φάσμα των γενετικών πληροφοριών των μιτοχονδριακών πρωτεΐνων βρίσκεται στα χρωμοσώματα του γενετικού υλικού του πυρήνα και δε συμμετέχει μόνο στη σύνθεση του ATP. Σε αδρές γραμμές, σχεδόν 3.000 γονίδια χρειάζονται για την έκφραση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Τα περισσότερα εδράζονται στον πυρήνα, ενώ μόνο 13 εντοπίζονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Επιπροσθέτως, αναφέρθηκε πως το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι δίκλωνο. Παρόλα αυτά οι δύο αλυσίδες παρουσιάζουν κάποιες σημαντικές για την αντιγραφή του μορίου διαφορές. Με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας υπό φυσιολογικές συνθήκες πάντα ένα νουκλεοτίδιο που φέρει τη βάση Αδενίνη (A) αντιστοιχεί με ένα δεύτερο με την αζωτούχο βάση Θυμίνη (T) και αντίστοιχα το νουκλεοτίδιο που φέρει τη βάση Γουανίνη (G) ταιριάζει με ένα άλλο με τη βάση Κυτοσίνη (C). Το σημαντικό είναι πως οι βάσεις δεν είναι ομοιόμορφα καταναμημένες και λογικώς προκύπτει διαφορά στην πυκνότητα των δύο κλώνων. Πιο συγκεκριμένα, η μία αλυσίδα αποκαλείται βαριά (Heavy–H), λόγω του γεγονότος ότι σε αυτή υπάρχει αφθονία νουκλεοτιδίων Γουανίνης (G). Ομοίως, η δεύτερη ονομάζεται ελαφριά (light– L), διότι η πλειοψηφία των νουκλεοτιδίων φέρουν τη βάση Κυτοσίνη (C). Ταυτόχρονα, στο γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων βρίσκεται μία περιοχή ελέγχου, ένα μακρύ νουκλεοτιδικό τμήμα το οποίο δεν εκφράζεται και ονομάζεται μη κωδικοποιούσα περιοχή (Non Coding Region–NCR). Στο τμήμα NCR βρίσκονται δύο υποκινητές για πολυκιστρονική μεταγραφή, ο υποκινητής της ελαφριάς αλυσίδας (Light Strand Promoter– LSP) και ο υποκινητής της βαριάς

αλυσίδας (Heavy Strand Promoter–HSP), και είναι ένας για κάθε αλυσίδα, αντίστοιχα. Ακόμη, στο NCR παρατηρείται επίσης η περιοχή έναρξης της μιτοχονδριακής αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (Heavy–H), η οποία λέγεται origin for H-strand DNA replication-OH. Αντίθετα η origin for L-strand DNA replication-OL, δηλαδή το τμήμα έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς (light– L) είναι εκτός της περιοχής NCR κατά 11.000bp καταρροϊκά αυτής. Συνεπώς, το πρότυπο της μιτοχονδριακής αντιγραφής οδηγεί στο σχηματισμό του βρόχου D. Εκεί, η πρώτη αλυσίδα που περνά τη διαδικασία της αντιγραφής είναι η μητρική (L), άρα ταυτόχρονα συντίθεται η νέα (H) και κατά το ήμισυ αυτής της διαδικασίας αρχίζει να αντιγράφεται και η μητρική (H) αλυσίδα, άρα παράγεται η καινούρια (L). [21] Ο αναδιπλασιασμός του μιτοχονδριακού DNA έχει ως αφετηρία το OH και κινείται προς μία μόνο κατεύθυνση για την παραγωγή του νεοσυντιθέμενου H-κλώνου. Όταν το ρεπλίσωμα διέρχεται από το OL, δημιουργείται μια δομή στελέχους-βρόγχου που εμποδίζει τη σύνδεση των mtSSBs (mtSSBs- Single stranded DNA binding proteins), οι οποίες δεσμεύονται στο μονόκλωνο DNA (ssDNA) και το προστατεύουν με αρκετά υψηλή εκλεκτικότητα καθώς και συγγένεια κατά την αντιγραφή του. [22], [23] Δίχως τις SSBs, το ssDNA θα ήταν ευάλωτο από επιθέσεις από χημικούς παράγοντες, νουκλεάσες και δέσμευση DNA από ακατάλληλες πρωτεΐνες. [24], [25] Σημαντική είναι η δράση των SSBs στην πρόληψη του σχηματισμού δευτερογενών δομών σε περιοχές μονόκλωνου μιτοχονδριακού γενετικού υλικού. Εν συνεχεία, αυτός ο σχηματισμός (στελέχους-βρόγχου) παρουσιάζει μια μονόκλωνη περιοχή βρόγχου από την οποία η POLRMT (RNA Polymerase Mitochondrial-POLRMT) δύναται να ξεκινήσει τη σύνθεση εκκινητών. [26] αυτή η μιτοχονδριακή RNA πολυμεράση έχει ως ρόλο την παροχή των εκκινητών RNA για την έναρξη της διαδικασίας της αντιγραφής του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. [27] Η μετάβαση στη σύνθεση L-κλώνου DNA συμβαίνει μετά από περίπου 25 νουκλεοτιδία, όταν η POLγ αντικαθιστά το POLRMT στο 3'-άκρο του εκκινητή. Η σύνθεση των δύο κλώνων προωθείται με συνεχή τρόπο έως ότου σχηματιστούν δύο πλήρη, δίκλιωνα μόρια DNA. [21][28]



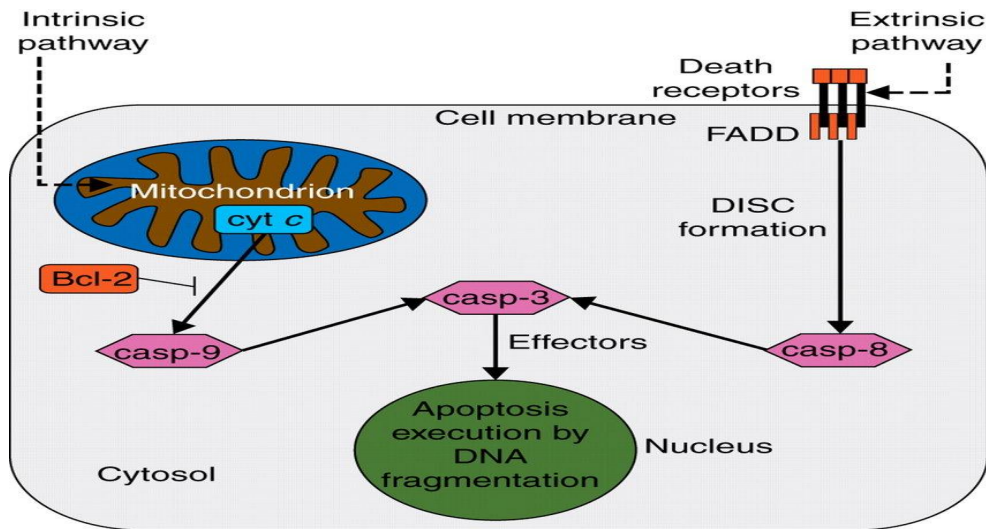
**Εικόνα 5:** Αντιγραφή ανθρώπινου mtDNA. Πηγή: Maria Falkenberg, 2018.



## 1.5 Μιτοχόνδρια και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή αλλιώς απόπτωση αφορά μία διαδικασία κατά την οποία η χρωματίνη του συρρικνώνεται και αποικοδομείται, ενώ οι μεμβράνες διαμερισματοποιούν το κυτταρόπλασμα και το νουκλεόπλασμα με αποτέλεσμα το κύτταρο να αποδομηθεί σε αποπτωτικά κυστίδια. Το 1972, οι Kerr, Wyllie και Currie χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά αυτόν τον όρο σε μια εργασία τους για να περιγράψουν έναν μορφολογικά ξεχωριστό τύπο κυτταρικού θανάτου. [29] Πιο συγκεκριμένα, όταν τα φυσιολογικά κύτταρα δεχτούν ανεπανόρθωτες βλάβες στο γενετικό τους υλικό, λόγω οξειδωτικού στρες, ακτινοβολίας, ή χημικών μεταλλαξιγόνων, ενεργοποιούν τη λειτουργία της απόπτωσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο στοχεύουν στη διακοπή του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού, όπως επίσης και της αντιγραφής τους, έτσι ώστε να μη διαωριστούν οι μεταλλαγές που θα έχουν προκύψει. Ειδικότερα, τα ανωτέρω ερεθίσματα καταλήγουν να ενεργοποιούν την πρωτεΐνη P53, η οποία δρα ως αφετηρία για το μονοπάτι ενεργοποίησης πολλών πρωτεϊνικών μορίων. Τα τελευταία ή εδράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη έχοντα άμεση δράση στα μιτοχόνδρια ή λαμβάνουν χώρα στον ενδοκυττάριο χώρο και εκφράζονται από τον αποπτωτικό τελεστή BAX και την P53, ενεργοποιώντας τελικά τα μιτοχόνδρια. Όπως είναι λογικό, κατά την απόπτωση καταρρέει η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, εξαιτίας της μείωσης του ATP. Επίσης, απελευθερώνονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), καθώς και κυτόχρωμα C. Διεisdύοντας στη διαδικασία αυτή κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί πως α) ο παράγοντας απόπτωσης BCL-2 μειορυθμίζεται, απελευθερώνοντας την πρωτεΐνη APAF 1 (Apoptotic protease activating factor 1-APAF 1), ενώ το κυτόχρωμα C απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια του μορίου BAX, και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη APAF-1, και β) η επιβίωση ή όχι ενός κυττάρου κρίνεται από την αναλογία των πρωτεϊνών BAX/BCL-2.[30] Πιο συγκεκριμένα δημιουργούνται ομοδιμερή και για τα δύο μόρια BCL-2/BCL-2 και BAX/BAX, αντίστοιχα. Τα μεν πρώτα καταστέλλουν την απόπτωση, τα δε δεύτερα την επάγουν και αυτό συμβαίνει ως εξής:

- a) Τα πρωτεϊνικά μόρια BCL-2 μπορούν να προάγουν ή ακόμη και να καταστείλουν την αποπτωτική διαδικασία ενεργώντας άμεσα πάνω στο κανάλι επαγωγής της μιτοχονδριακής απόπτωσης (mitochondrial apoptosis-induced channel-MAC). Αυτό το μονοπάτι αποτελεί ένα διάυλο πάνω στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια BCL-2, BCL-XL και MCL-1 προσπαθούν να εμποδίσουν το σχηματισμό του εν λόγω διαύλου. Αντίθετα οι πρωτεΐνες BAX ασχολούνται με το σχηματισμό του. [31]
- b) Το κυτόχρωμα C, το οποίο αποτελεί μία υψηλά συντηρημένη και μικρή αιμοπρωτεΐνη, απαρτίζεται από 100 αμινοξέα και βρίσκεται χαλαρά προσδεμένο στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με τη βοήθεια ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Εδώ, με τη βοήθεια του αποπτωσωματίου, οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών. Στην ουσία, αποτελεί το εναρκτήριο λάκτισμα για τον ενεργοποιητικό μηχανισμό πολλών κασπασών, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τα τελικά στάδια της αποπτωτικής διαδικασίας. Βέβαια, αυτή η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα όταν οι διάυλοι MAC βοηθούν το κυτόχρωμα C να διέλθει μέσω των διαύλων αυτών για να καταλήξει να διαχέεται στο κυτοσόλιο. Μόλις απελευθερωθεί η πρωτεΐνη του κυτοχρώματος C, προσδένεται άμεσα στην APAF 1 και σε μόρια ATP. Η πρωτεΐνη APAF 1 είναι ένα ειδικό μόριο, το οποίο ονομάζεται πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης 1. Όπως ειπώθηκε νωρίτερα, αυτή έχει ήδη αποδεσμευτεί από το μόριο BCL-2. Έπειτα, προσδένεται στην προκασπάση-9 με σκοπό να δημιουργηθεί το αποπτώσωμα, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Σε αυτό γίνεται η μετατροπή της προκασπάσης-9 σε κασπάση-9 (ενεργή μορφή). [32] Η τελευταία θα ενεργοποιήσει την κασπάση-3 (πρωτεΐνη τελεστής), η οποία θα οδηγηθεί εντός του πυρήνα και θα διασπάσει το πρωτεϊνικό μόριο PARP (polyADP ribose polymerase) και θα οδηγήσει στην κατάτμηση του γενετικού υλικού με τη βοήθεια σχετικών ενδονουκλεασών. Τέλος, με την έξοδο του κυτοχρώματος C από το οργανίδιο του μιτοχονδρίου, εκλύεται επίσης και ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης AIF (Apoptosis Inducing Factor). Αυτός τελικά κατευθύνεται στον πυρήνα και συντονίζει τη δράση προαναφερθεισών ενδονουκλεασών. [30][33][34]



**Εικόνα 6: Οι δύο κύριες αποπτωτικές οδοί.** Η εγγενής ή μιτοχονδριακή οδός (αριστερά) αφορά τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την απελευθέρωση κυτοχρώματος c (cyt c) και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 (casp-9). Η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2 αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Η εξωτερική οδός ή οδός των υποδοχέων θανάτου (δεξιά) ξεκινά με τη δέσμευση συνδετών σε υποδοχείς θανάτου και την επακόλουθη αλληλεπίδρασή τους με το πρωτεϊνικό μόριο προσαρμογής FADD (FAS-associated protein with death domain-FADD) και την κασπάση-8 (casp-8) στο σύμπλεγμα σηματοδότησης που θα επιφέρει τον θάνατο (Death-Inducing Signaling Complex-DISC). Και οι δύο οδοί συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του πρωτεϊνικού τελεστή κασπάση-3 (casp-3), που διαθέτει πληθώρα πρωτεϊνικών στόχων, και οδηγεί στα γνωστά αποτελέσματα της απόπτωσης, όπως ο κατακερματισμός του γονιδιώματος στον πυρήνα, και η δημιουργία αποπτωτικών κυστιδίων. Πηγή: S. Braun, N. Gaz1, R. Werdehausen, 2010.

## 1.6 Οξειδωτικό stress

Με τον όρο οξειδωτικό stress ή οξειδωτική καταπόνηση αναφερόμαστε στη διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species-RNS) αναφορικά με το μοριακό μηχανισμό ο οποίος καταστέλλει αυτά τα τοξικά για το κύτταρο μόρια και διορθώνει τις βλάβες που αυτά προκαλούν. [35] Τα ROS όπως επίσης και τα RNS προκαλούν προβλήματα οξείδωσης σε όλα τα συστατικά ενός κυττάρου, όπως για παράδειγμα: γενετικό υλικό, πρωτεΐνες, υδατανθράκων και λιπίδια. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, η οξειδωτική καταπόνηση προξενεί δυσλειτουργίες σε όλα τα συστήματα ενός οργανισμού. Αντίθετα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου οι οποίες φέρουν και θετικό πρόσημο για θεμελιώδεις διαδικασίες του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνουν μέρος στους μηχανισμούς φυσικής άμυνας καθώς μέσω της φαγοκυττάρωσης απομακρύνουν διάφορα αντιγόνα. Άλλες λειτουργίες στις οποίες ασκούν τη δράση τους είναι στη συστολή των μυών και στη σηματοδότηση των κυττάρων. Συνεπώς, το οξειδωτικό stress να μεν μπορεί να επιφέρει βλάβες στον οργανισμό, αλλά αυτές αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για την εύρυθμη λειτουργία του. [36][37] Παρόλα αυτά δεν πρέπει να περιθωριοποιείται το γεγονός ότι στα φυσιολογικά κύτταρα, οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου παράγονται με ελεγχόμενο τρόπο και μπορούν να εξυπηρετούν χρήσιμους σκοπούς για τα κύτταρα. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει πως τα οξειδωτικά, τα οποία σχηματίζονται ως απόκριση σε φυσιολογικά σημάδια λειτουργούν ως απαραίτητα μόρια σηματοδότησης για τη ρύθμιση διεργασιών, όπως η απόκριση στο στρες, η κυτταρική διαίρεση, η φλεγμονή, η ανοσοποιητική λειτουργία και η αυτοφαγία. [38]

## 1.7 Δραστικές ρίζες οξυγόνου-ROS

Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής ROS αποτελεί παραπροϊόν της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας. Στον άνθρωπο παρατηρείται η δημιουργία ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Αυτό το ενδιάμεσο προϊόν τελικά θα σχηματίσει ένα μόριο νερού ( $H_2O$ ). Επιπλέον, οι αντιδράσεις ουβικινόνης που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα μπορούν να συντονίζουν τη ροή των ηλεκτρονίων στα άτομα  $O_2$  άμεσα. Τελικά, έως και το 2% του μιτοχονδριακού οξυγόνου μπορεί να εισέλθει στην αναπνευστική αλυσίδα και να σχηματίσει ανιόντα υπεροξειδίου ( $\cdot O_2^-$ ). Για τη διατήρηση της ομοιόστασης κρίνεται από το κύτταρο απαραίτητο να επέλθει ισορροπία ανάμεσα στην

παραγωγή και την αδρανοποίηση των οξειδωτικών μορφών οξυγόνου. Για να επιτευχθεί αυτό, επιστρατεύονται διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια, βασικότερα εκ των οποίων είναι τα κάτωθι:

- Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide dismutases-SOD), η οποία καταλύει την αντίδραση:  $\cdot\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  [39]
- Η καταλάση, η οποία καταλύει την αντίδραση:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  [40]
- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η οποία καταλύει την αντίδραση:  $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$  [41]

Πιστεύεται πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ευθύνονται για περίπου 10.000 αλλαγές στις βάσεις του γενετικού μας υλικού ανά κύτταρο καθημερινώς. Επιπροσθέτως, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι περισσότερο επιρρεπές στο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με το πυρηνικό. Αυτός είναι και ο λόγος κατά τον οποίο συμβαίνουν μεταλλάξεις στα οργανίδια αυτά. [37]

## 1.8 Μιτοχόνδρια και Ασθένειες

Όπως έχει ειπωθεί προηγουμένως, τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια τα οποία φέρουν σε πέρας αρκετές μεταβολικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα η παραγωγή μορίων ATP μέσω της κυτταρικής αναπνοής. Η τελευταία, μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, καθίσταται κύρια αιτία μεγάλου αριθμού μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών. [42] Η λειτουργία των μιτοχονδρίων, όπως όπως και η ποιότητα, πρέπει να ελέγχονται αυστηρά ώστε να εξασφαλίζεται η παροχή των μεταβολικών δομικών στοιχείων και να αποφεύγεται η παραγωγής επιβλαβών παραγόντων, όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). [43] Με τον όρο μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες αναφερόμαστε στη γήρανση των μιτοχονδρίων, σε αλλαγές του κυτταρικού περιβάλλοντος, όπως η εμφάνιση πυρετού και η παρουσία φαρμάκων, και σε διάφορες παθολογίες, όπως ο καρκίνος, η νόσος Αλτσχάιμερ, η νόσος Πάρκινσον, η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση, και άλλες. Αυτές έχουν τη γενετική βάση τους σε μεταλλάξεις γονιδίων, τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνες σχετικές με την αναπνευστική αλυσίδα ή τα σύμπλοκα της συνθετάσης ATP (ATP synthase). Απότοκο αυτών των αιτιών αποτελεί συνηθέστερα η επιβάρυνση της κυτταρικής λειτουργίας των μυών και των νευρώνων με αποτέλεσμα τις νευροεκφυλιστικές και καρδιαγγειακές ασθένειες. [44][45][46][47]

## 1.9 Συστήματα Ανταπόκρισης σε Στρες

### 1.9.1 Ολοκληρωμένη Ανταπόκριση σε Στρες (Integrated Stress Response–ISR)

Η Ολοκληρωμένη Ανταπόκριση σε Στρες (ISR) είναι μια κυτταρική διαδικασία, που είναι καλά διατηρημένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα, μειορυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ως απόκριση σε εσωτερικές ή περιβαλλοντικές πιέσεις. [48] Μερικοί εκ των κύριων παραγόντων ενεργοποίησης του είναι η ανταπόκριση σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum Unfolded Protein Response – UPRER), η αυξημένη παρουσία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αμινοξέων, η ύπαρξη δίκλωνου μορίου RNA ικής προέλευσης (dsRNA), η ανεπάρκεια αίμης, η υποξία και η μείωση της γλυκόζης. [48] [49] Στρες αυτών των τύπων μπορεί να διεγείρει τις πρωτεϊνικές κινάσες GCN2, PERK, PKR και HRI, οι οποίες φωσφορυλιώνουν καθοδικά την α υπομονάδα ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος που ονομάζεται παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 2 (translation initiation factor 2 – EIF2), με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθούν γονίδια απόκρισης σε στρες (όπως για παράδειγμα το ATF4). Το σύμπλεγμα EIF2 απαρτίζεται από τρεις υπομονάδες: EIF2α, EIF2β και EIF2γ. Η EIF2α διαθέτει δύο θέσεις δέσμησης, μία για δέσμηση RNA και μία για φωσφορυλίωση. [48] Η δράση αυτών των κινασών αφορά τη φωσφορυλίωση της σερίνης 51 στην α υπομονάδα, η οποία παρόλα αυτά είναι αναστρέψιμη. [50] Σε φυσιολογικές συνθήκες το σύμπλοκο EIF2 βοηθά το κύτταρο στην έναρξη της μετάφρασης του mRNA και στην αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης AUG. [48] Όμως, μόλις το EIF2α φωσφορυλιωθεί, η δραστηριότητα του συμπλόκου μειώνεται δραστικά, προκαλώντας μείωση της έναρξης μετάφρασης και της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ ταυτόχρονα επάγει την έκφραση του γονιδίου *ATF4*. [50] Τέλος, η πρωτεΐνη ATF4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος προάγει τη μεταγραφή γονιδίων στα οποία εκφράζονται πρωτεΐνες απόκρισης στο στρες, όπως η CHOP (C/EBP Homologous Protein-CHOP) και η GADD34, με σκοπό να αποκατασταθεί η ομοιόσταση του κυττάρου. [51] Βέβαια πρέπει να τονιστεί πως η παρατεταμένη ενεργοποίηση ISR προκαλεί τελικά κυτταρικό θάνατο μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών. [52]

### **1.9.1.1 Μετάφραση και Αναρροϊκά Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης (*upstream Open Reading Frames–uORF*)**

#### **1.9.1.1.1 Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης (*Open Reading Frames–ORFs*)**

Για τη μοριακή βιολογία, τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (*Open Reading Frames–ORFs*) ονομάζονται πεδία αλληλουχίας DNA ανάμεσα στα κωδικόνια έναρξης και τερματισμού. Γενικά, αυτή η άποψη προσδιορίζει μια γνωστή περιοχή προκαρυωτικής αλληλουχίας DNA, στην οποία μόνο ένα από τα έξι πλαίσια ανάγνωσης μπορεί να είναι ανοιχτό (η ανάγνωση αναφέρεται στο μεταγραφόμενο RNA και την αλληλεπίδρασή του με το ριβόσωμα). Ένα ORF μπορεί να έχει ένα κωδικόνιο έναρξης (AUG για το RNA) και ολοκληρώνεται μετά από ένα κωδικόνιο λήξης (UAG, UGA, UAA). [53] Το κωδικόνιο έναρξης (όχι πάντα το πρώτο) προσδιορίζει το μέρος όπου θα ξεκινήσει η μετάφραση. Η αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής λαμβάνει χώρα μετά το ORF, πέρα από το κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης. [54] Επίσης, είναι γνωστό πως στους ευκαρυώτες, για την ολοκλήρωση της μεταγραφής, τα εσώνια αφαιρούνται και τα εξώνια ματίζονται, με σκοπό να σχηματιστούν τα ώριμα mRNA. Ο ορισμός έναρξης-διακοπής για τα ORFs βρίσκει εφαρμογή μόνο για ώριμα mRNA και όχι για γονιδιωματικό DNA, καθώς εκεί βρίσκονται αλληλουχίες εσωνίων οι οποίες ίσως περιέχουν κωδικόνια τερματισμού και προκαλούν μετατοπίσεις στα πλαίσια ανάγνωσης. [55]

#### **1.9.1.1.2 Αναρροϊκά Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης (*upstream Open Reading Frames–uORF*)**

Όπως σε πολλές διαδικασίες, έτσι και στην μετάφραση, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διακατέχονται από υψηλά επίπεδα ρύθμισης. Εδώ συγκεκριμένα, στο 5' UTR (5' untranslated region–5' UTR) υπάρχουν ορισμένα σημαντικά στοιχεία που ονομάζονται αναρροϊκά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (*upstream Open Reading Frame–uORF*). Αυτά τα στοιχεία είναι πολύ κοινά, και βρίσκονται στο 35-49% των γονιδίων των ανθρώπων. [56] Ένα uORF αποτελεί μια κωδικοποιούσα αλληλουχία, η οποία βρίσκεται στο 5' UTR και προηγείται της θέσης έναρξης της κύριας κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Αυτά τα uORF περιέχουν δικό της κωδικόνιο έναρξης, γνωστό ως αναρροϊκό AUG (uAUG). Αυτό το κωδικόνιο μπορεί να αναγνωριστεί από το ριβόσωμα και έπειτα να μεταφραστεί για να δημιουργηθεί ένα προϊόν, το οποίο μπορεί να ρυθμίσει τη μετάφραση της κύριας αλληλουχίας που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ή άλλων uORF που ίσως βρίσκονται στην ίδια περιοχή. [57] Ακόμα, έχει βρεθεί πως τα uORF μπορούν και ρυθμίζουν την έκφραση των ευκαρυωτικών γονιδίων. Η μετάφραση της uORF αναστέλλει την



έκφραση του κύριου ORF που βρίσκεται καταρροϊκά. [58], [59] Η μετάφραση του πρωτεϊνικού μορίου το οποίο κωδικοποιείται εντός του κύριου ORF καταρροϊκά μιας αλληλουχίας uORF είναι γνωστή ως επανέναρξη. [60] Η διαδικασία της επανέναρξης είναι γνωστό ότι μειώνει την απόδοση της μετάφραση της πρωτεΐνης του κύριου ORF. Ο έλεγχος της πρωτεϊνικής ρύθμισης αφορά στην απόσταση μεταξύ του uORF και του πρώτου κωδικονίου του κυρίου ORF. [60] Έχειδειχθεί, πως ένα uORF αυξάνει την επανέναρξη με βάση το κριτήριο της μεγαλύτερης απόστασης. Δηλαδή, η επανέναρξη θα επαχθεί αν υπάρχουν αρκετές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταξύ του uAUG και του κωδικονίου έναρξης του κύριου ORF. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι το ριβόσωμα χρειάζεται να ανακτήσει μεταφραστικούς παράγοντες προτού μπορέσει να πραγματοποιήσει τη μετάφραση της κύριας πρωτεΐνης. [60] Επιπροσθέτως, πρέπει να αναφερθεί ότι σε ορισμένα mRNAs με μεγάλες περιοχές 5'-UTR, περιέχονται σε αυτές ένα ή περισσότερα uORF, τα οποία είναι κατά τέτοιον τρόπο διατεταγμένα, ούτως ώστε να αναστέλλεται η μετάφραση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας που βρίσκεται καταρροϊκά. Αυτό το γεγονός συνήθως βρίσκει εφαρμογή στη ρύθμιση της μετάφρασης των mRNAs αυξητικών παραγόντων και διάφορων πρωτο-ογκογονιδίων, τα οποία τυγχάνουν αντικείμενα θετικής ρύθμισης ύστερα από την επίδραση διαφόρων ειδών στρες.

### ***1.9.1.2 Αναρροϊκά Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης (upstream Open Reading Frames–uORF) και EIF2α***

Προηγουμένως, αναφέρθηκε ότι μόλις ο παράγοντας EIF2α φωσφορυλιωθεί μειώνεται η σύνθεση των πρωτεΐνων. Παράλληλα, το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα και την επιλεκτική μετάφραση των μορίων mRNA που περιέχουν uORF στην 5' αμετάφραστη περιοχή της. Η επιλεκτική αυτή μετάφραση, λόγω του φωσφορυλιωμένου EIF2α χρειάζεται ένα ή περισσότερα uORF αναρροϊκά του κύριου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης στην 5' αμετάφραστη περιοχή του. Μόλις περατωθεί η μετάφραση του πρώτου κατά σειρά uORF, λαμβάνει χώρα διαχωρισμός του ριβοσώματος και η υπομονάδα 40S συνεχίζει να διαβάζει το mRNA για επόμενο ORF. Αντιθέτως, υπό την παρουσία μη φωσφορυλιωμένου EIF2α, η μεταφραστική διαδικασία ξεκινά εκ νέου άμεσα, με αποτέλεσμα να μεταφραστεί ένα δεύτερο uORF, το οποίο επικαλύπτει την αλληλουχία του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης (μεθειονίνη) του κύριου ORF, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάφραση. Παρόλα αυτά, όταν προκύπτει φωσφορυλίωση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης 2α, καθυστερεί η αναγέννηση του



αρχικού συμπλόκου. Έτσι, επιτρέπεται στο ριβόσωμα μέσω του κωδικονίου έναρξης του δεύτερου uORF να συνεχίσει να σαρώνει. Επομένως, παρέχεται έτσι η δυνατότητα στο ριβόσωμα να προσδεθεί στο κυρίως ORF με μεγαλύτερη επιτυχία. Κλείνοντας, ρύθμιση αυτού του τύπου λειτουργεί κατά τη μετάφραση των πρωτεϊνών CHOP, ATF4 και ATF5, μιας και αυτές απαιτούν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένου EIF2α για τη σύνθεσή της, λόγω της παρουσίας uORF στην 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA από το οποίο κωδικοποιείται η καθεμία. [61]

### 1.9.1.3 ATF4

Ο ATF4 αποτελεί βασικό μεταγραφικό παράγοντα τύπου φερμουάρ λευκίνης (Basic Leucine Zipper Domain-BZIP), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ATF/CREB). [62]–[64] Δύναται να διμερίζεται με διαφορετικά στοιχεία με σκοπό να επηρεάσει τη ρύθμιση της μεταγραφής. Στην ουσία, ο ATF4 καθορίζει το μέλλον του κυττάρου εξαιτίας του γεγονότος ότι συμμετέχει στην ενεργοποίηση του μηχανισμού ISR, ενώ επίσης διαθέτει σημαντικές ικανότητες ρύθμισης σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Το ίδιο ισχύει και για την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Απότοκο αυτής της σύνθετης ρύθμισης είναι το γεγονός ότι το σύστημα ISR παράγει ξεχωριστές αποκρίσεις, προσαρμοσμένες σε διαφορετικά κυτταρικά στρες. Φυσικά, αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση διαφορετικών γονιδίων-στόχων από τα σύμπλοκα που σχηματίζει ο ATF4, τα οποία εμφανίζουν σχέση εξάρτησης με την ένταση του στρες που λαμβάνει χώρα. [63], [65]

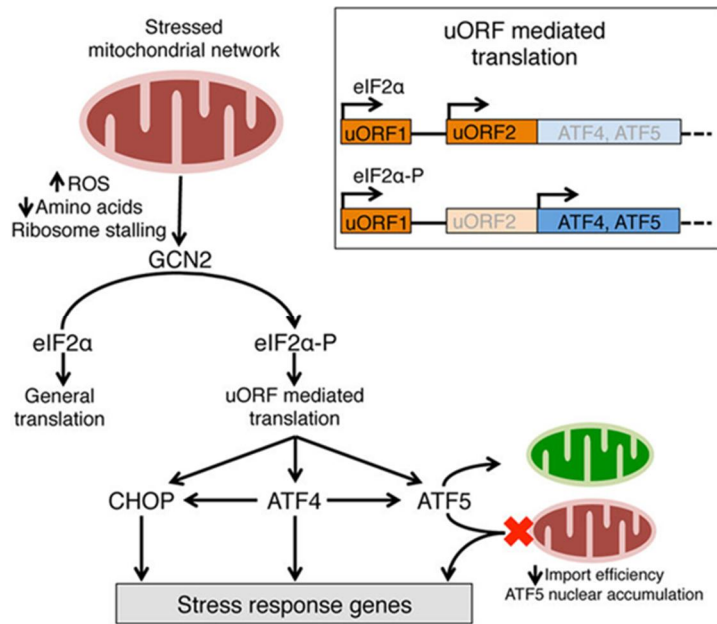
Κατά τη διάρκεια συνθηκών στρες, η αυξημένη μετάφραση του *ATF4* διευκολύνει την μεταγραφική αυξορρύθμιση των γονιδίων που ανταποκρίνονται στο στρες. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του, μέσω δέσμευσης σε αλληλουχίες CARE (στοιχεία απόκρισης C/EBP ATF, C/EBP ATF Response Element-CARE), τα οποία μπορούν να μεσολαβήσουν για τη μεταγραφική ενεργοποίηση ως απόκριση σε πληθώρα ερεθισμάτων. [66]–[68] Ο ATF4 έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει ομοδιμερή και ετεροδιμερή με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες BZIP, μεταξύ άλλων του καταρροϊκού στόχου του, CHOP. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό πως οι ATF4 και CHOP αλληλεπιδρούν με στόχο τη ρύθμιση κοινών γονιδίων-στόχων, τα οποία εμπλέκονται στις μεταβολικές διεργασίες των αμινοξέων, στη μετάφραση mRNA, καθώς και στην απόκριση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (UPR). [69]

#### 1.9.1.4 CHOP

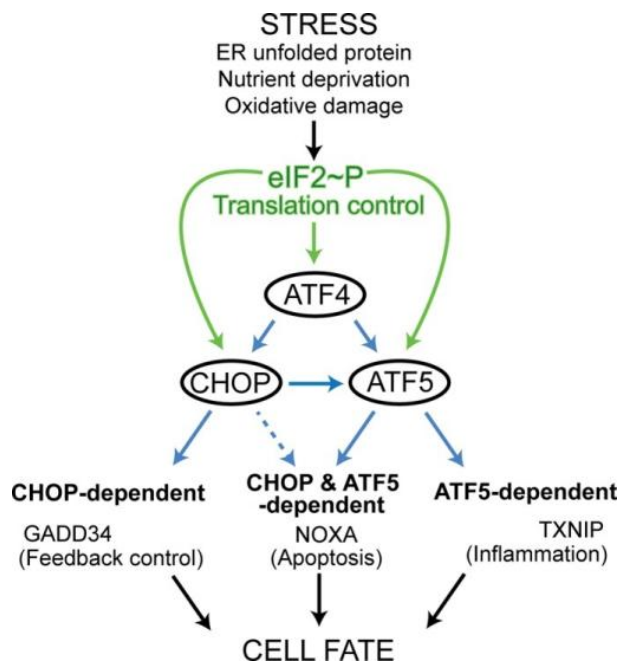
Η πρωτεΐνη CHOP είναι μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος, μπορεί να ρυθμίσει περαιτέρω την γονιδιακή έκφραση με το να δεσμεύεται σε άλλα μέλη της οικογένειας ATF/CREB, όπως ATF4 ή ATF3. Κατ' αυτόν τον τρόπο αλλάζει η ειδικότητα δέσμευσης DNA. [65], [70] Πιο αναλυτικά, η CHOP είναι ένας πολυλειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας, η οποία ανήκει στην οικογένεια BZIP και διμερίζεται με μέλη των πρωτεϊνικών οικογενειών C/EBP και ATF/κυκλικής απόκρισης αδενοσίνης 3',5'-μονοφωσφορικής απόκρισης. [71] Η έκφρασή της επάγεται μέσω της ενεργοποίησης του JUN, η οποία διαμεσολαβείται από την C-Jun N-τερματική κινάση 2 κατά τη συσσώρευση ΔΟΤC (Ornithine Transcarbamylase-ΔΟΤC), η οποία αποτελεί μία μεταλλαγμένη μορφή της τρανσκαρβαμυλάσης ορνιθίνης. [72], [73] Στο πλαίσιο της δυσλειτουργίας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, ο ρόλος της CHOP είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς η CHOP προτάθηκε ως ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που μεταφέρει την απόκριση σε κυτταρικό στρες. [74]

Εντός του πλαισίου του ISR λειτουργούν μονοπάτια, τα οποία δύναται να καταλήξουν σε επαγωγή κυτταρικού θανάτου, εάν δεν αποκατασταθεί η ομοιόσταση από την προσαρμοστική απόκριση. Αυτά ρυθμίζονται κατά βάση μέσω της μεταγραφικής δραστηριότητας του ATF4 και ορισμένων από τους καταρροϊκούς στόχους του, ιδιαίτερα του CHOP. Η ενεργοποίηση του παράγοντα CHOP μέσω της μεσολάβησης του ATF4 αποτελεί έναν από τους καλύτερα μελετημένους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, ο οποίος προκαλείται στο πλαίσιο του ISR. [65][70][75][76] Για παράδειγμα, η CHOP μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερές με τον παράγοντα ATF4, ενισχύοντας το σήμα του κυτταρικού θανάτου, ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών προ-αποπτωτικών γονιδίων όπως των *PMAIP1* (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein-PMAIP1), *APAF 1* και *TXNIP* (Thioredoxin Interacting Protein-TXNIP). [71]

Η επαγωγή CHOP κατά τη διάρκεια της ISR πιστεύεται ότι προάγει τη σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου μέσω πολλαπλών μηχανισμών μέσω επαγωγής της πρωτεΐνης GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34-GADD34), αποφωσφορύλιωσης της EIF2α και ενεργοποίησης της Οξειδοοξειδοκτάσης 1 Άλφα. [75], [76]



**Εικόνα 7: Στα θηλαστικά, η MTUPR συνδέεται στενά με την ISR.** Κατά τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ο EIF2α (παράγοντας έναρξης μετάφρασης) φωσφορυλιώνεται από μία από τις τέσσερις ειδικές για EIF2α κινάσες (PERK, PKR, GCN2 και HRI). Ο φωσφορυλιωμένος EIF2α οδηγεί σε μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση με παράλληλη αύξηση στη μετάφραση των mRNA που περιέχουν uORF στο 5' UTR. Τα mRNA που κωδικοποιούν τους παράγοντες μεταγραφής CHOP, ATF4 και ATF5 διαθέτουν πολλαπλά uORF και μεταφράζονται κατά προτίμηση κατά τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Κατά τη διάρκεια του μιτοχονδριακού στρες και οι τρεις χρειάζονται για την αύξηση σχετιζόμενων γονιδίων με το MTUPR. Τόσο η CHOP όσο και ο ATF4 επάγουν τη μεταγραφή του ATF5. Όπως το ATFS 1 στο *C. elegans*, το ATF5 φιλοξενεί μια μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης που μπορεί να του επιτρέπει να ανταποκρίνεται ειδικά στο μιτοχονδριακό στρες μέσω μειωμένης εισαγωγής μιτοχονδριακής πρωτεΐνης. Πηγή: Cole M Haynes, Andrew Melber, 2018.



**Εικόνα 8:** Το στρες που διαταράσσει την πρωτεϊνική ομοιόσταση προκαλεί φωσφορυλίωση του EIF2α, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των, τύπου BZIP, μεταγραφικών παραγόντων ATF4, CHOP και ATF5 μέσω αυξημένης μετάφρασής τους. Οι ATF4 και CHOP δεσμεύονται στον υποκινητή του *ATF5* και επάγουν ενίσχυση της μετάγραφής του. Πηγή: Ma and Hendershot, 2003; Marciniak et al., 2004; Kilberg et al., 2012.

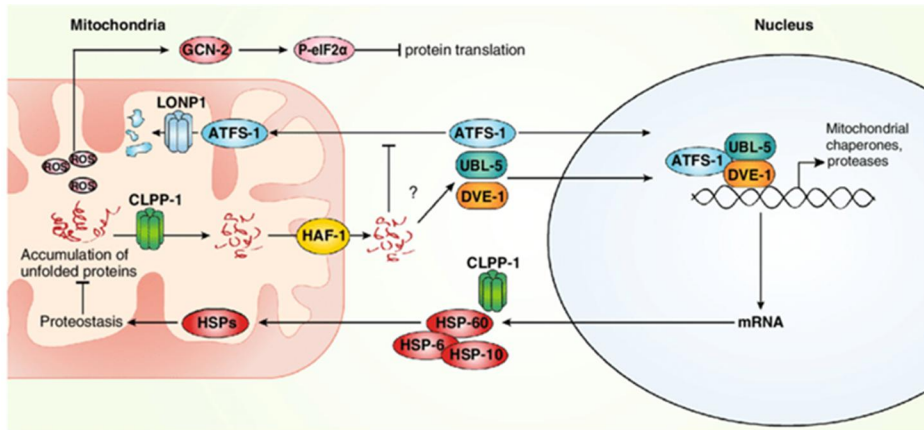
## 1.9.2 Μιτοχονδριακή Απόκριση Μη Αναδιπλωμένων Πρωτεϊνών (MTUPR)

Τα μιτοχόνδρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αρκετούς διαφορετικούς τύπους στρες, οι οποίοι μπορούν να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση σχετικής μιτοχονδριακής απόκρισης. Επίσης, είναι γνωστό πως, φυσιολογικά, οι πρωτεΐνες στο περιβάλλον τους αποτελούν ελαφρώς ασταθή μόρια, τα οποία είναι επιρρεπή στην απώλεια της σωστής τους αναδίπλωσης και στο σχηματισμό συσσωματωμάτων. [77] Επομένως, στα μιτοχόνδρια έχει αναπτυχθεί ένας μηχανισμός απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (mitochondrial unfolded protein response-MTUPR), ο οποίος ενεργοποιείται για την αποκατάσταση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης κατά την εσφαλμένη αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και ελέγχεται από την επικοινωνία μεταξύ μιτοχονδρίων και πυρήνα. [78] Τέλος, η MTUPR παρατηρείται είτε στη μήτρα είτε στη εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. [79] Κατά τη διάρκεια αυτής της απόκρισης, το

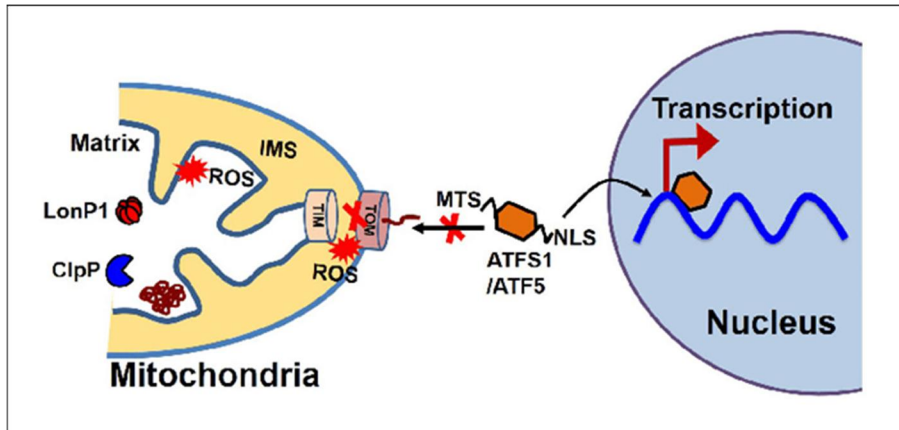
μιτοχόνδριο ή θα αυξορρυθμίσει τις πρωτεϊνικές μοριακές συνοδούς ή θα χρησιμοποιήσει πρωτεάσες για να αποικοδομήσουν τις μη λειτουργικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. [79]

### **1.9.2.1 *C.elegans* και MTUPR**

Στον οργανισμό μοντέλο *C. elegans*, έχει αποδειχτεί ότι ο ATFS 1 δρα ως ένας απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας για την ενεργοποίηση του MTUPR. [80] Αυτός, πέρα από την αλληλουχία NLS (Nuclear Localization Sequence-NLS), η οποία είναι χρήσιμη για την εισαγωγή του στον πυρήνα (χαρακτηριστικό γνώρισμα των BZIP μεταγραφικών παραγόντων), φιλοξενεί και μία αλληλουχία MTS (Mitochondrial Targeting Sequence-MTS), για να μπορεί να εισέρχεται και στα μιτοχόνδρια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας αυτός, αφού εισέλθει στα εν προκειμένω οργανίδια (στα μιτοχόνδρια) αποσυντίθεται από την πρωτεάση LON, η οποία εδράζεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Βέβαια, σε προβληματικές συνθήκες των μιτοχονδρίων, δεν καθίσταται ελεύθερη η είσοδος του ATFS 1 στο μιτοχόνδριο, αλλά εξαιτίας της αλληλουχίας NLS αυτός εισέρχεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή. Υπό την προϋπόθεση αφαίρεσης ή αδρανοποίησης της MTS, ο παράγοντας ATFS 1 συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, έτσι ώστε να εισέλθει στον πυρήνα, λόγω της αλληλουχίας NLS, για να ενεργοποιήσει το MTUPR. Τα περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια που εισβάλλουν στα μιτοχόνδρια περιέχουν μία αμινοτελική αλληλουχία MTS και μέσω αυτής στοχεύουν αρχικά το σύμπλοκο TOM (TOM complex – Translocase of the Εισαγωγή Outer Membrane complex) της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, ενώ έπειτα προσδένονται στο σύμπλοκο TIM23 (TIM23 complex – Translocase of the Inner Membrane 23 complex) της εσωτερικής μεμβράνης, με σκοπό να περάσουν στη μιτοχονδριακή μήτρα. [81] Το σύμπλοκο TIM23 χρειάζεται ενέργεια (ATP), βαθμίδωση πρωτονίων (από την αναπνευστική αλυσίδα), και τη μοριακή συνοδό MTHSP70 , για να πραγματοποιηθεί η μετάβαση των μορίων μέσω της εσωτερικής μεμβράνης. [82], [83]



**Εικόνα 9:** Σε φυσιολογικές συνθήκες ο παράγοντας ATFS 1 μετακινείται στα μιτοχόνδρια και αποικοδομείται από τη LONP-1. Ο ATFS 1 μαζί με τους πυρηνικούς παράγοντες UBL-5 και το DVE-1 ενεργοποιούν τα προστατευτικά γονίδια-στόχους της MTUPR, που πραγματοποιούν την ανασύσταση της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης. ταυτόχρονα με τη μεταγραφική λειτουργία του ATFS 1, οι ROS ενεργοποιούν την κινάση GCN-2 που φωσφορυλιώνει τον παράγοντα EIF2α, πράγμα που οδηγεί σε μειорύθμιση της ολικής μετάφρασης (για μείωση του φορτίου των νέων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, που θα χρειαστούν βοήθεια για σωστή αναδίπλωση). Πηγή: Adrienne Mottis, Virginija Jovaisaite, Johan Auwerx, 2014.



**Εικόνα 10: Μιτοχονδριακή και πυρηνική επικοινωνία σε MTUPR.** Στον *C. elegans*, η επικοινωνία μεταξύ μιτοχονδρίων και πυρήνα διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα ATFS 1, ενώ στα θηλαστικά από τον ATF5. Και οι δύο περιέχουν μια αλληλουχία μιτοχονδριακής στόχευσης (MTS) και ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Φυσιολογικά, ο ATFS 1 ή ο ATF5 εισέρχονται κατά προτίμηση στα μιτοχόνδρια και αποικοδομούνται από μιτοχονδριακές πρωτεάσες (LONP-1, ClpP και άλλες). Υπό συνθήκες στρες, λόγω υψηλής παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια, οι συνθήκες καθίστανται ευνοϊκές για την είσοδο του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα, όπου λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της μεταγραφής σειράς γονιδίων σχετικών με την MTUPR. Πηγή: Shafiul Alam<sup>1</sup>, Chowdhury S. Abdullah<sup>1</sup>, Richa Aishwarya<sup>2</sup>, Mahboob Morshed<sup>1</sup> and Md. Shenuarin Bhuiyan, 2020.



### 1.9.2.2 Θηλαστικά και MTUPR

Στα θηλαστικά, το MTUPR είναι ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τα μιτοχόνδρια προς τον πυρήνα με αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων που προστατεύουν τα μιτοχόνδρια. Σε αυτό συμπεριλαμβάνονται μιτοχονδριακές μοριακές συνοδοί και πρωτεάσες για την αποκατάσταση της λειτουργίας των πρωτεϊνών στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. [79] Πιο αναλυτικά, υφίστανται τρεις μεταγραφικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την ISR-: ο ATF4, ο ATF5 και ο CHOP (ή DDIT3), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια BZIP. Για την έκφραση, χρειάζεται να γίνει φωσφορυλίωση της α υπομονάδας του eIF2, η οποία εκτελείται εναλλακτικά από τέσσερα μόρια κινασών (GCN2, HRI, PERK ή PKR), τα οποία ανταποκρίνονται σε διαφορετικές μορφές στρες (αμινοξική στέρηση, ανεπάρκεια αίμης, λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών στο ER, ή ιογενή λοίμωξη). [50][84] Βέβαια, κάποια μόρια EIF2α είναι μόνιμα υπό φωσφορυλίωση, όμως ο αριθμός τους αυξάνεται όταν οι κινάσες GCN2 και PERK (που ελέγχονται από τον EIF2α) ενεργοποιούνται από αμινοξική έλλειψη, καθώς και μη σωστή λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου, αντιστοίχως. [85], [86] Έτσι, καθώς τα φωσφορυλιωμένα μόρια EIF2α αυξάνονται, μειορρυθμίζεται η ολική πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και η επιλεκτική μετάφραση των μορίων mRNA με uORF στις 5' αμετάφραστες περιοχές τους, όπως για παράδειγμα αυτά που εκφράζουν τους παράγοντες CHOP, ATF4 και ATF5. [87] Η πρωτεΐνη ATF5, στα θηλαστικά αποτελεί την ορθόλογη του παράγοντα ATFS 1 του *C. elegans* και έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τα γονίδια MTUPR κατά τη συσσώρευση μεταλλαγμένης μορφής τρανσκαρβαμυλάσης της ορνιθίνης (DOTC) στα μιτοχόνδρια. [88] Έχει αποδειχθεί λοιπόν ότι οι παράγοντες ATFS 1 και ATF5 τυγχάνουν αυστηρής ρύθμισης μετά την είσοδό τους στα μιτοχόνδρια, έτσι ώστε να εμφανίζουν δυνατότητα απόκρισης σε μιτοχονδριακό στρες. Μόλις το στρες λάβει χώρα, ο ATF5 επάγει αριθμό γονιδίων πρωτεασών και μοριακών συνοδών [89], [90].

Τέλος, από αυτές τις τρεις BZIP πρωτεΐνες (CHOP, ATF4 και ATF5), μόνο ο ATF5 διαθέτει αλληλουχία MTS, ανάλογη με εκείνη του ATFS 1. Έτσι, πιστεύεται ότι οι παράγοντες CHOP και ATF4 δεν στοχεύουν τα μιτοχόνδρια, αλλά ρυθμίζονται σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης, στο οποίο καθοριστικής σημασίας είναι η επαγωγή φωσφορυλίωσης του παράγοντα EIF2α. Μόλις κωδικοποιηθεί ο ATF5, έχει τη δυνατότητα να ανταποκρίνεται ανάλογα με την επικρατούσα κατάσταση των μιτοχονδρίων (έλλειψη ή μη της πρωτεόστασης). [90][91]

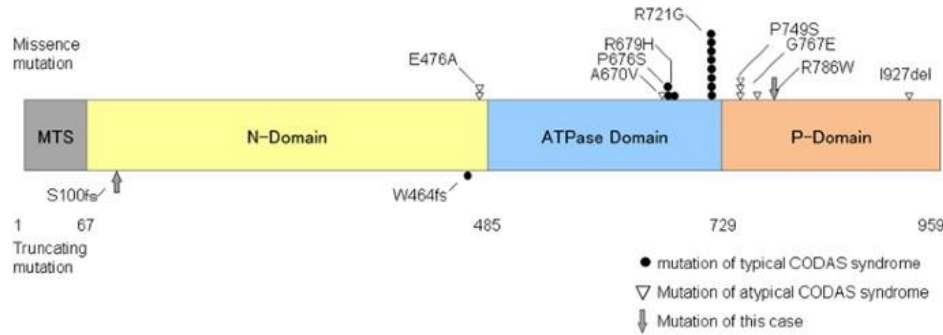


### **1.9.2.3 Μιτοχονδριακές Πρωτεΐνες και LONP-1**

Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται σε πυρηνικά γονίδια, κατευθύνονται προς τα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια της αλληλουχίας μιτοχονδριακής στόχευσης (mitochondrial targeting sequence-MTS), ακολουθώντας πορεία ανάλογη με εκείνη του ATF5. [92] [93] Η επιτυχία της διαδικασίας αυτής εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης που δημιουργείται από τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και τη δραστηριότητα ATPάσης της MTHSP70 στο σύμπλεγμα PAM (translocase-associated motor (PAM) complex PAM). [92] Μόλις πραγματοποιηθεί η είσοδος στη μιτοχονδριακή μήτρα, το N-τελικό άκρο της MTS της πρωτεΐνης διασπάται με τη βοήθεια της MPP (mitochondrial processing peptidase-MPP) για να απελευθερωθεί το ώριμο πολυπεπτίδιο, γεγονός το οποίο ακολουθείται από τη στρατολόγηση μιτοχονδριακών μοριακών συνοδών, όπως η MTHSP70, η μιτοχονδριακή HSP90, TRAP1 και η HSP60 της μιτοχονδριακής μήτρας, η οποία υποβοηθά την αναδίπλωση του πολυπεπτιδικού αυτού μορίου στη λειτουργική του διαμόρφωση. [94]

Σε εναλλακτική περίπτωση, οι πρωτεΐνες που έχουν υποστεί ζημιά ή λανθασμένη αναδίπλωση λόγω στρες, αποικοδομούνται από πρωτεάσες mPQC (Protein Quality Control-PQC) που εξαρτώνται από ATP (πρωτεάσες AAA+), όπως π.χ. LONP-1 [92]. Η ώριμη LONP-1 είναι καταλυτικά ενεργή στην ομο-εξαμερή της δομή, αν και έχει βρεθεί να λαμβάνει διαφορετικές διαμορφώσεις σε άλλους οργανισμούς. Θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε την ανθρώπινη LON σε τρία τμήματα, την πρωτεολυτική περιοχή P για την πρωτεόλυση, την περιοχή δέσμευσης ATP AAA + (τομέας ATPάσης) για τη δέσμευση και την υδρόλυση ATP και την N-τελική περιοχή, για την αναγνώριση και δέσμευση του υποστρώματος. [95], [96] Οι δύο τελευταίοι τομείς φαίνεται πως εμφανίζουν ιδιότητες μοριακής συνοδού. Η N-τελική περιοχή της MTHSP70 μπορεί να συνδεθεί απευθείας με την HSP60 [97], και το σύμπλεγμα HSP60–MTHSP70 μπορεί να λάβει μέρος στη μετατόπιση, την αναδίπλωση και τη συναρμολόγηση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γενετικό υλικό. [98], [99] Επιπλέον, το σύμπλεγμα HSP60–MTHSP70 συμμετέχει στην ισορροπία μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και απόπτωσης, καθώς και τη σταθερότητα του μιτοχονδριακού DNA. [99] Η LON μπορεί να αλληλεπιδράσει με το σύμπλεγμα HSP60–MTHSP70, και η σταθερότητα του συμπλέγματος με τη LON (HSP60–MTHSP70 –LON) έχει βρεθεί ότι ενισχύεται με αυξορρύθμιση της LON. Ως εκ τούτου, η πρωτεΐνη αυτή, ως κυτταροπροστατευτική μοριακή συνοδός, εκφράζεται περισσότερο για να αναστείλει την

απόπτωση και να προάγει την επιβίωση του κυττάρου μέσω δέσμευσής της στο σύμπλοκο HSP60–MTHSP70 κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες. [99]



**Εικόνα 11:** Λειτουργικοί τομείς της ανθρώπινης υπομονάδας LONP-1. Φαίνονται κατά σειρά η αλληλουχία μιτοχondριακής στόχευσης, η N-τερματική περιοχή, ο τομέας ATPάσης και η πρωτεολυτική περιοχή [100]. Πηγή: Takehiko Inui, Mai Anzai, Yusuke Takezawa, 2017.

### 1.9.2.4 ATF5

Προτού αναφερθούμε στον μεταγραφικό παράγοντα ATF5 (Activating Transcription Factor 5) είναι σημαντικό να μιλήσουμε σύντομα για τον τομέας φερμουάρ λευκίνης BZIP (leucine zipper domain). Αυτός περιλαμβάνεται σε αρκετές πρωτεΐνες ευκαρυωτικών οργανισμών, οι οποίες δεσμεύονται στο DNA. Σε μία περιοχή του τομέα βρίσκεται το τμήμα που ενσωματώνει τις ιδιότητες δέσμευσης σε ειδικές αλληλουχίες του DNA. Επίσης, περιέχεται το φερμουάρ λευκίνης που είναι απαραίτητο για να συγκρατήσει τις δύο πρωτεΐνες του διμερούς. Η περιοχή δέσμευσης στο DNA περιλαμβάνει ορισμένα βασικά αμινοξέα, όπως αργινίνη και λυσίνη. Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί ότι ο τομέας αυτός αποτελεί χαρακτηριστικό μιας ομάδας μεταγραφικών παραγόντων. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν και εμπίπτουν σε αυτήν την κατηγορία είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες ATF5 και NRF2 (Nuclear Factor Erythroid-Devoid 2-Related Factor 2). [62] Ύστερα από τη μεταγραφή του *ATF5* προκύπτουν δύο μόρια mRNA, εξαιτίας ματίσματος. Ο λόγος για τα *ATF5α* και *ATF5β*, τα οποία διαθέτουν μοναδικές 5' αμετάφραστες περιοχές (5'-UTR $\alpha$  και 5'-UTR $\beta$ , αντίστοιχα), και καταστέλλουν τη μετάφραση του παράγοντα ATF5. [63] Το γεγονός αυτό λαμβάνει χώρα διότι στην περιοχή 5'-UTR εδράζονται uORF, πράγμα που οδηγεί σε εκτός πλαισίου μεταγραφή, αναφορικά με την κωδικοποιούσα αλληλουχία του *ATF5*. [64] Τα δύο προκύπτοντα mRNA ρυθμίζονται με

διαφορετικούς μηχανισμούς, για παράδειγμα σε συνθήκες στρες επάγεται μόνο το *ATF5a*. Επιπλέον, σε συνθήκες στρες, προκύπτουν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του *EIF2a*, που οδηγούν στη μετάφραση του *ATF5a* κι έτσι το ριβόσωμα μετατοπίζεται προς την έκφραση της κωδικοποιούσας περιοχής του *ATF5* μακριά από τα ανασταλτικά uORF.

### **1.9.2.5 Μιτοχονδριακή HSP70**

Εντός της μιτοχονδριακής μήτρας βρίσκονται κυτοσολικά εκφρασμένες πρωτεΐνες, καθώς και πρωτεϊνικά μόρια που έχουν μεταφραστεί μέσα στα οργανίδια αυτά. Με σκοπό να διατηρείται η μιτοχονδριακή πρωτεόσταση, οι πρωτεΐνες αυτές, μετά την αναδίπλωσή τους, ελέγχονται ποιοτικά. Για να εξυπηρετηθεί ο ανωτέρω στόχος, τα μιτοχόνδρια διαθέτουν το δικό τους σύνολο πρωτεϊνών για την αντιμετώπιση θερμικού σοκ που εντοπίζεται εντός της μήτρας. [101]–[103] Πιο αναλυτικά, η μιτοχονδριακή μοριακή συνοδός HSP70 (mitochondrial HSP70-MTHSP70 ) αποτελεί βασικό μόριο για τη σωστή λειτουργία των πρωτεϊνών και τη διατήρηση της πρωτεόστασης, διαδικασίες οι οποίες επιτυγχάνονται με τον ενδεδειγμένο έλεγχο της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, συν-μεταφραστικά και μετα-μεταφραστικά. [104]–[108]

Ειδικότερα, η εντοπισμένη στη μήτρα MTHSP70 συμμετέχει στη μετατόπιση του καναλιού της εσωτερικής μεμβράνης (TIM23), διαδικασία η οποία απαιτεί σειρά μορίων και φυσικά κατάλληλο δυναμικό της μεμβράνης, το οποίο προκαλείται με τη βοήθεια της αναπνευστικής αλυσίδας. Η MTHSP70 ασκεί τη δράση της στην πολυ-υπομονάδα PAM (Presequence Translocase-Associated Motor), στην οποία αλληλεπιδρά με τα μετατοπιζόμενα πολυπεπτίδια για να κατευθύνει την κίνησή τους μέσω του καναλιού εισαγωγής στη μήτρα. [109], [110] Επιπλέον, σε ένα ξεχωριστό σύμπλεγμα, η μιτοχονδριακή HSP70 επάγει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και τη σύνθετη συναρμολόγηση εισαγόμενων πολυπεπτιδίων, εμποδίζοντας τη συσσώρευση τους. [111]–[113] Επιπλέον, αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο για τη βιογένεση των συστάδων σιδήρου-θείου εντός της μήτρας. [114]

### 1.9.3 Απόκριση Θερμικού Σοκ (Heat Shock Response-HSR)

Η Απόκριση Θερμικού Σοκ αφορά κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση στρες. Η ενεργοποίησή της προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης μοριακών συνοδών με στόχο την επίλυση των αρνητικών επιδράσεων, που εξασκούνται στις πρωτεΐνες, προκαλούμενες από στρεσογόνους παράγοντες, όπως η αυξημένη θερμοκρασία και το οξειδωτικό στρες. [115] Στα φυσιολογικά κύτταρα, η πρωτεόσταση είναι αναγκαίο να διατηρείται, αφού οι πρωτεΐνες αποτελούν κύριες λειτουργικές μονάδες του κυττάρου, [116] ενώ σε περίπτωση κατά την οποία η δομή τους αλλάξει, γίνονται δυσλειτουργικές, επηρεάζοντας κρίσιμες διεργασίες στο κύτταρο. Το αποτέλεσμα είναι η πρόκληση σημαντικών κυτταρικών βλαβών ή και ο θάνατος. [117] Έτσι λοιπόν, υπό συνθήκες στρες, η απόκριση θερμικού σοκ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πυροδοτήσει την έκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP), οι οποίες, ως επί το πλείστον, λειτουργούν ως μοριακές συνοδοί, συμβάλλοντας στην πρόληψη ή την επαναφορά των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στην σωστή τους διαμόρφωση. [118] Οι συγκεντρώσεις των HSP στο κυτταρόπλασμα υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ήδη σχετικά υψηλές, αλλά σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, αυξάνονται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα, με τη βοήθεια του παράγοντα μεταγραφής θερμικού σοκ HSF 1. [118]

Τα υποστρώματα των μοριακών συνοδών είναι πρωτεΐνες που έχουν λάβει λανθασμένη διαμόρφωση. Η διαδικασία πρόσδεσης των υποστρωμάτων στις μοριακές συνοδούς απαιτεί ενέργεια υπό τη μορφή ATP. [119] Οι εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές οι οποίες δύνανται να προκύψουν, δημιουργούν σημαντικό πρόβλημα αναφορικά με τη συσσώρευση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, επειδή δύνανται να αντιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. [120] Αντίθετα, οι μοριακές συνοδοί είναι αυτές που θα αποτρέψουν αυτήν τη συσσώρευση. [121] Οι κύριες HSP οι οποίες εμπλέκονται στην HSR περιλαμβάνουν τις HSP70 και HSP90. [122] Η οικογένεια μοριακών συνοδών HSP70 αποτελεί το κύριο σύστημα HSR εντός των κυττάρων, παίζοντας σημαντικό ρόλο, μεταφραστικά και μετα-μεταφραστικά, στην πρόληψη συσσωμάτωσης και στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. [123] Κάθε φορά που μεταφράζεται μια νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη, η HSP70 προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές της, με σκοπό να αποτρέψει τις ελαττωματικές αλληλεπιδράσεις μέχρι την ολοκλήρωση της μετάφρασης. [124] Η μετα-μεταφραστική αναδίπλωση μίας πρωτεΐνης λαμβάνει χώρα σε δύο επαναλαμβανόμενα βήματα κατά τα οποία αυτή δεσμεύεται και απελευθερώνεται ξανά και ξανά

από την μοριακή συνοδό με στόχο την κάλυψη των υδρόφοβων ομάδων και την σταδιακή ολοκλήρωση της αναδίπλωσης που θα καταλήξει στην ορθή τριτοταγή διαμόρφωση του υποστρώματος. [125] Επίσης, η HSP70 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποσυσσωμάτωση των πρωτεϊνών. [126] Σε περίπτωση κατά την οποία οι πρωτεΐνες αποτύχουν να αναδιπλωθούν σωστά, οι HSP70 μπορούν να κατευθύνουν τα συσσωματώματα αυτά προς την αποικοδόμησή τους, με τη βοήθεια του πρωτεασώματος ή μέσω αυτοφαγίας. [127]

### ***1.9.3.1 Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (HSP)***

Όπως ειπώθηκε ανωτέρω, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins – HSP) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνικών μορίων, οι οποίες παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από τα κύτταρα, υπό συνθήκες στρες. Έλαβαν το όνομά τους, επειδή πρώτα μελετήθηκαν σε σχέση με το θερμικό σοκ. [128] Πιο αναλυτικά, μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε οικογένειες με κριτήριο το μοριακό τους βάρος, και είναι οι HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40) και HSPB (μικρές HSP), καθώς και οι τσαπερονίνες HSPD/E (HSP60/HSP10) και CCT (TRiC). [129] Παρόλα αυτά, πλέον ξέρουμε ότι κωδικοποιούνται και κατά τη διάρκεια άλλων στρεσογόνων καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης στο κρύο, [130] της υπερϊώδους ακτινοβολίας, [131] σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, κατά τη διάρκεια της επούλωσης πληγών, υπό την παρουσία μολυσματικών παραγόντων και τοξικών ουσιών, και τα λοιπά. [132] Αρκετά μέλη της ομάδας HSP δρουν ως μοριακές συνοδοί με σκοπό να σταθεροποιήσουν νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες, να πετύχουν τη τριτοταγή τους δομή ή να βοηθήσουν τις πρωτεΐνες που λόγω στρες δεν είχαν δεχτεί σωστή αναδίπλωση. [133] Είναι σαφές πως αυτή η επαγωγή στην έκφραση τους υφίσταται μεταγραφική ρύθμιση. Στα θηλαστικά αυτή η αύξηση ρυθμίζεται από τέσσερις μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με το θερμικό σοκ (Heat shock transcription factors-HSF). [134][135][135] Σε απουσία στρεσογόνων συνθηκών, ο HSF 1 συνδέεται με τις κυτταροπλασματικές μοριακές συνοδούς HSP70 και HSP90. Ωστόσο, όταν οι ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες ξεπεράσουν τον αριθμό συσώρευσης που μπορούν να διαχειριστούν οι κυτταροπλασματικές μοριακές συνοδοί, ο HSF 1 διασπάται, τριμερίζεται και αλληλεπιδρά με τους υποκινητές των γονιδίων που αποτελούν την απόκριση θερμικού σοκ. [136] Ο HSF 1 είναι απαραίτητος για την έκφραση ενός αριθμού γονιδίων μοριακών συνοδών που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων των HSP70 και HSP90. [137]

### **1.9.3.2 Η Πρωτεΐνη CRYAB**

Το εν λόγω μόριο εμφανίζει δράση μοριακής συνοδού, εμποδίζοντας τη συσσώρευση μετουσιωμένων πρωτεϊνών και διατηρεί τις πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν την τάση να συσσωματώνονται, μέσα σε δεξαμενές μη φυσικών, αναδιπλούμενων ενδιάμεσων εντός μεγάλων, διαλυτών, πολυμερών δομών. [138] Η έκφραση της CRYAB (Alpha-crystallin B chain-CRYAB) σε διάφορους κυτταρικούς τύπους παρέχει προστασία από ένα ευρύ φάσμα αποπτωτικών ερεθισμάτων, οξειδωτικού στρες και έκθεσης σε αντικαρκινικά φάρμακα. [139]– [141] Απουσία του μορίου αυτού, τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση. [142] Η CRYAB περιέχει αρκετές θέσεις σερίνης, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιωθούν από συγκεκριμένους τύπους στρες ή από κινάσες που ενεργοποιούν τη μίτωση. [143] Η φωσφορυλίωση και η ολιγομερής οργάνωση αυτών των πρωτεϊνών είναι δυναμικές και τροποποιούνται βαθιά λόγω αλλαγών στο κυτταρικό περιβάλλον. [144] Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η CRYAB είναι, επίσης, μια αναγνωρισμένη αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, της οποίας η κύρια ιδιότητα είναι η αρνητική ρύθμιση προαποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL-2, όπως το Bax, [145], [146] αναστέλλοντας τη μεταφορά τους από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, αποτρέποντας έτσι την επαγόμενη από στρες απόπτωση. [146], [147]

### **1.9.4 Αντιοξειδωτική Απόκριση (Antioxidant Response)**

Είναι ιδιαίτερα σύνηθες για τα κύτταρα να εκτίθενται σε ποικίλα είδη στρεσογόνων παραγόντων (χημικών, περιβαλλοντικών, οξειδωτικών, φαρμακευτικών). Ευτυχώς, στο εσωτερικό τους υπάρχουν αμυντικά συστήματα, τα οποία λειτουργούν για να εξουδετερώσουν αυτές της στρεσογόνες μορφές μέσω της δράσης των *cis*-ενεργών στοιχείων των αντιοξειδωτικών (φάσης II αποτοξίνωσης). [148], [149] Επιπλέον, η δυναμική έκφραση των γονιδίων της φάσης II ρυθμίζεται από κάποιους μεταγραφικούς ρυθμιστές, οι οποίοι ονομάζονται στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response elements-ARE). Πληθώρα, μεταγραφικών παραγόντων αλληλεπιδρούν με τα ARE για να προκαλέσουν την επαγωγή έκφρασης μιας σειράς γονιδίων, τα οποία δρουν κυτταροπροστατευτικά. Επομένως, τα ARE αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, καθώς και ενεργοποιητικά μόρια της κυτταρικής προστασίας κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες. [150]

Η πρωτεΐνη Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ή NRF2, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος στον ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο *NFE2L2* (Nuclear Factor Erythroid-derived 2-Like 2-NFE2L2). [151] Το μόριο NRF2 αποτελεί μια βασική πρωτεΐνη με φερμουάρ λευκίνης (BZIP), η οποία μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, δηλαδή αυτών που προστατεύουν από οξειδωτική βλάβη. [152] *In vitro*, η NRF2 φαίνεται να συνδέεται με στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE) της περιοχής του υποκινητή γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες. [153] Η NRF2 επάγει την έκφραση της οξυγενάσης της αίμης (Heme Oxygenase-1, HO-1), οδηγώντας σε αύξηση των ενζύμων φάσης II. [154] Η HO-1 συμμετέχει στο πρώτο στάδιο του καταβολισμού της αίμης, δηλαδή διασπά την αίμη για να σχηματίσει τη μπιλιβερδίνη. Επιπλέον, τα ARE ρυθμίζουν και άλλες διαδικασίες, όπως το μεταβολισμό των υδατανθράκων, τη γνωστική λειτουργία, τη φλεγμονή, το μεταβολισμό του σιδήρου, την αναγέννηση του NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-NADPH) και την αναδιαμόρφωση των ιστών. [154]

Με μία διεισδυτικότερη ματιά, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1- Keap1), προσδένεται και καταστέλλει την NRF2 διατηρώντας την αγκυρωμένη στο κυτταρόπλασμα. Αυτό το γεγονός εξυπηρετεί την ουβικουιτινίωση και την πρωτεόλυση του μορίου NRF2. [155] Επομένως, υπό συνθήκες ηρεμίας, τα επίπεδα ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης NRF2 καθίστανται ελάχιστα. Αντίθετα, μόλις προκύψει οξειδωτικό στρες, η δραστηριότητα λιγάσης της ουβικουιτίνης E3, την οποία διαθέτει η πρωτεΐνη Keap1, αναστέλλεται. Έτσι, η Keap1 διαχωρίζεται από την NRF2, με αποτέλεσμα την επαγωγή των επιπέδων της πρωτεΐνης NRF2. Ως απότοκο, η NRF2 μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται με στοιχεία υποκινητών ARE. Κατά την πυρηνική μετατόπιση της NRF2, ενεργοποιείται σημαντικός αριθμός γονιδίων, της για παράδειγμα τα *NQO1* (NAD(P)H οξειδορεδοουκτάση της κινόνης 1), *SRXN1* (σουλφορεδοξίνη 1) και *HMOX1*. [156]–[159] Τα ένζυμα που κωδικοποιούνται στα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών σε πολλούς τύπους κυττάρων. [160] Μόλις ολοκληρωθεί η ανάκτηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στο κύτταρο, η Keap1 μεταφέρεται στον πυρήνα, εκτοπίζει την NRF2 από τα στοιχεία ARE και την συνοδεύει πίσω στο κυτταρόπλασμα. [161][162]



## 1.10 Καρκίνος και MTUPR

Της έχει ήδη ειπωθεί, κάτω από συγκεκριμένες στρεσογόνες συνθήκες επάγεται ο μηχανισμός της μιτοχονδριακής απόκρισης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, ο οποίος θα μπορούσε να αφορά και την διαδικασία της καρκινογένεσης. Έχει βρεθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα περιέχουν σημαντικούς αριθμούς μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, γεγονός που προκαλεί την αύξηση μιτοχονδριακών μοριακών συνοδών. [163] Είναι λοιπόν σημαντικό να μελετηθεί διεξοδικά ο μηχανισμός αυτός, που ενδέχεται να ευνοεί την πρόοδο των καρκινικών κυττάρων, καταστέλλοντας για παράδειγμα τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, την παραγωγή ROS και τη μειωμένη αερόβια αναπνοή, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε επαγωγή της γλυκόλυσης (φαινόμενο Warburg), καθώς και η σχέση του με τα άλλα κυτταρικά μονοπάτια ανταπόκρισης σε στρες. [164] Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του παράγοντα EIF2α, φυσιολογικά, επάγει την έκφραση των παραγόντων μεταγραφής CHOP, ATF4 και ATF5 για να μπορέσει το κύτταρο να διαχειριστεί τις μη σωστά αναδιπλωμένες και συσσωρευμένες πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά αυτός ο μηχανισμός παρέχει στα καρκινικά κύτταρα τη δυνατότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται. [165] Ειδικότερα, ο ATF5 εδράζεται, σε ό,τι αφορά την σηματοδότηση, καταρροϊκά των ATF4 και CHOP, και συντονίζει την έκφραση των αντιαποπτωτικών μορίων BCL2 και MCL1, άρα λειτουργεί και ως καταστολέας της απόπτωσης. [166] Επίσης, όταν αυτός ανασταλεί αρκετά είδη καρκινικών κυττάρων αποπίπτουν. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι ο ATF5 ρυθμίζει τους παράγοντες EGR1, mTOR, FGF21 (για ανάπτυξη και μεταβολισμό). [167]

Έχει παρατηρηθεί πως, κατά το MTUPR, τα επίπεδα μοριακών συνοδών και πρωτεασών αυξάνονται σημαντικά σε διάφορα είδη καρκίνου, γεγονός που συμβάλλει στην προστασία των καρκινικών κυττάρων έναντι της απόπτωσης, αλλά και στην επιβίωση και ανάπτυξή τους. [165] Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας από τη HSP60, που λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας των καρκινικών κυττάρων από θάνατο εξαρτώμενο από τα μόρια Bax και CypD. [168] Άλλο κλασικό παράδειγμα αποτελεί η MTHSP70, που έχει βρεθεί να ρυθμίζει τις δραστηριότητες των μονοπατιών P53 και PI3K–Akt, λειτουργώντας ως αρωγός για την επιβίωση των κυττάρων του όγκου, καθώς και για την μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial to Mesenchymal Transition–EMT). [169] Τέλος, έχει αποδειχτεί ότι οι πρωτεάσες των μιτοχονδρίων, οι οποίες λαμβάνουν μέρος στο MTUPR και αποικοδομούν τις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, συσχετίζονται με



την καρκινογένεση. Ο ATF5 επάγει τις πρωτεάσες της μιτοχονδριακής μήτρας LONP-1 και CIPP, ενώ απώλεια οποιασδήποτε από τις δύο, δύναται να αναστείλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση. [170]

## **1.11 Θεραπεία κατά του καρκίνου και MTUPR**

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι τύποι καρκίνου εμφανίζουν επαγωγή της μιτοχονδριακής απόκρισης UPR για την επιβίωση και την εξέλιξή τους. [171]–[173] Στην πραγματικότητα, τα καρκινικά κύτταρα επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι τα φυσιολογικά κύτταρα σε περίπτωση μείωσης των μορίων του MTUPR. Γι' αυτόν τον λόγο, οι σχετικοί ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους στην ανακάλυψη χημικών μορίων σχετιζόμενων με καταστολή του MTUPR, με σκοπό να τα χρησιμοποιήσουν ως θεραπεία κατά του καρκίνου. [165]

Η επαγωγή του παράγοντα ATF5 έχει συσχετιστεί με την επιβίωση καρκινικών κυττάρων σε όγκους, ενώ η μείωση των επιπέδων του οδηγεί στην αναστολή του όγκου. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση του πεπτιδίου CP-d/n-ATF5-S1 που διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες του κυττάρου και αποτελεί αναστολέα του ATF5, έχει βρεθεί να προκαλεί μείωση ανάπτυξη σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του μελανώματος και του προστάτη. [174]

Επιπλέον, έχει δειχθεί πως σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού και εντέρου, αλλά όχι σε φυσιολογικά, η καταστολή της HSP60 με siRNA προξενεί υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bax και επαγωγή απόπτωσης. [175]

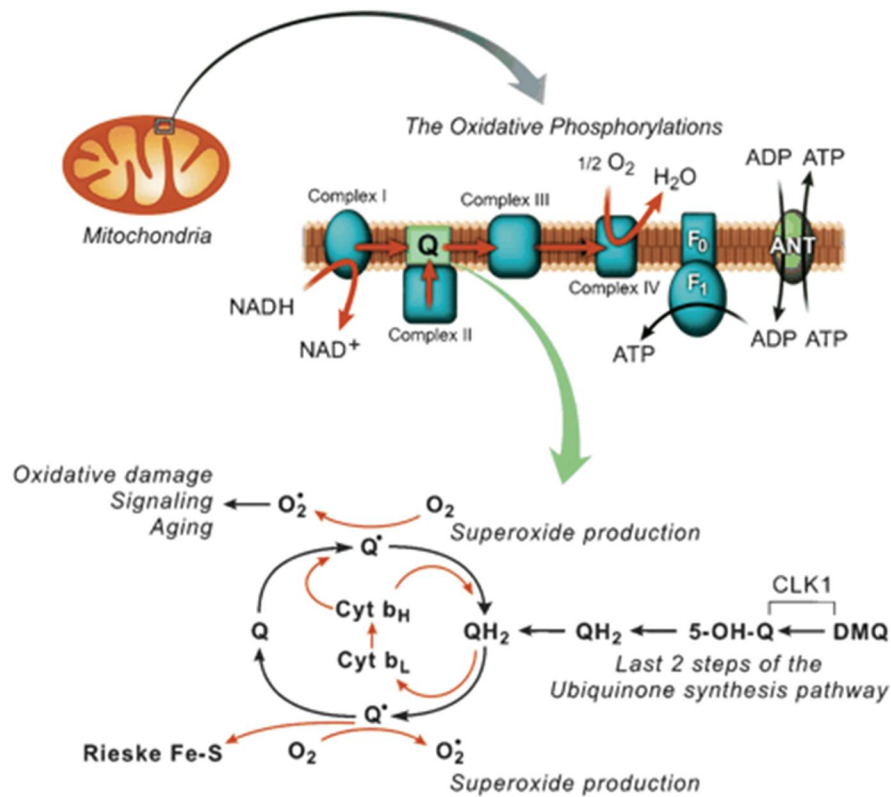
Τέλος, οι πρωτεάσες οι σχετιζόμενες με το MTUPR θα μπορούσαν επίσης να λειτουργήσουν ως στόχοι για την αναστολή του καρκίνου. Φερ' ειπείν, η μειορύθμιση της LONP-1 προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε σειρές καρκίνου του πνεύμονα. [176] Τέλος, αναστολή της CIPP δύναται να διαταράξει την αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, οι οποίες λαμβάνουν μέρος σε μεταβολικές διαδικασίες, κι έτσι λευχαιμικά κύτταρα μπορούν να οδηγηθούν σε θάνατο. [177]

## 1.12 Ροτενόνη και Παραγωγή ROS

Η Ροτενόνη αποτελεί μία άοσμη, άχρωμη και κρυσταλλική ισοφλαβόνη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως ισχυρό εντομοκτόνο και δηλητήριο ψαριών. Στη φύση συναντάται στο μίσχο και τους σπόρους αρκετών φυτών, όπως για παράδειγμα της αμπέλου Χίκαμα, και τις ρίζες αρκετών Κυαμοειδών. [178] Μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες παρεμβαίνοντας στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, ιδιαίτερα μέσω της αναστολής της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα κέντρα σιδήρου-θείου, στην ουβικινόνη του συμπλέγματος I. [179] Επομένως, η ροτενόνη λειτουργεί ως ένας ισχυρός αναστολέας του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας (CI), αφού αλληλεπιδρά με την NADH αφυδρογονάση ή αλλιώς οξειδοοδουκτάση της ουβικινόνης, επάγοντας κυτταρικό θάνατο. [180] Επίσης, έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει σύνδρομο παρόμοιο με τη νόσο του Πάρκινσον (PD) σε αρουραίους μετά από υποδόρια έγχυση.

Εξαιτίας της δράσης της, η ροτενόνη μπορεί να επάγει κυτταρικό θάνατο, αυξάνοντας την παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια, οι οποίες είναι από τους κύριους ρυθμιστές της απόπτωσης. Το παραπάνω έχει επιβεβαιωθεί, διότι μετά από επώαση με ροτενόνη τα κύτταρα εμφανίζουν κατακερματισμό στο DNA, απελευθέρωση κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση της κασπάσης 3. [181]

Η αναστολή του συμπλόκου I από τη ροτενόνη έχει βρεθεί ότι όχι μόνο οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ATP στα μιτοχόνδρια, αλλά επίσης ενισχύει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών από την αναπνευστική αλυσίδα, ενώ ξεκινά την αντίδραση υπεροξειδωσης λιπιδίων σε μιτοχόνδρια απομονωμένα από καρδιές βοοειδών. [182]–[185]



**Εικόνα 12:** Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο σύμπλοκο I ή στο σύμπλοκο II από NADH ή FADH<sub>2</sub>. Από τα δύο αυτά σύμπλοκα, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην ουβικινόνη (Q), κατόπιν στο σύμπλοκο III, και τέλος στο σύμπλοκο IV. Όταν το Q γίνεται QH<sub>2</sub> ή το αντίστροφο, η ουβικινόνη περνά από μια ενδιάμεση μορφή που είναι μια ρίζα ουβισεμικινόνης (Q•). Η ρίζα ουβισεμικινόνης μπορεί να παραχωρήσει το ελεύθερο ηλεκτρόνιο της στο κέντρο θείου-σιδήρου, αλλά μπορεί επίσης και να ανάγει το οξυγόνο σε υπεροξειδίο. Πηγή: Hugo Aguilaniu,<sup>1</sup> Jenni Durieux,<sup>1</sup> and Andrew Dillin, 2005

# ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

---

## 2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ανάλυση έκφρασης σειράς γονιδίων που συμμετέχουν σε διαφορετικά μονοπάτια ανταπόκρισης σε στρες μετά από επεμβάσεις ροτενόνης σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές μεσεγχυματικής προέλευσης.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ταυτοποίηση και ανάλυση ενδεχόμενης συνομιλίας μεταξύ των μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες μη σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών, που προκαλείται από την παραγωγή περίσσειας ελευθέρων ριζών οξυγόνου, λόγω αναστολής του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.

Τα μονοπάτια που μελετήθηκαν ήταν το μιτοχονδριακό μονοπάτι ανταπόκρισης σε μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών (mitochondrial Unfolded Protein Response, MTUPR), το μονοπάτι ολοκληρωμένης ανταπόκρισης σε στρες (Integrated Stress Response, ISR), το κυτταροπλασματικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες θερμικού σοκ (Heat Shock Response, HSR), και το αντιοξειδωτικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες (Antioxidant Stress Response, ASR), ενώ ως βιολογικό σύστημα χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές ινοσαρκώματος HT1080, και μελανώματος WM266-4.

## **Υλικά και Μέθοδοι**

---

## 3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

### 3.1.1 Κυτταρικές Σειρές

Οι κυτταρικές σειρές με τις οποίες ασχολήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία ήταν οι HT1080 και WM266 - 4.

Η κυτταρική σειρά HT1080 είναι καρκινική κυτταρική σειρά μεσεγχυματικού τύπου, η οποία προέρχεται από ινοσάρκωμα ασθενούς ανδρικού φύλου και ηλικίας 35 ετών. Ο ασθενής δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία ή κάποια άλλη θεραπεία, συνεπώς η κυτταρική σειρά δεν φέρει νέες μεταλλάξεις, όμως διαθέτει μία ενεργοποιημένη μορφή του ογκογονιδίου *N-RAS*. [202]

Η κυτταρική σειρά WM266-4 είναι κυτταρική σειρά ανθρώπινου μεταστατικού μελανώματος με μικρή επίπεδη μεσεγχυματική μορφολογία και τριπλοειδή φαινότυπο, ο οποίος διαθέτει τη μεταλλαγή V600D στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου *BRAF*. Προέρχεται από μεταστατικό όγκο κακοήθους μελανώματος γυναίκας ασθενούς, ηλικίας 58 ετών. [203]

### 3.1.2 Διατήρηση και Ανακαλλιέργεια

Οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιούνται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες όσον αφορά την ανάπτυξη και τη διατήρηση των κυττάρων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα εντός ειδικού επωαστικού κλιβάνου με τη θερμοκρασία να βρίσκεται σταθερά στους 37 °C. Επίσης, η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) είναι 5% και η σχετική υγρασία 95%. Το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom AG, Γερμανία) αποτέλεσε το θρεπτικό υλικό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις διαδικασίες της διατήρησης, καθώς και της ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών.

Η σύσταση του πλήρους θρεπτικού υλικού τύπου DMEM (1X) με τελικό όγκο τα 500 ml ήταν η εξής:

ο Διάλυμα DMEM (10X)	50 ml
ο Διάλυμα ορού εμβρύου βοός (Fetal bovine serum-FBS)	50 ml
ο Διάλυμα άλατος όξινου διττανθρακικού νατρίου	28,65 ml
ο Διάλυμα L-Γλουταμίνης	10 ml
ο Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης	5 ml
ο Διάλυμα μη βασικών αμινοξέων	5 ml
ο Διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου	5 ml
ο Αποστειρωμένο και απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	~350 ml

Το νερό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του υλικού καλλιέργειας των κυτταρικών σειρών, ήταν συγκεκριμένης ωσμομοριακότητας (18,2 MΩ.cm) και είχε αποστειρωθεί (υγρή αποστείρωση) σε θερμοκρασία 121°C για 40 min. Το διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS) δύναται να απενεργοποιηθεί αρχικά με επώαση σε θερμοκρασία 55 °C για 45 min, ενώ ενεργοποιείται πριν από τη χρήση του με επώαση στους 37 °C. Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, εντός θαλάμου νηματικής ροής. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί από τους Hayflick και Moorhead. [204]

Όσον αφορά τις κυτταρικές καλλιέργειες, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας (Cellstar, Greiner Bio-one, H.Π.Α.) σε στείρες συνθήκες μέσα σε θάλαμο επώασης. Όταν οι κυτταρικές σειρές WM266-4 και HT1080 σε καλλιέργεια κάλυπταν περίπου το 80% του εμβαδού της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιούνταν η ανακαλλιέργειά τους. Αυτή στους εν προκειμένω κυτταρικούς τύπους γινόταν κάθε 2-3 ημέρες, με τη βοήθεια διαλύματος θρυψίνης (L-2143, Trypsin/EDTA, Biochrom AG, Γερμανία), το οποίο καταστρέφει προσωρινά τα μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων που συνδέουν τα κύτταρα με το στέρεο υπόστρωμα της φλάσκας. Κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται σε αυτά να αιωρηθούν στο ήδη υπάρχον διάλυμα και να μοιραστούν σε δύο ή και περισσότερες νέες φλάσκες (για την πλήρη ενεργότητα του ενζύμου, συνιστάται επώαση για λίγα λεπτά στους 37 °C).



### 3.1.3 Κατάψυξη και Απόψυξη Κυττάρων

Για την αποθήκευση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πλαστικά φιαλίδια (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Δανία) και εν συνεχεία υπήρξε μεταφορά αυτών σε δοχεία τα οποία περιείχαν υγρό άζωτο.

Αναλυτικά, η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την διατήρηση των κυττάρων μέσω της κατάψυξής τους ήταν η ακόλουθη:

- 1) Λαμβάνει χώρα η αφαίρεση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, η οποία βρίσκεται στην απαιτούμενη πυκνότητα κυττάρων (~80%).
- 2) Έπειτα, προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης (L-2143, Trypsin/EDTA, Biochrom AG, Γερμανία) και μετά ακολουθεί επώαση για λίγα λεπτά σε κλίβανο, στους 37 °C.
- 3) Απενεργοποιείται η θρυψίνη με την προσθήκη ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM (1X) και ύστερα το διάλυμα με τα κύτταρα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15 ml).
- 4) Μετά ακολουθεί η φυγοκέντρωση των κυττάρων σε 1000 rpm (στροφές/λεπτό), σε θερμοκρασία 4 °C για πέντε λεπτά (σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, Z323K, Hermle Labortechnik, Γερμανία).
- 5) Τέλος, αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό και πραγματοποιείται επαναιώρηση των κυττάρων σε όγκο (1 ml) θρεπτικού μέσου κατάψυξης (freeze medium).

Η χημική σύσταση του θρεπτικού υλικού κατάψυξης (σε τελικό όγκο 5 ml) είναι η παρακάτω:

Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (1X)	3,5 ml
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0,5 ml
Διάλυμα ορού εμβρύου βοός	1,0 ml

Μετά την επαναιώρηση των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο κατάψυξης, αυτά μεταφέρθηκαν σε ένα ειδικό πλαστικό φιαλίδιο στο οποίο ψύχθηκαν, με ρυθμό ελάττωσης της θερμοκρασίας  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ανά λεπτό, έως τη θερμοκρασία των  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ο συγκεκριμένος ρυθμός ψύξης επιτεύχθηκε με τη βοήθεια ενός ειδικού δοχείου πολυπροπυλενίου, το οποίο περιείχε ισοπροπανόλη (100%, #33539, Sigma-Aldrich, Γερμανία). Τα κύτταρα παρέμειναν εντός του συγκεκριμένου δοχείου για τουλάχιστον 24 ώρες, μέσα στην κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Κατόπιν ακολούθησε μεταφορά τους σε δοχεία υγρού αζώτου ( $-140$  έως  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) για μακροχρόνια φύλαξη.

Η διαδικασία της απόψυξης πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Το ειδικό φιαλίδιο κατάψυξης μεταφέρθηκε γρήγορα από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο, το οποίο βρισκόταν σε θερμοκρασία  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , στο οποίο έλαβε χώρα ολιγόλεπτη επώαση.
- Μόλις ολοκληρώθηκε η απόψυξη και το περιεχόμενο του φιαλιδίου είχε έρθει σε υγρή κατάσταση, έγινε μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα τύπου falcon (15 ml) και σε αυτόν προστέθηκε ποσότητα 4 ml φρέσκου υλικού DMEM (1X).
- Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, σε 1000 rpm για πέντε λεπτά, έπειτα το υπερκείμενο υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 5 ml φρέσκου υλικού DMEM (1X) και μεταφέρθηκαν σε φλάσκα καλλιέργειας.
- Τελικά, έγινε μεταφορά των κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο και διατήρησή τους σε συνθήκες,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$ .

Διαφορετικά, είναι εφικτό να γίνει μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε φλάσκα καλλιέργειας, μόλις φτάσει σε υγρή κατάσταση, και προσθήκη 4 ml φρέσκου υλικού DMEM (1X). Ακολούθως, δύναται να γίνει μεταφορά των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο και διατήρησή τους σε συνθήκες  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$ . Μετά το πέρας 24 h αφαιρείται το υλικό καλλιέργειας και προστίθενται 5 ml φρέσκου υλικού DMEM (1X).

### 3.1.4 Χημικοί Παράγοντες

- ¾ Product Number R 8875
- ¾ Store at Room Temperature
- ¾ Product Description
- ¾ Molecular Formula:  $C_{23}H_{22}O_6$
- ¾ Molecular Weight: 394.4
- ¾ CAS Number: 83-79-4
- ¾ Melting Point: 165-166 °C<sup>1</sup>
- ¾ Extinction Coefficient:  $E^{mM} = 19.2$  (294 nm, ethanol)<sup>2</sup>
- ¾ Specific Rotation: -120° (1.38 g/100 ml chloroform at 25 °C)

### 3.1.5 Μελέτη RNA

#### 3.1.5.1 Απομόνωση του RNA

Για τη μελέτη του μεταγραφικού προφίλ των κυττάρων κατά την εισαγωγή των χημικών ουσιών έγινε η απομόνωση του RNA. Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου απομόνωσης TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Thermo Fischer Scientific) και των προδιαγραφών του κατασκευαστή. Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρειάστηκαν ειδικά tips και tubes, τα οποία ήταν απαλλαγμένα RNασών. Οι RNάσες αποτελούν ένζυμα, τα οποία μπορούν να καταστρέψουν το RNA και βρίσκονται παντού στο περιβάλλον. Συμπληρωματικά, όλες οι εργασίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής με τη χρήση προστατευτικών γαντιών.

Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA:

- 1) Προσθήκη 800μl TRIzol™ Reagent, κάλυψη όλης της επιφάνειας του τρυβλίου και επαναϊώρηση με πιπέτα.
- 2) Μεταφορά σε RNase – free 1.5ml tube.
- 3) Προσθήκη 160μl χλωροφορμίου.
- 4) Vortex / 15s
- 5) Επώαση 2 – 15 min / RT
- 6) Φυγοκέντρηση 12,000g / 15min / 4 °C
- 7) Μεταφορά υδατικής φάσης (πάνω – περιέχει το RNA) σε νέο tube.
- 8) Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης.
- 9) Επώαση 5 – 10 min / RT
- 10) Φυγοκέντρηση 12,000g / 8min / 4 – 25 °C
- 11) Απόρριψη υπερκειμένου
- 12) Προσθήκη 1ml 75% αιθανόλης.
- 13) Φυγοκέντρηση 7,500g / 5min / 4 – 25 °C
- 14) Απόρριψη υπερκειμένου
- 15) Στέγνωμα ιζήματος στον αέρα για 5 – 10min
- 16) Προσθήκη 50 – 200μl RNase-free H<sub>2</sub>O
- 17) Επώαση 55 – 60 °C για 10min

### **3.1.6 Ποσοτικοποίηση και Έλεγχος Ποιότητας RNA**

Όταν περατωθεί η απομόνωση του RNA καθίσταται σημαντικό να ποσοτικοποιηθεί και να ελεγχθεί για να διαπιστωθεί αν δεν έχει αποικοδομηθεί και είναι ακέραιο. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA περιλαμβάνει, φωτομέτρηση του RNA σε ειδικό φασματοφωτόμετρο (NanoDrop 2000, Thermo Fischer Scientific, Germany) UV-Vis πλήρους φάσματος για μέτρηση δειγμάτων μικρού όγκου. Αυτό χρησιμοποιείται για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση και η αξιολόγηση της καθαρότητας DNA, RNA, ολιγονουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών. Με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, στην ειδική ακίδα της δειγματοληψίας τοποθετήθηκε αρχικά 1μl H<sub>2</sub>O σαν τυφλό και ακολούθως τοποθετήθηκε 1μl του δείγματος που μελετάται. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων υλοποιήθηκε στα 260nm και 280nm και η καθαρότητα τους υπολογίστηκε με τη

βοήθεια του λόγου των δύο φωτομετρήσεων (OD 260nm/OD 280nm), ο οποίος πρέπει πάντα να είναι  $\approx 2$ .

Τα υπό μελέτη δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gels αγαρόζης σε συγκέντρωση 1% σε διάλυμα TAE (1X) για να γίνει η αξιολόγηση της ποιότητας του RNA.

#### Κατασκευή gel

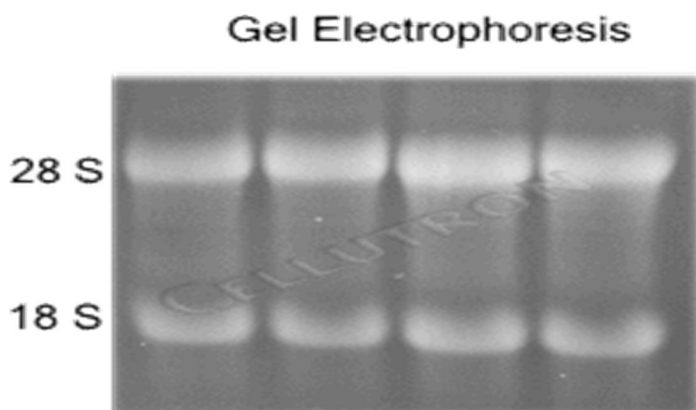
Προσθήκη σε κωνική φιάλη:

- 1) 80ml TAE 1X 2
- 2) 0.8g αγαρόζης
- 3) Βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων
- 4) Αφήνω να γίνει χλιαρό
- 5) Προσθήκη 6μL EtBr
- 6) Αδειάζω στη συσκευή
- 7) Αφήνω να πήξει

Προετοιμασία Δειγμάτων:

- 1) Σε κενό tube προσθέτω 2μl δείγματος RNA συγκέντρωσης 200ng/μl
- 2) 2μl loading dye (2X)
- 3) Φόρτωση στο πηγαδάκι
- 4) Ανοίγω τη συσκευή και αφήνω να τρέξουν για 15min / 100V

Για να προκύψει μία επιτυχημένη απομόνωση ολικού RNA στα θηλαστικά, θα πρέπει να διακρίνονται δύο έντονες ζώνες στο gel αγαρόζης, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις 28S και 18S ριβοσωμικές υπομονάδες, με αναλογία έντασης η οποία κυμαίνεται 1,5 – 2,5 : 1. Πιο χαμηλά και με μικρότερη ένταση διακρίνεται μία ζώνη, η οποία αφορά τις άθικτες πολύ-A ουρές του mRNA των θηλαστικών. Εάν έχει προκύψει αποικοδόμηση του RNA, τότε οι ζώνες αυτές δεν θα είναι ευδιάκριτες, ενώ θα φαίνεται μια ενιαία φωτιζόμενη περιοχή ονομαζόμενη smear.



**Εικόνα 13:** Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτή αγαρόζης, στο οποίο δεν παρατηρείται αποικοδόμηση του μορίου. [205]

### **3.1.7 Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription - RT)**

Εν συνεχεία, τα μόρια RNA μετατράπηκαν σε cDNA για να μελετηθούν εκτενέστερα. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιήθηκε το MMLV (MoLONey Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) ως ένζυμο για την αντίστροφη μεταγραφή. Αυτό αποτελεί μία ανασυνδυασμένη και εξαρτώμενη από RNA ή DNA πολυμεράση, η οποία από ένα μονόκλωνο μόριο RNA δύναται να συνθέσει μία συμπληρωματική αλυσίδα DNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο, σχηματίζεται ένα υβρίδιο DNA:RNA.

Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν tubes τα οποία περιείχαν 1000ng RNA και σε αυτά προστέθηκαν 200 U/μl (Invitrogen), ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας παρασκευής του ενζύμου M-MLV Reverse Transcriptase.

Επιπλέον, στο νέο περιεχόμενο των tubes ακολουθήθηκαν τα εξής:

- Προσθήκη Oligo(dT) 1μl
- Προσθήκη dNTP Mix 1μl
- Spin down
- Επώαση 65 °C / 5min
- Τοποθέτηση στον πάγο

Προετοιμασία για το reaction mix:

- 5X First Strand Buffer 4μl
- 0.1M DTT 2μl
- RNase OUT 0.5μl
- MMLV RT 1μl \* αριθμό των δειγμάτων + 1

Ø Προσθήκη 7,5μl του reaction mix σε κάθε tube

Ø Ανάδευση με το tip

Ø Spin down

Ø Επώαση στους 37 °C / 50min

Ø Επώαση στους 70 °C / 15min

### 3.1.8 Ποσοτική PCR (Quantitative PCR – qPCR)

Ύστερα από τη μετατροπή του RNA σε cDNA, κρίθηκε απαραίτητη η παρατήρηση των μεταβολών διαφόρων γονιδίων σε επίπεδο μεταγραφής. Για αυτόν ακριβώς το λόγο έγινε μία PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή ποσοτική PCR. Στην ουσία στηρίζεται στην λογική της συμβατικής PCR, αλλά σε αυτήν επιτρέπεται ο ταχύτατος και επιλεκτικός πολλαπλασιασμός αλληλουχιών του γονιδιώματος ενός οργανισμού σε αρκετά εκατομμύρια ή δισεκατομμύρια αντίγραφα.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην επανάληψη των κάτωθι τριών βημάτων, τα οποία αποτελούν έναν κύκλο αντιδράσεων:

- **Αποδιάταξη:** Το πρώτο στάδιο, στο οποίο αποδιατάσσεται το δίκλωνο μόριο DNA της αλληλουχίας στόχου. Η θερμοκρασία βρίσκεται στους 95 °C.
- **Ανόπτηση:** Στον κάθε κλώνο DNA προσδένονται οι εκκινητές της αντιγραφής, δηλαδή ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες οι οποίες προσδένονται στις συμπληρωματικά στα εκάστοτε τμήματα DNA. Τα τελευταία τοποθετούνται σε κάθε κλώνο του DNA. Η ανόπτηση δύναται να πραγματοποιηθεί σε ένα θερμοκρασιακό εύρος, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 48 °C – 68 °C. Η τιμή της θερμοκρασίας εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών.

- **Αντιγραφή ή επιμήκυνση:** Και οι δύο αλυσίδες του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο και αντιγράφονται για να σχηματιστούν νέα δίκλιωνα μόρια με την αρωγή της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq) καθώς και των DNA νουκλεοτιδίων (dNTPs), τα οποία εισάγονται στο μίγμα της αντίδρασης. Το στάδιο της επιμήκυνσης υλοποιείται στους 68 °C, όπως επίσης και στους 72 °C. Στο εργαστήριο μας χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή του ενζύμου της Taq πολυμεράσης, στο οποίο η επιμήκυνση πραγματοποιείται στους 60 °C.

Επιπλέον, η διαδικασία της PCR δε μπορεί να ολοκληρωθεί δίχως τη βοήθεια μίας φθορίζουσας χρωστικής, η οποία συνδέεται στο δίκλινο μόριο DNA. Μόλις αυτή ολοκληρώσει τη σύνδεση της και δεχθεί ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, εκπέμπει σήμα φθορισμού. Στις πειραματικές διαδικασίες της εν λόγω εργασίας χρησιμοποιήθηκε η SYBR Green ως χρωστική, η οποία δεσμεύεται σε δίκλινο DNA με μη ειδικό τρόπο. Κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της PCR. Καθώς προωθείται η ενίσχυση, αυξάνεται ο αριθμός των DNA προϊόντων (αύξηση της ποσότητας) και αναπόφευκτα επάγεται και η ποσότητα των μορίων της SYBR Green χρωστικής, επειδή αυτά ενσωματώνονται στο DNA. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η αύξηση του σήματος του φθορισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος το οποίο συσσωρεύεται, η χρωστική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σχετική ποσοτικοποίηση των μορίων DNA. Το αποτέλεσμα μίας qPCR φανερώνει τον αριθμό των κύκλων, οι οποίοι χρειάζονται με σκοπό να φτάσει κάθε προϊόν της αντίδρασης σε ένα επίπεδο κατωφλίου, γνωστό ως Ct. Αυτό παρατηρείται στην αρχή της εκθετικής φάσης της μεθόδου PCR. Τέλος, στην αντίδραση qPCR η επαγωγή του φθορισμού της SYBR Green ακολουθεί γραμμικότητα, επειδή η παρεμβολή της χρωστικής είναι ανάλογη με του παραγόμενου προϊόντος.



Στην εν λόγω εργασία έγινε χρήση του εμπορικού kit KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (KAPABIOSYSTEMS). Αυτό συνιστά ένα κοκτέιλ, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης PCR εκτός των εκκινητές και του DNA.

Προετοιμασία για Master Mix:

- SYBR Green Mix 7.5μl
- Forward Primer (10pmole/μl) 1.0μl
- Reverse Primer (10pmole/μl) 1.0μl
- H<sub>2</sub>O 4.5μl \* αριθμός των δειγμάτων + 1

Προσθήκη σε PCR tubes:

- Master Mix 14μl
- Complementary DNA 1.0μl
- Ανάλυση σε Strategene MxPro 3000

Θερμικό Προφίλ:

	<b>Βήμα</b>	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	<b>Αριθμός κύκλων</b>
<b>Βήμα 1</b>	Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	3min	1
<b>Βήμα 2</b>	Αποδιάταξη	95 °C	10sec	
	Προσαρμογή εκκινητών στο DNA εκμαγείο και επιμήκυνση	60 °C	30sec	40
<b>Βήμα 3</b>	Καμπύλη Τήξης	95 °C	1min	1
		55°C	30sec	
		95 °C	30sec	

### 3.1.9 Στατιστική Ανάλυση

Τα προκύπτοντα αποτελέσματα ελήφθησαν από το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων . Επίσης, αυτά παρουσιάστηκαν με σύγκριση των κύκλων κατωφλίου των δειγμάτων, στα οποία προέκυψε αύξηση του ISR, MTUPR, HSR και ASR με το χημικό παράγοντα ροτενόνη σε σύγκριση με τους κύκλους των δειγμάτων που δεν εμφάνισαν επαγωγή στα τέσσερα μονοπάτια ανταπόκρισης σε μιτοχονδριακό στρες. Για την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $2\text{-}\Delta\Delta^{\text{CT}}$ . [206]

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικώς με τη χρήση του λογισμικού Microsoft Excel. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα εξετάστηκαν ως προς τη σημαντικότητα τους με τη βοήθεια της δοκιμασίας T-Test. Η στατιστική σημαντικότητα των διαγραμμάτων αποτυπώνεται ως: \*  $p = 0.01 - 0.05$ , \*\* $p = 0.001 - 0.01$ , \*\*\* $p < 0.05$ .

### 3.1.10 Ανάλυση MTT

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία χρωματομετρική ανάλυση με σκοπό να αξιολογηθεί η μεταβολική δραστηριότητα των κυτταρικών μιτοχονδρίων. [207] Επίσης χρησιμοποιείται για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας, καθώς επίσης και της κυτταροστατικής δραστηριότητας, δηλαδή της μεταβολής από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην ηρεμία, ύστερα από την έκθεση των κυττάρων σε φαρμακευτικούς παράγοντες ή τοξικές ουσίες. Όμως, πρέπει να καταστεί σαφές πως ο εκάστοτε χημικός παράγοντας, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία αυτή, δύναται να ασκήσει τη δράση του ενεργοποιώντας τα αντίστοιχα μονοπάτια και μηχανισμούς ακόμη και σε περίπτωση κατά την οποία δεν επέρχεται θάνατος των κυττάρων ύστερα από επώαση τους στο χημικό αυτό. Πιο συγκεκριμένα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τα βιώσιμα κύτταρα δύνανται να φανούν από NADPH εξαρτώμενα ένζυμα οξειδοαναγωγής. Αυτά τα εν λόγω ένζυμα μπορούν να περιορίσουν τη χρωστική τετραζολίου MTT (βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο), έως την αδιάλυτη φορμαζάνη της. Η τελευταία εμφανίζει πορφυρό χρώμα. Η ανάλυση MTT λαμβάνει χώρα υπό σκοτεινές συνθήκες, επειδή το αντιδραστήριό της είναι φωτοευαίσθητο. Συνοπτικά, η διαδικασία αυτή, αφορά μία ουσία, η οποία μεταβολίζεται στα μιτοχόνδρια και μετράει το κυτταρικό μεταβολισμό. Δεδομένου ότι τα κύτταρα, τα οποία έχουν χαμηλό μεταβολισμό οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μέτρηση θανάτου στα κύτταρα.

Στη δική μας περίπτωση, οι δύο καρκινικές σειρές HT1080 και WM266-4, στρώθηκαν σε πηγαδάκια που το καθένα είχε πυκνότητα  $7 \times 10^3$  σε πλάκες 96 φρεατίων και υπεβλήθησαν σε επεξεργασία με 0,001 μM, 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM και 20 μM με τον χημικό παράγοντα ροτενόνη για 24 ώρες. Οι δύο τύποι κυττάρων επώαστηκαν σε διάλυμα βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζολίου (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Τέλος, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 550 nm, χρησιμοποιώντας τα 630 nm ως μέτρηση αναφοράς, από τον αναγνώστη πλακών Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). [208]

Η διαδικασία για τη διαδικασία MTT, είναι η ακόλουθη:

- $0,4 \times 10^6$  κύτταρα σε τελικό όγκο θρεπτικού 500 μL, μεταφέρονται σε αποστειρωμένες πλάκες 48 βοθρίων (well-plates).
- Αναμονή για 24 h.
- Προσθήκη θρεπτικού 0,5 ml που περιέχει τις συγκεντρώσεις της ροτενόνης. (Για τα control, χρησιμοποιήθηκαν βοθρία χωρίς ροτενόνη)
- Αναμονή για 24 h.
- Αφαίρεση του ήδη υπάρχοντος διαλύματος
- Σε κάθε δείγμα γίνεται προσθήκη 200 μL διαλύματος MTT, για 4 h στους 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>
- Αφαίρεση του διαλύματος MTT
- Προσθήκη 300 μL διαλύματος ισοπροπανόλης (100%, #33539 Sigma Aldrich, Γερμανία) σε κάθε ένα βοθρίο.
- Ανακίνηση πλακών RT για πλήρη ομογενοποίηση κρυστάλλων
- Μεταφορά ίσων όγκων, δηλαδή 100 μL σε ανάλογη πλάκα 96 βοθρίων
- Μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε ειδικό φωτόμετρο τύπου ELISA (Dynatech MP500, Dynatech Laboratories, Η.Π.Α.).
- Μετράμε την οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda = 550$  nm (η οπτική απορρόφηση αναφοράς στα 630 nm)

Χημική σύνθεση του MTT:

- Θρεπτικό μέσο MEM w/o phenol red 50 ml
- Διάλυμα L γλουταμίνης 0,5 ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1M, Ph = 7,2 0,5 ml
- Διάλυμα μη βασικών αμινοξέων 0,5 ml
- Διάλυμα όξινου διττανθρακικού νατρίου 0,2 ml
- Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου 0,5 ml

Για να παρασκευαστούν 2 ml διαλύματος MTT, 1 mg σκόνης MTT (#M5655 Sigma Aldrich, Γερμανία) διαλύεται. Έπειτα, συμβαίνει έντονη ανάδυσση του εν λόγω διαλύματος και μετά διήθηση μέσω ηθμού (διάμετρος πόρων 0,22 μm). Στη συνέχεια το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτάδι στους 4 °C.

## 3.2 Εργαστήριο και Εξοπλισμός

### 3.2.1 Συσκευές

- Αναδευτήρας (K-550-GE Vortex Genie, Scientific Industries Inc., Η.Π.Α.).
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος (5410 Eppendorf centrifuge, Η.Π.Α.).
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος (Z-323-K HERMLE centrifuge, Γερμανία).
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (7780 Compact high speed refrigerated centrifuge, Kubota, Ιαπωνία).
- Επωαστικός θάλαμος ευκαρυωτικών κυττάρων με παροχή CO<sub>2</sub> (5425-1 NAPCO automatic CO<sub>2</sub> incubator, NAPCO, Η.Π.Α.).
- Εστία κάθετη νηματικής ροής (Bioquell, Microflow advanced biosafety cabinet, class II, Η.Π.Α.).
- Εστία κάθετης νηματικής ροής (Laminar Cabinet, Flow Laboratories, Η.Π.Α.).
- Ηλεκτρονικός ζυγός (P-1200, Mettler, Η.Π.Α.).
- Ηλεκτρονικός μικροζυγός (TE64 Sartorius, Sartorius Mechatronics AG, Γερμανία).
- Θερμαινόμενη πλάκα (D1200 Heatblock Accublock, Labnet International Inc., Η.Π.Α.).
- Καταψύκτης -30°C (Revco Industries, Η.Π.Α.).
- Καταψύκτης -80°C (HERA Freeze, Thermo electron corporation, Η.Π.Α.).
- Μαγνητικοί αναδευτήρες (Gallenkamp magnetic stirrer-hotplate, Ηνωμένο Βασίλειο).

- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Biometra T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Γερμανία).
- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Mx 3005P, Strategene, Καλιφόρνια).
- Τροφοδοτικό ρεύματος (E143, Consort power supply, Βέλγιο).
- Υδατόλουτρο (3015WB, General purpose water bath, Η.Π.Α.).
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Fischer Scientific, Γερμανία).
- Φούρνος μικροκυμάτων (ER748, Toshiba microwave, Toshiba, Η.Π.Α.).
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Carl Zeiss Axiovert 25, Η.Π.Α.)
- Φιάλες υγρού αζώτου (Cryo-diffusion B2036, Γαλλία).

### **3.2.2 Γυάλινα και Πλαστικά Είδη**

- Σωλήνες προπυλενίου τύπου falcon 15 και 50 ml (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Πλαστικά φιαλίδια για φύλαξη στο υγρό άζωτο (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Δανία).
- Πλαστικοί σωλήνες τύπου Eppendorf 0.5 και 1.5 ml (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Πιπέτες Pasteur, ογκομετρικοί κύλινδροι, ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως (ISOLAB Laborgerate GmbH, Γερμανία).
- Γυάλινες πιπέτες 2, 5 και 10 ml (Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Γερμανία).
- Ρύγχη πιπετών 200 και 1000  $\mu$ l (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένες φλάσκες καλλιέργειας 25  $\text{cm}^2$  (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένα τρυβλία καλλιέργειας (διαμέτρου 60mm) (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Γυάλινα μπουκάλια 100, 250 και 500 ml (Pyrex ScilLabware, Γερμανία).

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

## 4.1 Αποτελέσματα

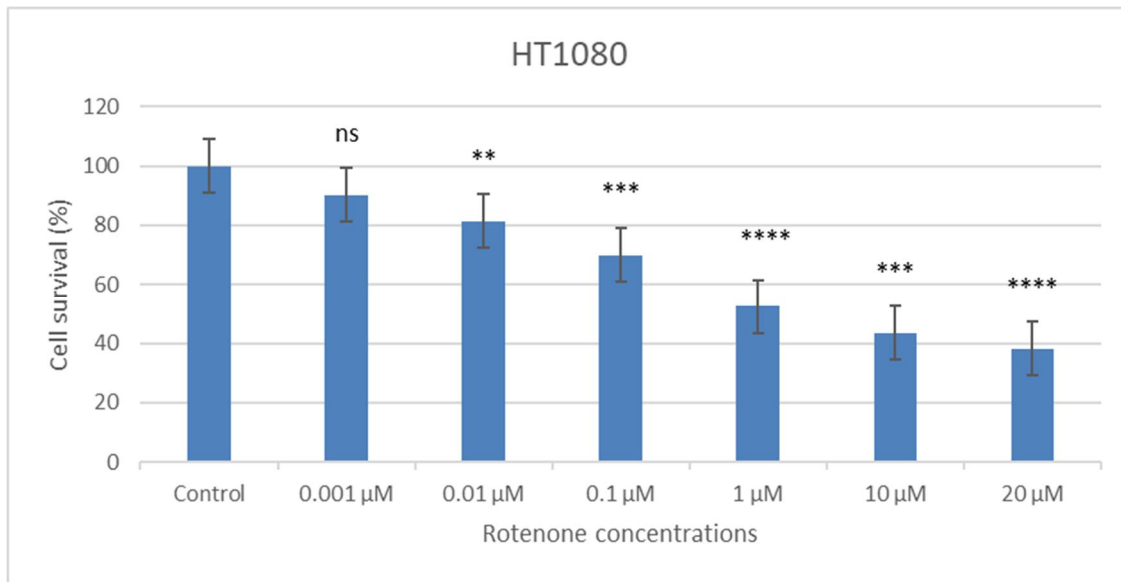
Η εν λόγω διπλωματική εργασία ασχολήθηκε με τη μελέτη της επαγωγής μηχανισμών απόκρισης σε κυτταρικό στρες και την ανάλυση της συνομιλίας των σχετικών μονοπατιών. Τα αποτελέσματα αφορούν τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HT1080 και WM-266 – 4, ύστερα από επώασή τους με ροτενόνη, έναν χημικό αναστολέα του συμπλέγματος I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

## 4.2 Δοκιμασία MTT

Χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία MTT για τη μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων των δύο καρκινικών σειρών, κατόπιν έκθεσης τους στον χημικό παράγοντα ροτενόνη. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας αυτής είναι να διαπιστωθεί αν και ποιές συγκεντρώσεις του χημικού μπορούν να επηρεάσουν τη μεταβολική ενεργότητα των μιτοχονδρίων. Τα HT1080, όπως και τα WM-266 – 4, επώαστηκαν παρουσία ροτενόνης (Rotenone) σε πηγάδια αυξανόμενης συγκέντρωσης, για διάστημα 24 ωρών. Οι συγκεντρώσεις του χημικού παράγοντα που ελέγχθηκαν ήταν οι ακόλουθες: 0,001μM, 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM και 20 μM. Η σύγκριση έγινε με κύτταρα, στα οποία δεν είχε προστεθεί ο χημικός παράγοντας αυτός.

### 4.2.1 MTT για τα HT1080

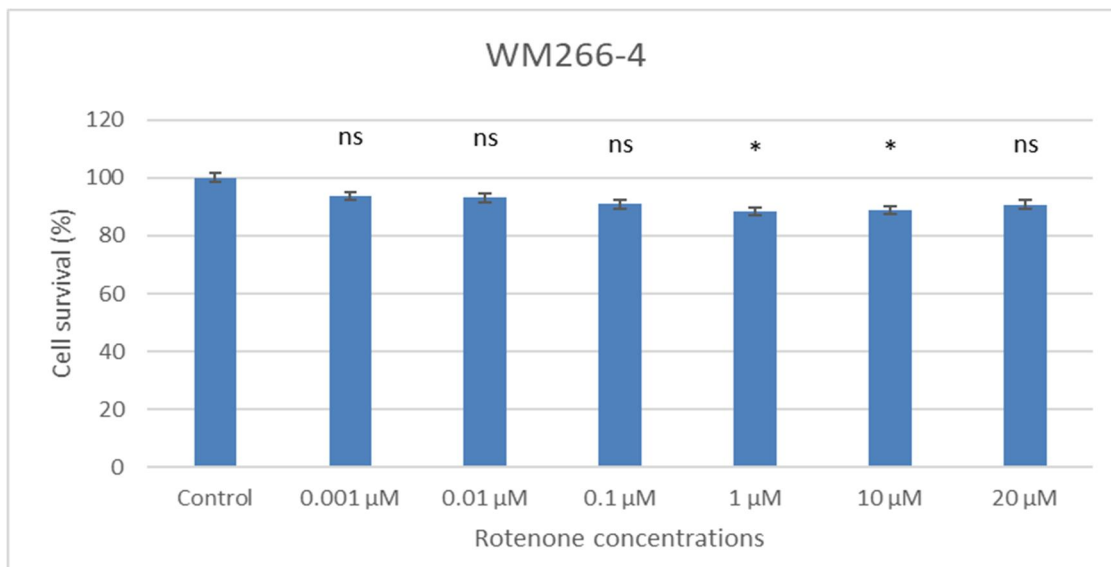
Αναφορικά με τη σειρά καρκινικών κυττάρων του ανθρώπινου ινοσαρκώματος (HT1080), βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM και 20 μM είναι ικανές για να επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο και τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται στο χημικό και όχι σε τυχαίους παράγοντες.



**Διάγραμμα 1:** Παρουσιάζονται τα ποσοστά μεταβολικά ενεργών καρκινικών κυττάρων υπό αυξανόμενη συγκέντρωση ροτενόνης, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν επώαστηκαν με αυτή την ουσία.

#### 4.2.2 MTT για τα WM266-4

Σχετικά με τα κύτταρα μεταστατικού μελανώματος (WM266-4) παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM είναι στατιστικώς σημαντικές.



**Διάγραμμα 2:** Φαίνεται το ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης σε αυξανόμενη συγκέντρωση του παράγοντα, συγκριτικά με κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε η ροτενόνη.



## 4.3 Μελέτη έκφρασης μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες ροτενόνης με τη χρήση qPCR

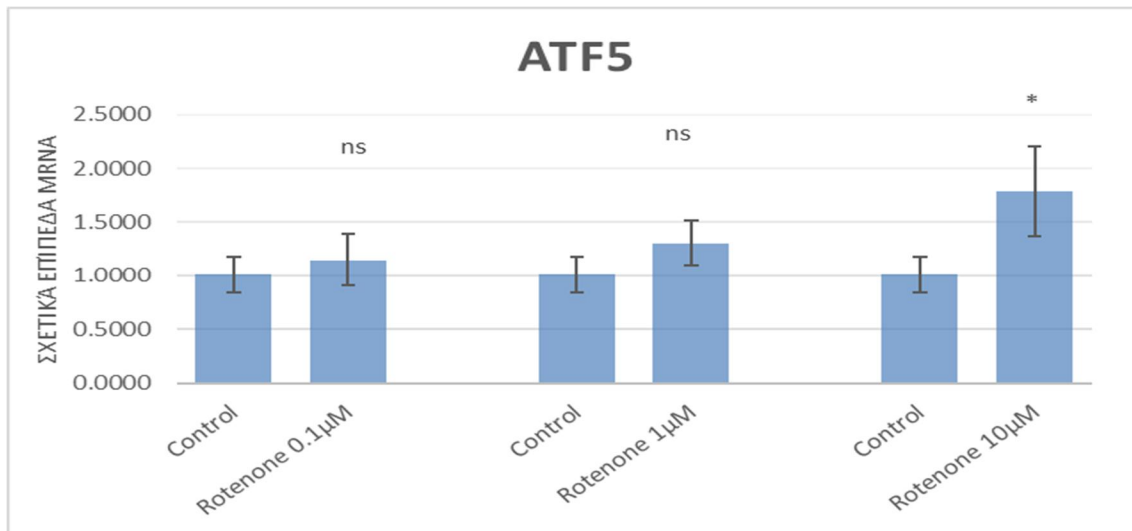
Για να διαπιστωθεί ενδεχόμενη επίδραση της ροτενόνης στην ενεργοποίηση μηχανισμών ανταπόκρισης σε κυτταρικό στρες, μελετήθηκαν γονίδια των εξής μονοπατιών: 1) μιτοχονδριακό μονοπάτι ανταπόκρισης σε μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών (MTUPR): γονίδια *ATF5*, *MTHSP70* και *LONP-1*, 2) μονοπάτι ολοκληρωμένης ανταπόκρισης σε στρες (ISR): γονίδια *ATF4* και *CHOP*, 3) κυτταροπλασματικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες θερμικού σοκ (HSR): γονίδια *CYTHSP70* και *CRYAB*, και 4) αντιοξειδωτικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες (ASR): γονίδια *NFE2L2* και *HO-1*. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν μετρήσεις των επιπέδων mRNA των αναφερόμενων γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στις παραπάνω ανταποκρίσεις, σε κυτταροκαλλιέργειες *in vitro*, με τη μέθοδο της qPCR.

### 4.3.1 Μελέτη έκφρασης μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες ροτενόνης σε κύτταρα ινοσαρκώματος HT1080 με τη χρήση qPCR

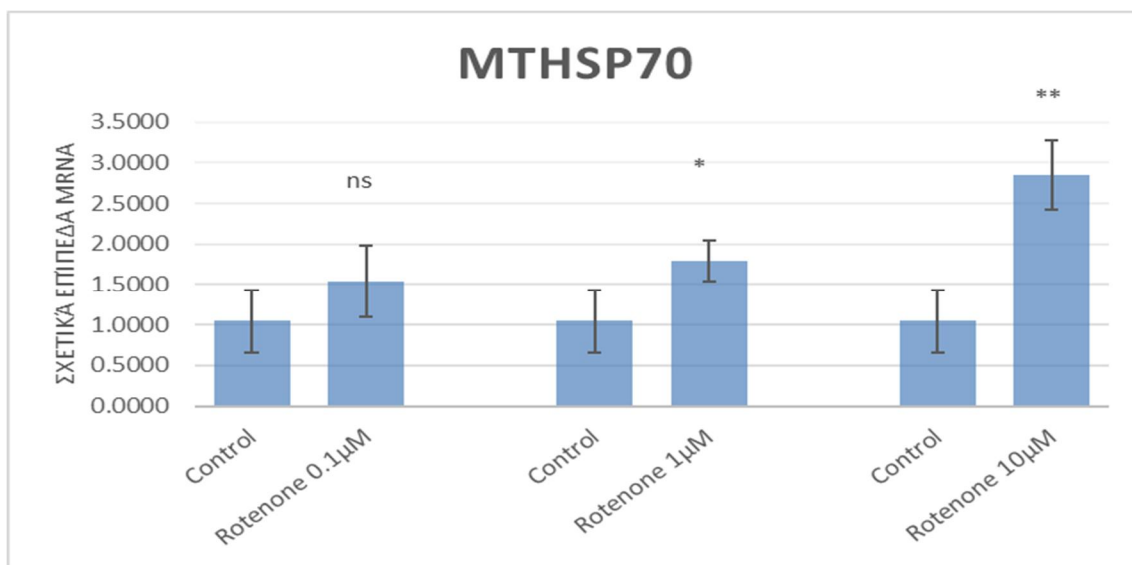
Εδώ, η καρκινική σειρά HT1080 επώαστηκε με ροτενόνη (Rotenone) σε συγκεντρώσεις 0,1 μM, 1 μM και 10 μM, για 24 ώρες. Η έκθεση των κυττάρων αυτών παρουσία ροτενόνης, η οποία προκαλεί αναστολή του συμπλόκου I της στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική επαγωγή της μεταγραφής όλων των γονιδίων των τεσσάρων μηχανισμών ανταπόκρισης κυτταρικού στρες με εξαίρεση το γονίδιο της *LONP-1*.

#### 4.3.1.1 qPCR και μιτοχονδριακό μονοπάτι ανταπόκρισης σε μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών (MTUPR)

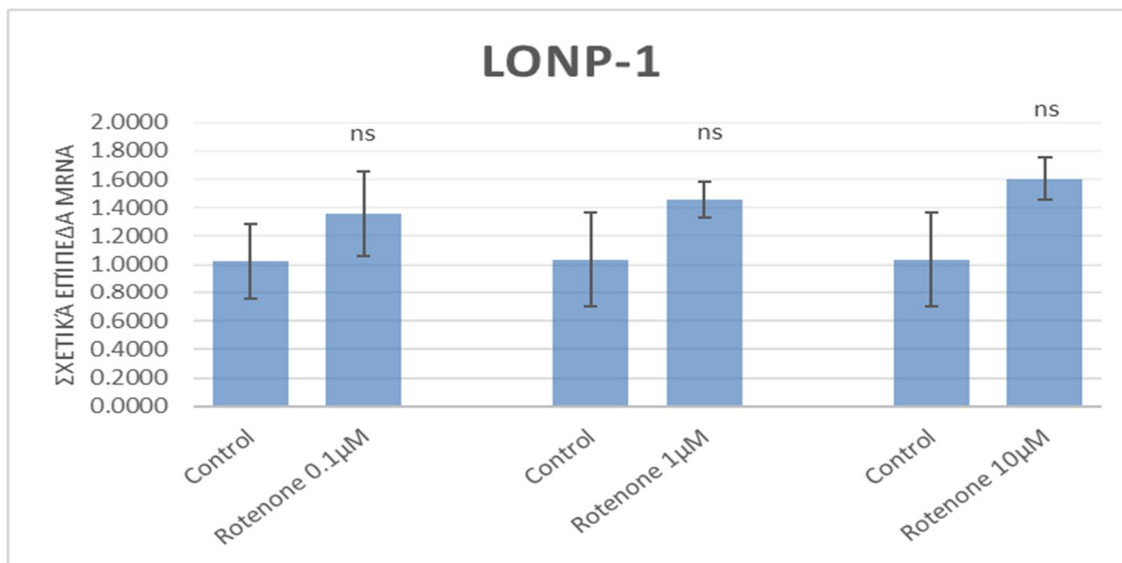
Αναφορικά με τη μιτοχονδριακή απόκριση μη διπλωμένης πρωτεΐνης προέκυψαν: μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου *ATF5* σε συγκέντρωση ροτενόνης 10 μM και σαφής στατιστικά σημαντική αύξηση της *MTHSP70* στις συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM. Αντιθέτως, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική μεταγραφή του γονιδίου της *LONP-1*, ωστόσο υπάρχει κυτταροτοξικότητα. Η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA έγινε με τη βοήθεια του γονιδίου της ακτίνης B (*ACTB*), το οποίο αποτελεί γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene).



**Διάγραμμα 3:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *ATF5* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.



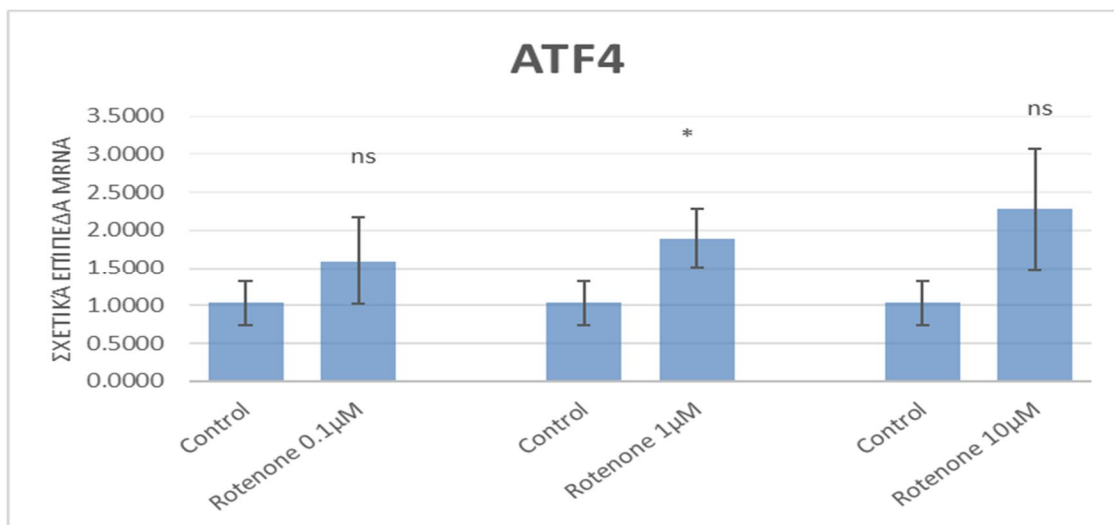
**Διάγραμμα 4:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *MTHSP70* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.



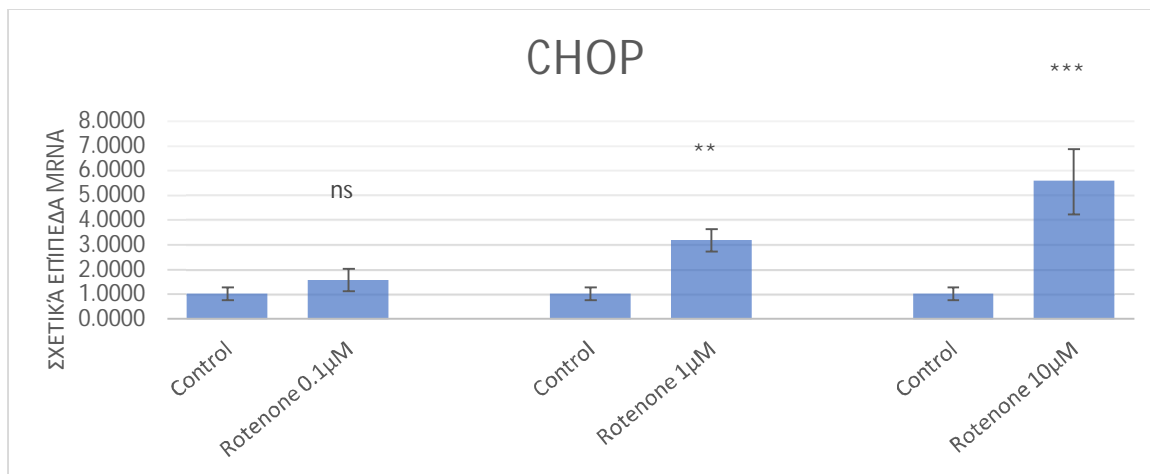
**Διάγραμμα 5:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *LONP-1* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.

#### 4.3.1.2 qPCR και μονοπάτι ολοκληρωμένης ανταπόκρισης σε στρες (ISR)

Σχετικά με την ολοκληρωμένη απόκριση στο στρες βρέθηκαν: αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου *ATF4* σε συγκέντρωση 1 µM του χημικού παράγοντα. Επίσης, επαγωγή παρατηρήθηκε και στην ποσότητα των mRNA του γονιδίου *CHOP* σε συγκεντρώσεις 1 µM και 10 µM. Η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA έγινε και εδώ με τη βοήθεια του γονιδίου της ακτίνης B (*ACTB*).



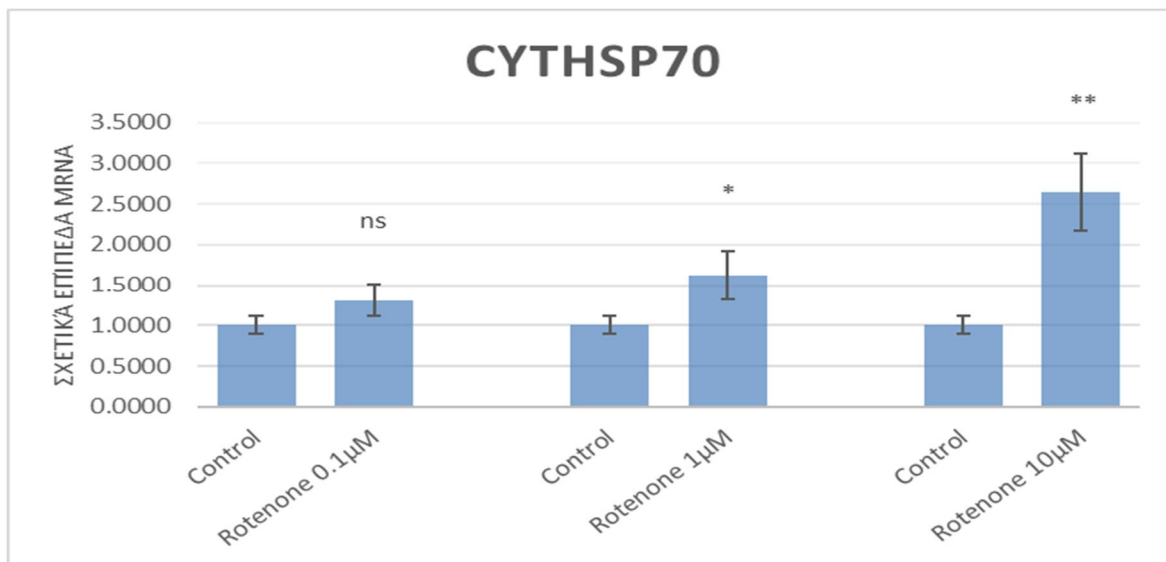
**Διάγραμμα 6:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *ATF4* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.



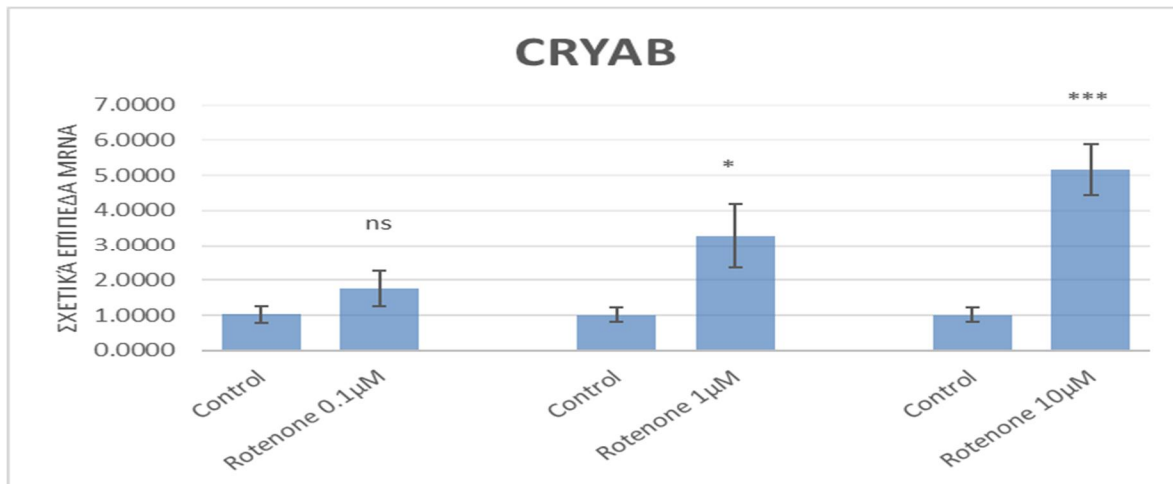
**Διάγραμμα 7:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *CHOP* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.

#### 4.3.1.3 qPCR και κυτταροπλασματικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες θερμικού σοκ (HSR)

Για την απόκριση θερμικού σοκ βρέθηκαν: αύξηση των μεταγραφωμάτων και των δύο γονιδίων *CYTHSP70* και *CRYAB*, ύστερα από επώαση με ροτενόνη σε συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM. Και σε αυτήν την περίπτωση η ακτίνη Β (*ACTB*) χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να πραγματοποιηθεί η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA των υπό μελέτη γονιδίων.



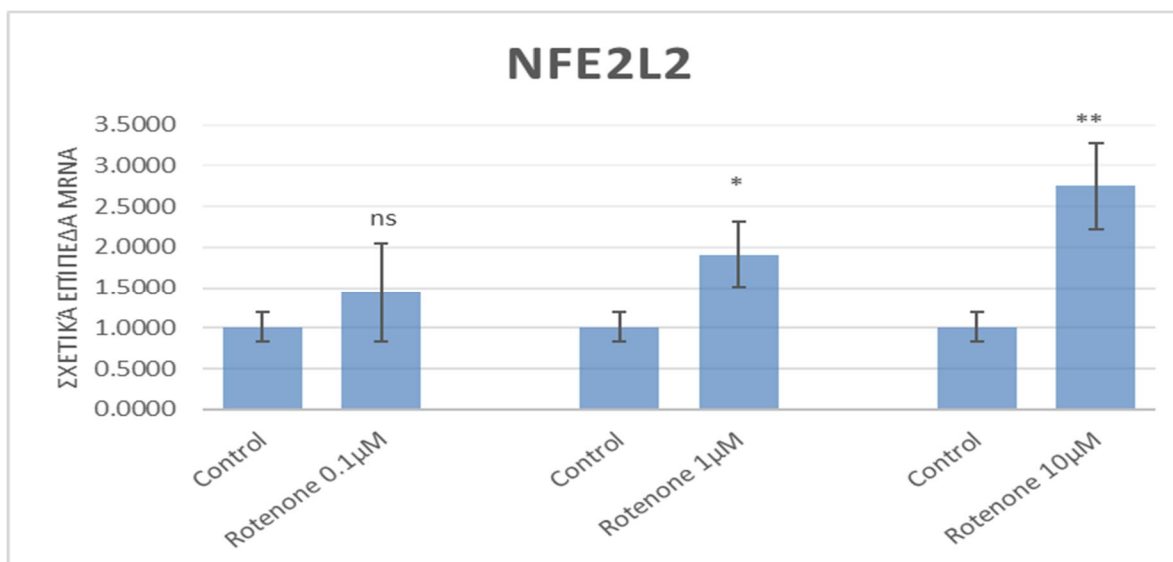
**Διάγραμμα 8:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *CYTHSP70* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.



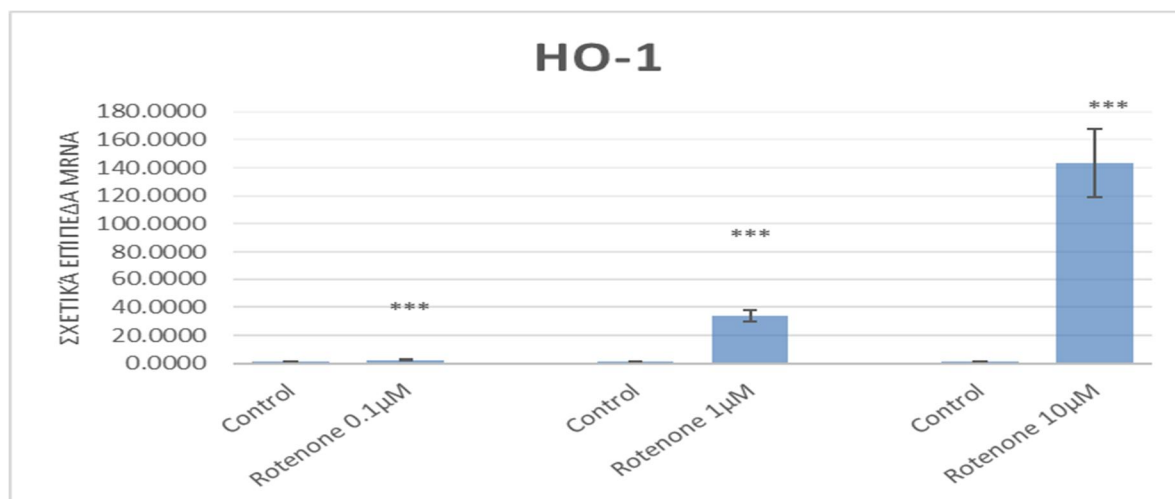
**Διάγραμμα 9:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *CRYAB* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.

#### 4.3.1.4 qPCR και αντιοξειδωτικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες (ASR)

Όσο για την αντιοξειδωτική απόκριση παρατηρήθηκαν: άνοδος των επιπέδων των mRNA του γονιδίου *NFE2L2* σε συγκέντρωση 1 μM και 10 μM κατόπιν επώασης των κυττάρων με ροτενόνη. Επίσης, υπερρύθμιση διαπιστώθηκε και στο γονίδιο HO-1 σε συγκεντρώσεις 0,1 μM 1 μM και 10 μM. Η ακτίνης Β (*ACTB*) χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA.



**Διάγραμμα 10:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *NFE2L2* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.



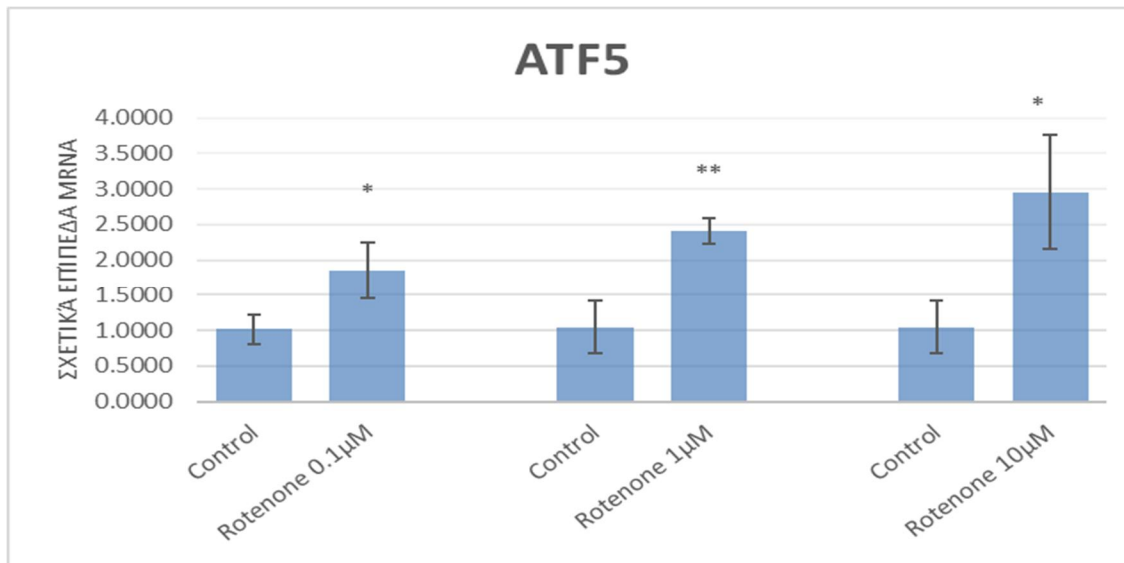
**Διάγραμμα 11:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *HO-1* σε κύτταρα HT1080 με ή χωρίς την παρουσία του χημικού Rotenone για 24 ώρες.

### 4.3.2 Μελέτη έκφρασης μονοπατιών ανταπόκρισης σε στρες ροτενόνης σε κύτταρα μεταστατικού μελανώματος WM266-4 με τη χρήση qPCR

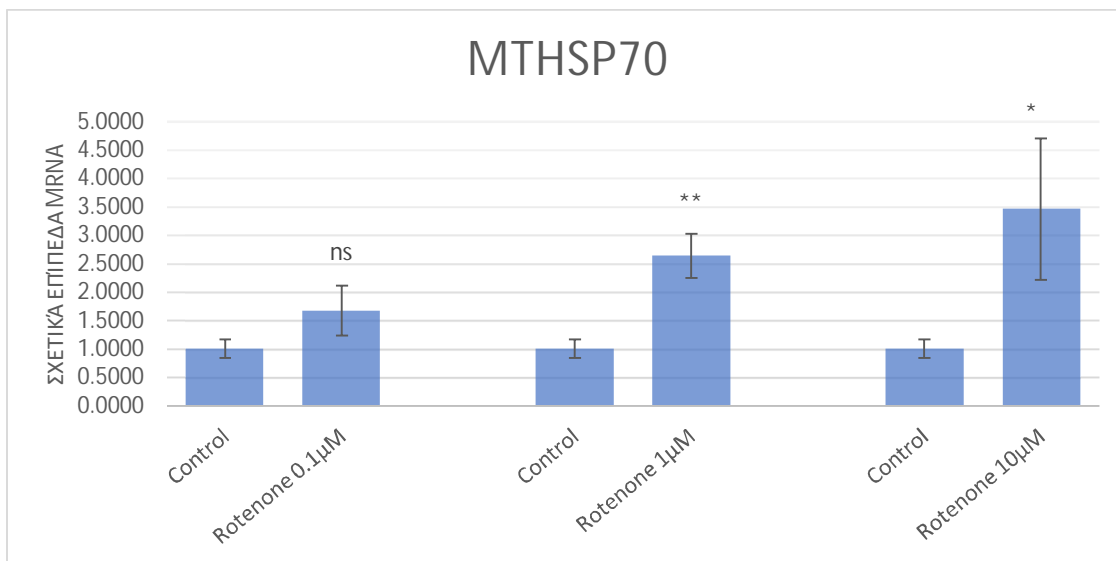
Επιπλέον, τα κύτταρα, τα οποία ανήκουν στην καρκινική σειρά WM266-4 επωάστηκαν επίσης με ροτενόνη (Rotenone) σε συγκεντρώσεις 0,1 μM, 1 μM και 10 μM, για διάστημα 24 ωρών. Η αναστολή του συμπλόκου I της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, η οποία προκαλείται ως αποτέλεσμα της έκθεσης των κυττάρων αυτών στη ροτενόνη, οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων τεσσάρων μηχανισμών απόκρισης κυτταρικού στρες.

#### 4.3.2.1 qPCR και μιτοχονδριακό μονοπάτι ανταπόκρισης σε μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών (MTUPR)

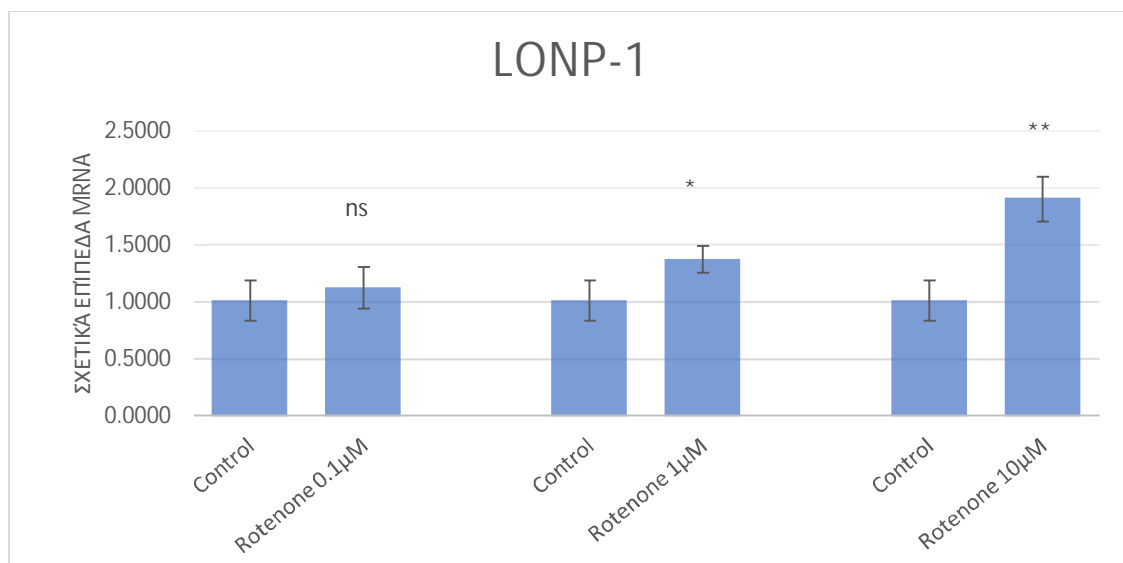
Αναφορικά με το μηχανισμό MTUPR διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων των mRNA των γονιδίων *ATF5* σε συγκέντρωση ροτενόνης 0,1 μM, 1 μM και 10 μM. Επιπλέον, τα μεταγράφα των γονιδίων *MTHSP70* και *LONP-1* εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM. Η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA έγινε με τη βοήθεια του γονιδίου *ACTB*.



**Διάγραμμα 12:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *ATF5* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.



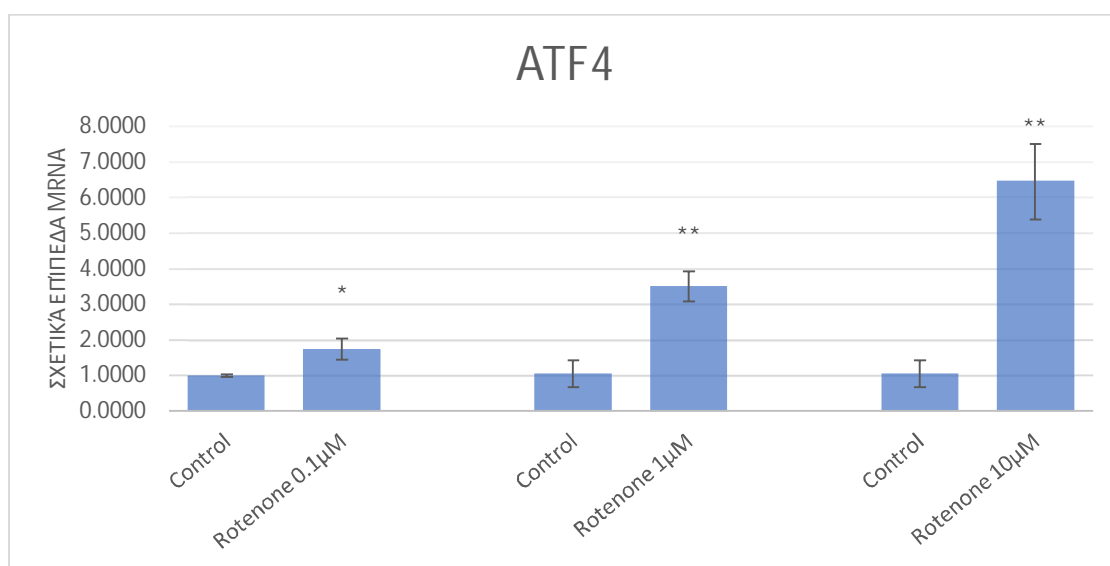
**Διάγραμμα 13:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *MTHSP70* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.



**Διάγραμμα 14:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *LONP-1* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.

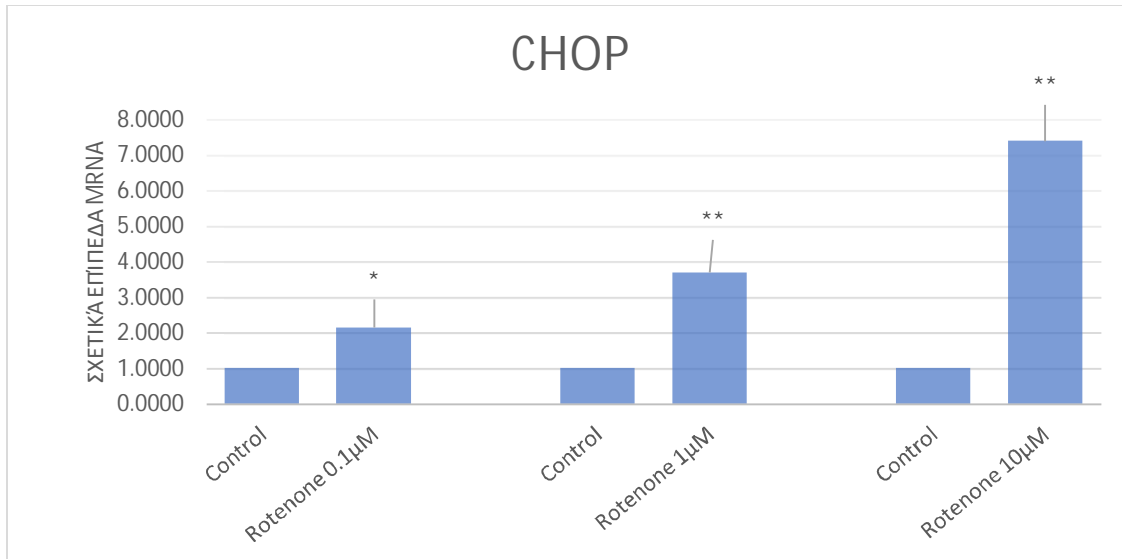
#### 4.3.2.2 qPCR και μονοπάτι ολοκληρωμένης ανταπόκρισης σε στρες (ISR)

Σχετικά με τον ISR διαπιστώθηκε: αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων των γονιδίων *ATF4* και *CHOP* στις συγκεντρώσεις 0,1 μM, 1 μM και 10 μM του χημικού αναστολέα I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA έγινε και σε αυτήν την περίπτωση με την αρωγή του γονιδίου της ακτίνης B.



**Διάγραμμα 15:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *ATF4* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.

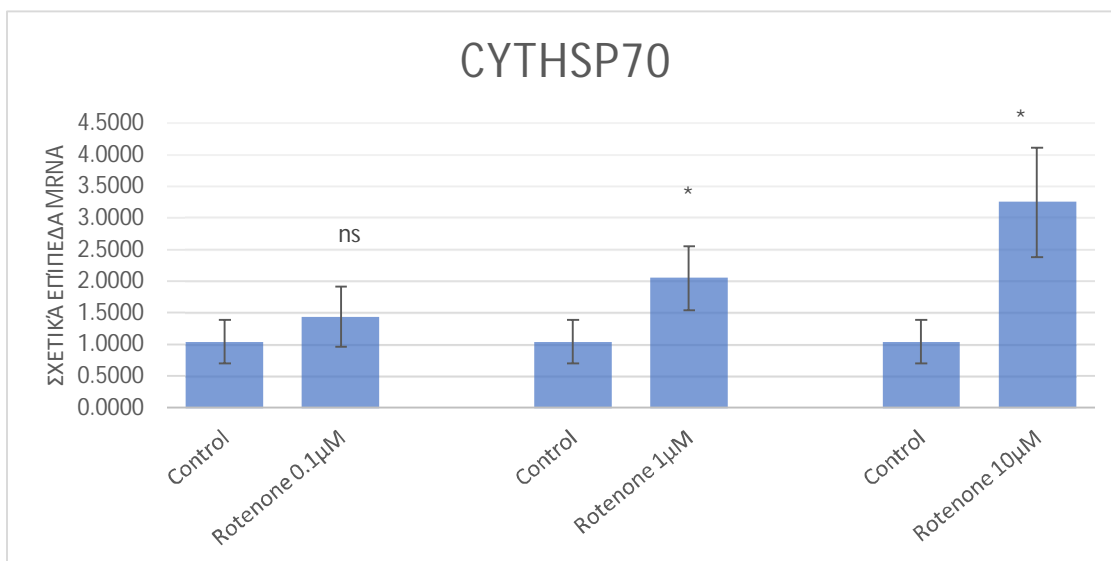




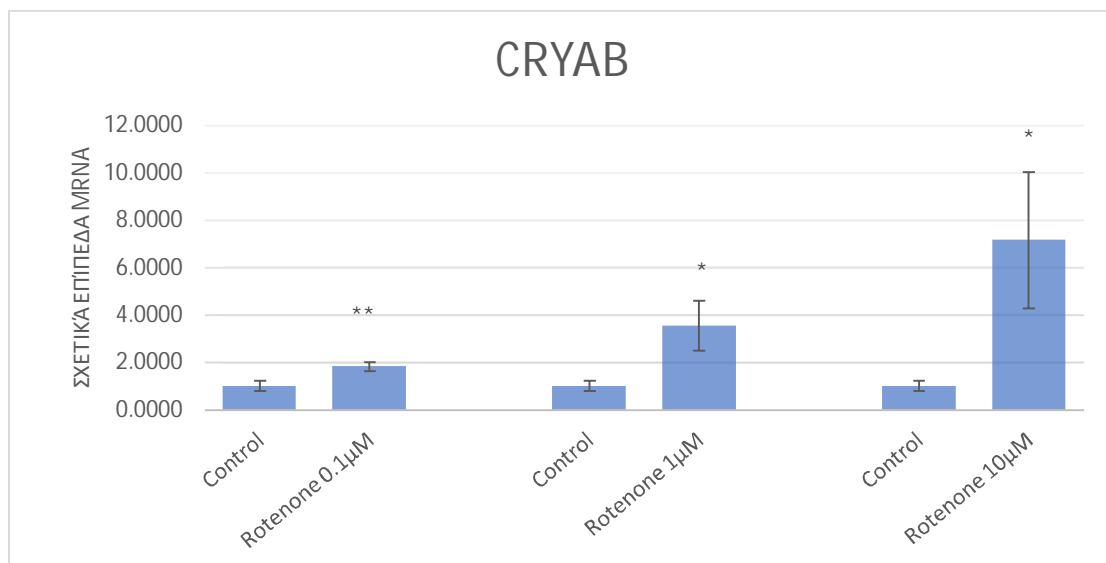
**Διάγραμμα 16:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *CHOP* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.

#### 4.3.2.3 qPCR και κυτταροπλασματικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες θερμικού σοκ (HSR)

Για την απόκριση θερμικού σοκ παρατηρήθηκαν: επαγωγή των mRNA των γονιδίων *CYTHSP70* και *CRYAB* σε συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM και 0,1 μM, 1 μM και 10 μM αντίστοιχα, ύστερα από επώαση των κυττάρων με τη ροτενόνη. Και εδώ η ακτίνη B χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να τεθεί εις πέρας η κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA των υπό μελέτη γονιδίων.



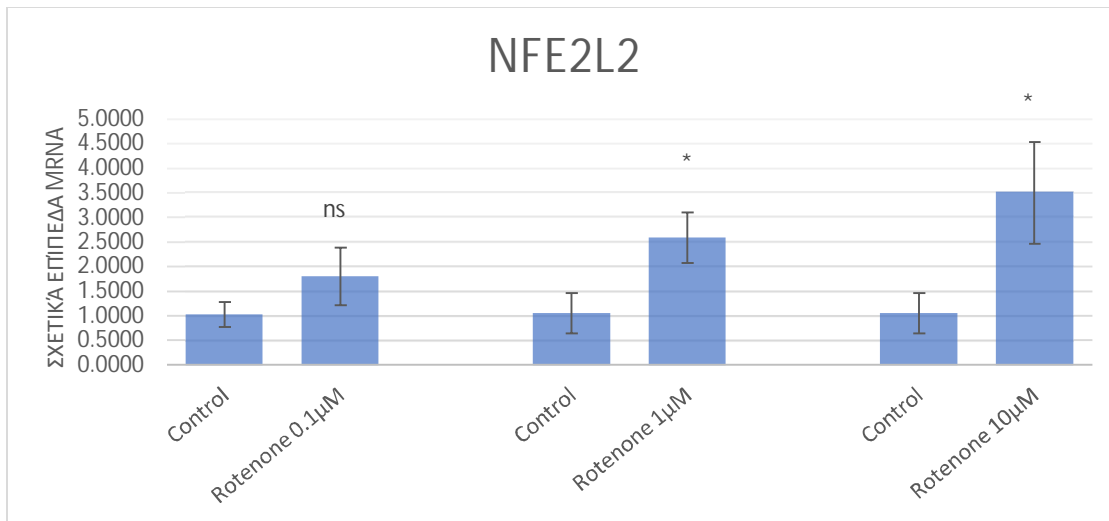
**Διάγραμμα 17:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *CYTHSP70* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.



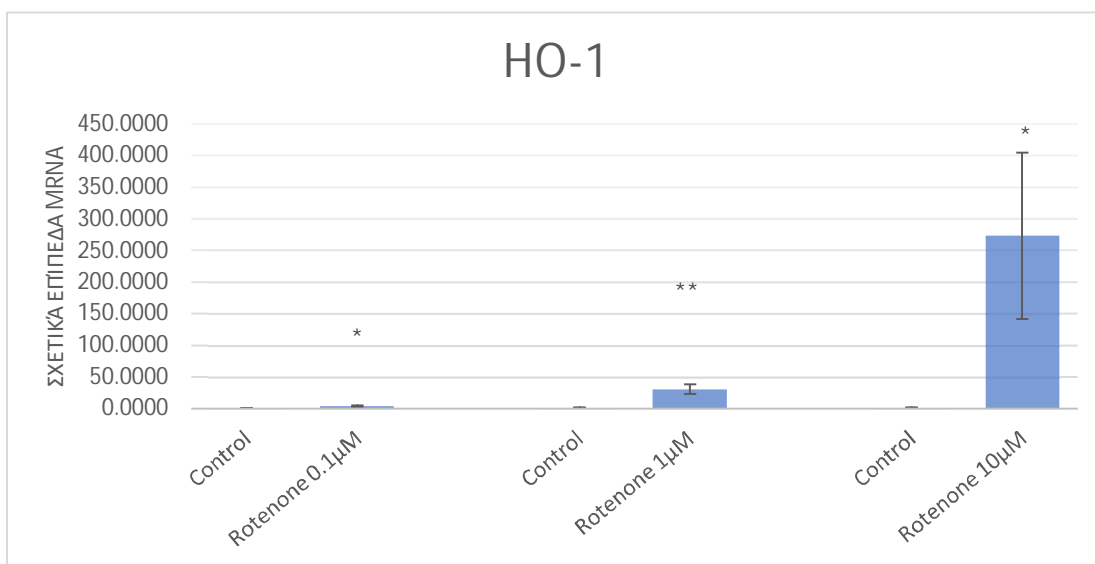
**Διάγραμμα 18:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *CRYAB* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.

#### 4.3.2.4 qPCR και αντιοξειδωτικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες (ASR)

Όσο για το μηχανισμό της αντιοξειδωτικής απόκρισης διαπιστώθηκαν: επαγωγή των επιπέδων των μεταγραφωμάτων του γονιδίου *NFE2L2* σε συγκέντρωση 1 μM και 10 μM κατόπιν επώσεως των κυττάρων με ροτενόνη. Επιπροσθέτως, άνοδος βρέθηκε και στο γονίδιο *HO-1* σε συγκεντρώσεις 0,1 μM 1 μM και 10 μM. Η ακτίνη Β (*ACTB*) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των επιπέδων των mRNA.



**Διάγραμμα 19:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *NFE2L2* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.



**Διάγραμμα 20:** Επίπεδα mRNA του γονιδίου *HO-1* στην κυτταρική σειρά WM266-4 με ή χωρίς την παρουσία του παράγοντα Rotenone για 24 ώρες.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Οι διάφοροι τύποι κυτταρικού στρες είναι ικανοί να επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις στη λειτουργία των κυττάρων. Για αυτόν το λόγο το κύτταρο διαθέτει τέσσερα μονοπάτια ανταπόκρισης σε τέτοιες επικίνδυνες καταστάσεις για τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων. Ειδικότερα, η πρωταρχική λειτουργία των συστημάτων ανταπόκρισης σε στρες είναι να βοηθήσουν το κύτταρο να αντεπεξέλθει σε αυτές τις απειλητικές συνθήκες και τελικώς να επέλθει ισορροπία. Λόγω της ιδιότητας τους αυτής, τα αντι-στρες συστήματα υποβοηθούν την επιβίωση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου ROS αποτελεί μία κλασική μορφή τέτοιων στρεσογόνων συνθηκών. Αυτές θέτουν σε κίνδυνο τη μιτοχονδριακή λειτουργία και συμβάλλουν στην ενδοκυτταρική επικοινωνία μεταξύ των οργανιδίων αυτών και του πυρήνα, με σκοπό να διευθετηθεί η αποκατάσταση του προβλήματος. Ένα σύνηθες αποτέλεσμα σε καταστάσεις στρες είναι η παρουσία μη ορθά αναδιπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία έχουν την τάση να συναθροίζονται. Για αυτόν το λόγο η μιτοπυρηνική επικοινωνία αλλάζει, με σκοπό την ενεργοποίηση μηχανισμών ανταπόκρισης σε στρες, οι οποίοι θα ασχοληθούν με την εξάλειψη ή τον περιορισμό αυτού του φαινομένου. Με σκοπό να συμβεί αυτό, η πρωτεϊνοσύνθεση μειορυθμίζεται, ώστε να μην εκφράζονται περαιτέρω πρωτεΐνες με ελλαττωματική μορφή, ενώ ταυτόχρονα επάγεται η επιλεκτική έκφραση συγκεκριμένων πυρηνικά κωδικοποιημένων πρωτεϊνών, των οποίων ο ρόλος είναι η αποκατάσταση τέτοιων προβλημάτων στα μιτοχόνδρια. Στην περίπτωση κατά την οποία η συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ενταθεί, επέρχεται ενεργοποίηση των μηχανισμών που προάγουν κυτταρικό θάνατο. Με άλλα λόγια, ο θάνατος επέρχεται στην περίπτωση, κατά την οποία τα συστήματα επιδιόρθωσης και τα συστήματα ελέγχου του στρες αποτυγχάνουν.

Το κυτταροπλασματικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες θερμικού σοκ, το μονοπάτι ολοκληρωμένης ανταπόκρισης σε στρες, το μιτοχονδριακό μονοπάτι ανταπόκρισης σε μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών και το αντιοξειδωτικό μονοπάτι ανταπόκρισης σε στρες αποτελούν τέσσερεις απαραίτητους μηχανισμούς, οι οποίοι βρίσκονται στη φαρέτρα των κυττάρων για την αντιμετώπιση των αποτελεσμάτων του στρες. Αν και κατά βάση έχουν μελετηθεί εκτενέστερα στον οργανισμό *C. elegans*, πρόσφατη ερευνητική δραστηριότητα έχει αποκαλύψει ότι εμφανίζουν αντίστοιχη δράση και σε ανθρώπινα κύτταρα. Τα σημαντικά στοιχεία που μας οδήγησαν να ασχοληθούμε με τη μελέτη των μονοπατιών ανταπόκρισης σε κυτταρικό στρες ήταν δύο. Το πρώτο είναι το γεγονός ότι οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν διερευνηθεί εις βάθος

στον άνθρωπο, και το δεύτερο ότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά στοιχεία σχετικά με την ενεργοποίηση και λειτουργία τους κατά την καρκινογένεση. Για αυτό, λοιπόν, το λόγο αναλάβαμε τη μελέτη των τεσσάρων αυτών μηχανισμών ανταπόκρισης σε στρες σε καρκινικά κύτταρα, ώστε να αναλύσουμε τα μονοπάτια αυτά σε δύο διαφορετικές καρκινικές σειρές και να διαπιστώσουμε κατά πόσο αυτοί οι μηχανισμοί αλληλεπιδρούν για να αποκαταστήσουν τις προκαλούμενες από το στρες δυσλειτουργίες.

Με σκοπό να γίνει η παρατήρηση του κυτταροπλασματικού μονοπατιού ανταπόκρισης σε στρες θερμικού σοκ, του μηχανισμού ολοκληρωμένης ανταπόκρισης σε στρες, του μιτοχονδριακού μηχανισμού ανταπόκρισης σε μη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού ανταπόκρισης σε στρες οι οποίοι προξενούν δυσλειτουργίες στα μιτοχόνδρια και αναπόφευκτα ενεργοποιεί μηχανισμούς ανταπόκρισης σε στρες. Η μελέτη αναφορικά με την επίδραση του χημικού μας παράγοντα εστιάζει στην παρατήρηση των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στους τέσσερεις μηχανισμούς ανταπόκρισης υπό στρεσογόνες συνθήκες.

Βάσει των πειραμάτων του εργαστηρίου μας, η χημική ουσία Rotenone αποτελεί έναν αναστολέα του συμπλόκου αναπνευστικής αλυσίδας I στα μιτοχόνδρια, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει αύξηση στην παραγωγή των ROS στα οργανίδια αυτά και συνεπώς ενεργοποίηση των μηχανισμών ανταπόκρισης σε κυτταρικό στρες στις δύο υπό μελέτη καρκινικές σειρές, HT1080 και WM266-4. Έτσι, λοιπόν, σε συμφωνία με τα πειράματα των Francesca Pistollato et al, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του mRNA στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *NF2EL2*, γεγονός το οποίο προκάλεσε την ανοδική ρύθμιση του *HO-1* με σκοπό την πυροδότηση του μηχανισμού ανταπόκρισης σε οξειδωτικό στρες.

Σχετικά, με το μηχανισμό ISR, οι Jillian M. Silva et al, παρατήρησαν πως παρουσία ροτενόνης προκύπτει φωσφορυλίωση της  $\alpha$  υπομονάδας του παράγοντα EIF2 $\alpha$ , η οποία, μετά την αναστολή της μετάφρασης, επιτρέπει στα ριβοσώματα να σαρώσουν και να χρησιμοποιήσουν ένα εναλλακτικό uORF και να ενισχύσουν την έκφραση της ATF4. Επίσης, προέκυψε πως ο παράγοντας μεταγραφής ATF4, οδήγησε σε επαγωγή των mRNA των γονιδίων *GADD34* και *CHOP*, τα οποία θα εκκινήσουν μια διαδικασία προώθησης της κυτταρικής ομοιόστασης για καταπολέμηση των αποτελεσμάτων του στρες.

Αναφορικά με την απόκριση θερμικού σοκ, οι María Francisca Molina-Jiménez

et al, έδειξαν πως παρουσία ροτενόνης η μεταγραφή του γονιδίου της κυτοσολικής *HSP70* επάγεται. Το παραπάνω αποτέλεσμα σχετικά με αυτή τη μοριακή συνοδό, της οποίας ο στόχος είναι να σταθεροποιεί τα νεοσυντιθέμενα πρωτεϊνικά μόρια ώστε να λάβουν ορθή τριτοταγή δομή ή να ασκεί τη δράση της σε πρωτεΐνες που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά, συμφωνεί με τα αποτελέσματα των σχετικών πειραμάτων μας.

Τέλος, από την πειραματική μας ανάλυση εντοπίστηκε αύξηση των μεταγράφων του *ATF5*, ο οποίος ως παράγοντας μεταγραφής μπορεί να ξεκινήσει τη σηματοδότηση για την έκφραση των πρωτεϊνών που θα αποκαταστήσουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, τα μέλη της οικογένειας *ATF* (λόγου χάρη *ATF4*, *ATF5*, και άλλα) αυξάνουν τις μεταγραφικές αποκρίσεις σε κυτταρικό στρες. Όσες από αυτές επηρεάζονται από τον *ATF5*, αφορούν την κυτταροπλασματική απάντηση σε θερμικό σοκ (cytosolic heat shock response), την ανταπόκριση σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στο μιτοχόνδριο (MTUPR) και την ανταπόκριση σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (UPRER). [63] Συνεπώς, προκύπτει επαγωγή των μορίων LONP-1 και της μιτοχονδριακής *HSP70*, οι οποίες έχουν δράση μοριακής συνοδού για την αποκατάσταση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Σχετικά με το εύρημά μας αυτό, οι Agrit Katiyar et al, επιβεβαιώνουν και αυτοί την αύξηση των μορίων *ATF5* επειδή τα ετεροδιμερή CHOP-ATF4 συνεργάζονται με σκοπό να αυξορρυθμίσουν την έκφραση του παράγοντα *ATF5*. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της δράσης του *ATF5* εξαρτώνται από το αν ο μεταγραφικός παράγοντας θα καταλήξει στον πυρήνα. Επίσης παρατήρησαν και επαγωγή της μιτοχονδριακής *HSP70*, αν και δεν έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη της πρωτεΐνης LONP-1. Συνεπώς σε συμφωνία με τους ανωτέρω βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη CHOP σε σύμπλοκο με C/EBP ενεργοποιεί επίσης και γονίδια MTUPR. [209]

Τελειώνοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρουσιάζουν τις βέλτιστες συνθήκες, με βάση τις οποίες δύναται να προκληθεί προβληματική κατάσταση στρες στο οργανίδιο του μιτοχονδρίου με τη βοήθεια του χημικού παράγοντα Rotenone, με σκοπό να ενεργοποιηθεί τέσσερεις μηχανισμοί αποκατάστασης της βλάβης. Αυτοί, όπως έχει ειπωθεί, ρυθμίζονται μέσω της επικοινωνίας μιτοχονδρίου και πυρήνα. Τα αποτελέσματά του εργαστηρίου μας φυσικά μπορούν να εμπνεύσουν επιστήμονες για περαιτέρω μελέτες με στόχο να εξαχθούν συμπεράσματα για το πως άλλοι χημικοί παράγοντες συμβάλλουν στη ρύθμιση της αποκατάστασης της ομοιόστασης των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια.

Στους μελλοντικούς μας στόχους εντάσσονται η ευρύτερη και διεπισδυτικότερη διερεύνηση των μονοπατιών ανταπόκρισης σε κυτταρικό στρες σε περισσότερες κυτταρικές σειρές (καρκινικές και μη), έτσι ώστε να καλύψουμε το γνωστικό μας κενό αναφορικά με τους θεμελιώδεις μηχανισμούς αποκατάστασης των πρωτεϊνικών δυσλειτουργιών στα υποκυτταρικά αυτά οργανίδια, καθώς και η μελέτη σίγασης μεμονωμένων γονιδίων των μηχανισμών ανταπόκρισης σε στρεσογόνες καταστάσεις, σχετικά με την διαχείριση αυτών ως ενδεχόμενη συμπληρωματική θεραπεία κατά του καρκίνου.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- [1] C. Münch, “The different axes of the mammalian mitochondrial unfolded protein response,” *BMC Biology*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., Jul. 26, 2018. doi: 10.1186/s12915-018-0548-x.
- [2] J. Xing, J. C. Liao, and G. Oster, “Making ATP,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 46, pp. 16539–16546, Nov. 2005, doi: 10.1073/PNAS.0507207102.
- [3] “Mitochondria: The Aerobic Engines | Semantic Scholar.”  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Mitochondria%3A-The-Aerobic-Engines-Willett/7ca47999cb745f802761154056596a0b90f171c3> (accessed Jun. 02, 2022).
- [4] M. W. Gray, G. Burger, and B. F. Lang, “The origin and early evolution of mitochondria,” *Genome Biol*, vol. 2, no. 6, p. reviews1018.1, 2001, doi: 10.1186/GB-2001-2-6-REVIEWS1018.
- [5] S. G. E. Andersson *et al.*, “The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria,” *Nature*, vol. 396, no. 6707, pp. 133–140, Nov. 1998, doi: 10.1038/24094.
- [6] M. Akram, “Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism,” *Cell Biochem Biophys*, vol. 68, no. 3, pp. 475–478, 2014, doi: 10.1007/S12013-013-9750-1.
- [7] P. Belenky, K. L. Bogan, and C. Brenner, “NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease,” *Trends Biochem Sci*, vol. 32, no. 1, pp. 12–19, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.006.
- [8] L. Ernster and G. Dallner, “Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1271, no. 1, pp. 195–204, May 1995, doi: 10.1016/0925-4439(95)00028-3.
- [9] O. Haapanen, M. Reidelbach, and V. Sharma, “Coupling of quinone dynamics to proton pumping in respiratory complex I,” *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, vol. 1861, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.BBABIO.2020.148287.
- [10] J. S. Sousa, E. D’Imprima, and J. Vonck, “Mitochondrial Respiratory Chain Complexes,” *Subcell Biochem*, vol. 87, pp. 167–227, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_7.

- [11] J. A. Letts, K. Fiedorczuk, and L. A. Sazanov, "The architecture of respiratory supercomplexes," *Nature*, vol. 537, no. 7622, pp. 644–648, 2016, doi: 10.1038/NATURE19774.
- [12] J. A. Enríquez, "Supramolecular Organization of Respiratory Complexes," *Annu Rev Physiol*, vol. 78, pp. 533–561, Feb. 2016, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021115-105031.
- [13] B. Rieger, T. Arroum, M. Borowski, J. Villalta, and K. B. Busch, "Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase determines the local proton motive force at cristae rims," *EMBO Rep*, vol. 22, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.15252/embr.202152727.
- [14] M. W. Pellegrino, A. M. Nargund, and C. M. Haynes, "Signaling the mitochondrial unfolded protein response," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1833, no. 2. Elsevier B.V., pp. 410–416, 2013. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.019.
- [15] D. C. Wallace, "Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine," *Annu Rev Biochem*, vol. 76, pp. 781–821, 2007, doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.76.081205.150955.
- [16] A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, and N. Pfanner, "Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms," *Cell*, vol. 138, no. 4, p. 628, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.CELL.2009.08.005.
- [17] A. M. Kogelnik, M. T. Lott, M. D. Brown, S. B. Navathe, and D. C. Wallace, "MITOMAP: a human mitochondrial genome database," *Nucleic Acids Res*, vol. 24, no. 1, pp. 177–179, 1996, doi: 10.1093/NAR/24.1.177.
- [18] E. Ruiz-Pesini and D. C. Wallace, "Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA," *Hum Mutat*, vol. 27, no. 11, pp. 1072–1081, Nov. 2006, doi: 10.1002/HUMU.20378.
- [19] A. R. D'Souza and M. Minczuk, "Mitochondrial transcription and translation: overview," *Essays Biochem*, vol. 62, no. 3, p. 309, Jul. 2018, doi: 10.1042/EBC20170102.

- [20] T. Suzuki, A. Nagao, and T. Suzuki, "Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases," *Annu Rev Genet*, vol. 45, pp. 299–329, 2011, doi: 10.1146/ANNUREV-GENET-110410-132531.
- [21] M. Falkenberg, "Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway," *Essays Biochem*, vol. 62, no. 3, p. 287, Jul. 2018, doi: 10.1042/EBC20170100.
- [22] C. Takamatsu *et al.*, "Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein," *EMBO Rep*, vol. 3, no. 5, p. 451, May 2002, doi: 10.1093/EMBO-REPORTS/KVF099.
- [23] K. Wollen Steen *et al.*, "MtSSB may sequester UNG1 at mitochondrial ssDNA and delay uracil processing until the dsDNA conformation is restored," *DNA Repair (Amst)*, vol. 11, no. 1, pp. 82–91, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.DNAREP.2011.10.026.
- [24] P. E. Pestryakov and O. I. Lavrik, "Mechanisms of single-stranded DNA-binding protein functioning in cellular DNA metabolism," *Biochemistry (Moscow) 2008 73:13*, vol. 73, no. 13, pp. 1388–1404, Jan. 2009, doi: 10.1134/S0006297908130026.
- [25] N. W. Ashton, E. Bolderson, L. Cubeddu, K. J. O'Byrne, and D. J. Richard, "Human single-stranded DNA binding proteins are essential for maintaining genomic stability," *BMC Mol Biol*, vol. 14, p. 9, Apr. 2013, doi: 10.1186/1471-2199-14-9.
- [26] "POLRMT RNA polymerase mitochondrial [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Cmd=DetailsSearch&Term=5442> (accessed Sep. 23, 2022).
- [27] J. J. Arnold, E. D. Smidansky, I. M. Moustafa, and C. E. Cameron, "Human mitochondrial RNA polymerase: Structure–function, mechanism and inhibition," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1819, no. 9–10, pp. 948–960, Sep. 2012, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2012.04.002.
- [28] I. N. Shokolenko and M. F. Alexeyev, "Mitochondrial transcription in mammalian cells," *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol. 22, no. 5, p. 835, Jan. 2017, doi: 10.2741/4520.

- [29] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics," *Br J Cancer*, vol. 26, no. 4, p. 239, 1972, doi: 10.1038/BJC.1972.33.
- [30] M. Schuler and D. R. Green, "Mechanisms of p53-dependent apoptosis," *Biochem Soc Trans*, vol. 29, no. Pt 6, p. 684, Dec. 2001, doi: 10.1042/0300-5127:0290684.
- [31] S. Cory and J. M. Adams, "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch," *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 647–656, Sep. 2002, doi: 10.1038/NRC883.
- [32] M. A. Benedict, Y. Hu, N. Inohara, and G. Núñez, "Expression and Functional Analysis of Apaf-1 Isoforms: EXTRA WD-40 REPEAT IS REQUIRED FOR CYTOCHROME c BINDING AND REGULATED ACTIVATION OF PROCASPASE-9," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 12, pp. 8461–8468, Mar. 2000, doi: 10.1074/JBC.275.12.8461.
- [33] B. Mignotte and J. L. Vayssiere, "Mitochondria and apoptosis," *Eur J Biochem*, vol. 252, no. 1, pp. 1–15, Feb. 1998, doi: 10.1046/J.1432-1327.1998.2520001.X.
- [34] T. F. Reubold, S. Wohlgemuth, and S. Eschenburg, "Crystal Structure of Full-Length Apaf-1: How the Death Signal Is Relayed in the Mitochondrial Pathway of Apoptosis," *Structure*, vol. 19, no. 8, pp. 1074–1083, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.STR.2011.05.013.
- [35] H. Sies, "What is Oxidative Stress?," pp. 1–8, 2000, doi: 10.1007/978-1-4615-4649-8\_1.
- [36] H. Sies, "Biochemistry of Oxidative Stress," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 25, no. 12, pp. 1058–1071, Dec. 1986, doi: 10.1002/ANIE.198610581.
- [37] Y. Yang *et al.*, "Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy," *J Cell Physiol*, vol. 231, no. 12, pp. 2570–2581, Dec. 2016, doi: 10.1002/JCP.25349.
- [38] T. Finkel, "Signal transduction by reactive oxygen species," *J Cell Biol*, vol. 194, no. 1, p. 7, Jul. 2011, doi: 10.1083/JCB.201102095.

- [39] I. Fridovich, "Superoxide Anion Radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), Superoxide Dismutases, and Related Matters \*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 30, pp. 18515–18517, Jul. 1997, doi: 10.1074/JBC.272.30.18515.
- [40] C. Glorieux and P. B. Calderon, "Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach," *Biol Chem*, vol. 398, no. 10, pp. 1095–1108, Sep. 2017, doi: 10.1515/HSZ-2017-0131/ASSET/GRAPHIC/J\_HSZ-2017-0131\_FIG\_001.JPG.
- [41] G. A. Jacobson, K. C. Yee, and C. H. Ng, "Elevated plasma glutathione peroxidase concentration in acute severe asthma: comparison with plasma glutathione peroxidase activity, selenium and malondialdehyde," *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 67, no. 4, pp. 423–430, 2007, doi: 10.1080/00365510601153353.
- [42] M. J. Baker, T. Tatsuta, and T. Langer, "Quality control of mitochondrial proteostasis," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 7, pp. 1–19, 2011, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A007559.
- [43] M. P. Murphy, "How mitochondria produce reactive oxygen species," *Biochem J*, vol. 417, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2009, doi: 10.1042/BJ20081386.
- [44] J. E. Selfridge, E. Lezi, J. Lu, and R. H. Swerdlow, "Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease," *Neurobiol Dis*, vol. 51, pp. 3–12, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.NBD.2011.12.057.
- [45] H. Choudhry and A. L. Harris, "Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology," *Cell Metab*, vol. 27, no. 2, pp. 281–298, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.CMET.2017.10.005.
- [46] A. Suomalainen and B. J. Battersby, "Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 19, no. 2, pp. 77–92, Jan. 2018, doi: 10.1038/NRM.2017.66.
- [47] N. Sun, R. J. Youle, and T. Finkel, "The Mitochondrial Basis of Aging," *Mol Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 654–666, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2016.01.028.

- [48] K. Pakos-Zebrucka, I. Koryga, K. Mnich, M. Ljujic, A. Samali, and A. M. Gorman, “The integrated stress response,” *EMBO Rep*, vol. 17, no. 10, p. 1374, Oct. 2016, doi: 10.15252/EMBR.201642195.
- [49] H. P. Harding *et al.*, “An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress,” *Mol Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 619–633, Mar. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00105-9.
- [50] H. P. Harding *et al.*, “An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress,” *Mol Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 619–633, Mar. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00105-9.
- [51] C. Münch, “The different axes of the mammalian mitochondrial unfolded protein response,” *BMC Biology*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., Jul. 26, 2018. doi: 10.1186/s12915-018-0548-x.
- [52] K. Pakos-Zebrucka, I. Koryga, K. Mnich, M. Ljujic, A. Samali, and A. M. Gorman, “The integrated stress response,” *EMBO Rep*, vol. 17, no. 10, p. 1374, Oct. 2016, doi: 10.15252/EMBR.201642195.
- [53] P. Sieber, M. Platzer, and S. Schuster, “The Definition of Open Reading Frame Revisited,” *Trends in Genetics*, vol. 34, no. 3, pp. 167–170, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.TIG.2017.12.009.
- [54] M. R. Brent, “Genome annotation past, present, and future: how to define an ORF at each locus,” *Genome Res*, vol. 15, no. 12, pp. 1777–1786, Dec. 2005, doi: 10.1101/GR.3866105.
- [55] C. M. Rodriguez, S. Y. Chun, R. E. Mills, and P. K. Todd, “Translation of upstream open reading frames in a model of neuronal differentiation,” *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, May 2019, doi: 10.1186/S12864-019-5775-1.
- [56] F. Mignone, C. Gissi, S. Liuni, and G. Pesole, “Untranslated regions of mRNAs,” *Genome Biol*, vol. 3, no. 3, p. reviews0004.1, 2002, doi: 10.1186/GB-2002-3-3-REVIEWS0004.

- [57] K. Wethmar, J. J. Smink, and A. Leutz, "Upstream open reading frames: Molecular switches in (patho)physiology," *Bioessays*, vol. 32, no. 10, p. 885, Oct. 2010, doi: 10.1002/BIES.201000037.
- [58] C. Vilela and J. E. G. McCarthy, "Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region," *Mol Microbiol*, vol. 49, no. 4, pp. 859–867, Aug. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2958.2003.03622.X.
- [59] P. S. Lovett and E. J. Rogers, "Ribosome regulation by the nascent peptide.," *Microbiol Rev*, vol. 60, no. 2, p. 366, Jun. 1996, doi: 10.1128/MR.60.2.366-385.1996.
- [60] J. Somers, T. Pöyry, and A. E. Willis, "A perspective on mammalian upstream open reading frame function," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 45, no. 8, p. 1690, 2013, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2013.04.020.
- [61] A. Melber and C. M. Haynes, "UPR mt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication," *Cell Res*, vol. 28, no. 3, pp. 281–295, Mar. 2018, doi: 10.1038/CR.2018.16.
- [62] K. Ameri and A. L. Harris, "Activating transcription factor 4," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 40, no. 1, pp. 14–21, 2008, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2007.01.020.
- [63] B. A. Karpinski, G. D. Morle, J. Huggenvik, M. D. Uhler, and J. M. Leiden, "Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no. 11, p. 4820, Jun. 1992, doi: 10.1073/PNAS.89.11.4820.
- [64] M. Vallejo, D. Ron, C. P. Miller, and J. F. Habener, "C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 10, p. 4679, May 1993, doi: 10.1073/PNAS.90.10.4679.
- [65] W. B'Chir *et al.*, "The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression," *Nucleic Acids Res*, vol. 41, no. 16, p. 7683, Sep. 2013, doi: 10.1093/NAR/GKT563.



- [66] T. W. Fawcett, J. L. Martindale, K. Z. Guyton, T. Hai, and N. J. Holbrook, "Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response.," *Biochemical Journal*, vol. 339, no. Pt 1, p. 135, Apr. 1999, doi: 10.1042/0264-6021:3390135.
- [67] M. S. Kilberg, M. Balasubramanian, L. Fu, and J. Shan, "The Transcription Factor Network Associated With the Amino Acid Response in Mammalian Cells," *Advances in Nutrition*, vol. 3, no. 3, p. 295, May 2012, doi: 10.3945/AN.112.001891.
- [68] M. S. Kilberg, J. Shan, and N. Su, "ATF4-DEPENDENT TRANSCRIPTION MEDIATES SIGNALING OF AMINO ACID LIMITATION," *Trends Endocrinol Metab*, vol. 20, no. 9, p. 436, Nov. 2009, doi: 10.1016/J.TEM.2009.05.008.
- [69] J. Han *et al.*, "ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death," *Nat Cell Biol*, vol. 15, no. 5, p. 481, May 2013, doi: 10.1038/NCB2738.
- [70] L. Xu, L. Su, and X. Liu, "PKC $\delta$  regulates death receptor 5 expression induced by PS-341 through ATF4-ATF3/CHOP axis in human lung cancer cells," *Mol Cancer Ther*, vol. 11, no. 10, pp. 2174–2182, Oct. 2012, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0602.
- [71] B. F. Teske *et al.*, "CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis," *Mol Biol Cell*, vol. 24, no. 15, p. 2477, Aug. 2013, doi: 10.1091/MBC.E13-01-0067.
- [72] Q. Zhao, J. Wang, I. v. Levichkin, S. Stasinopoulos, M. T. Ryan, and N. J. Hoogenraad, "A mitochondrial specific stress response in mammalian cells," *EMBO J*, vol. 21, no. 17, p. 4411, Sep. 2002, doi: 10.1093/EMBOJ/CDF445.
- [73] T. Horibe and N. J. Hoogenraad, "The Chop Gene Contains an Element for the Positive Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response," *PLoS One*, vol. 2, no. 9, Sep. 2007, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0000835.

- [74] Q. Zhao, J. Wang, I. v. Levichkin, S. Stasinopoulos, M. T. Ryan, and N. J. Hoogenraad, “A mitochondrial specific stress response in mammalian cells,” *EMBO J*, vol. 21, no. 17, p. 4411, Sep. 2002, doi: 10.1093/EMBOJ/CDF445.
- [75] Z. Galehdar, P. Swan, B. Fuerth, S. M. Callaghan, D. S. Park, and S. P. Cregan, “Neuronal Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Is Regulated by ATF4–CHOP-Mediated Induction of the Bcl-2 Homology 3-Only Member PUMA,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 50, p. 16938, Dec. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1598-10.2010.
- [76] H. Puthalakath *et al.*, “ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim,” *Cell*, vol. 129, no. 7, pp. 1337–1349, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.04.027.
- [77] M. Haslbeck, T. Franzmann, D. Weinfurtner, and J. Buchner, “Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, no. 10, pp. 842–846, Oct. 2005, doi: 10.1038/NSMB993.
- [78] A. M. Schulz and C. M. Haynes, “UPR(mt)-mediated cytoprotection and organismal aging,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1847, no. 11, pp. 1448–1456, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.BBABIO.2015.03.008.
- [79] M. W. Pellegrino, A. M. Nargund, and C. M. Haynes, “Signaling the Mitochondrial Unfolded Protein Response,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1833, no. 2, p. 410, 2013, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2012.02.019.
- [80] C. M. Haynes, Y. Yang, S. P. Blais, T. A. Neubert, and D. Ron, “The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial unfolded protein response by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*,” *Mol Cell*, vol. 37, no. 4, p. 529, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.01.015.
- [81] A. B. Harbauer, R. P. Zahedi, A. Sickmann, N. Pfanner, and C. Meisinger, “The Protein Import Machinery of Mitochondria—A Regulatory Hub in Metabolism, Stress, and Disease,” *Cell Metab*, vol. 19, no. 3, pp. 357–372, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.CMET.2014.01.010.

- [82] P. J. Kang, J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E. A. Craig, and N. Pfanner, “Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins,” *Nature*, vol. 348, no. 6297, pp. 137–143, 1990, doi: 10.1038/348137A0.
- [83] G. Wright, K. Terada, M. Yan, I. Sergeev, and M. Mori, “Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation,” *Exp Cell Res*, vol. 263, no. 1, pp. 107–117, Feb. 2001, doi: 10.1006/EXCR.2000.5096.
- [84] K. Pakos-Zebrucka, I. Koryga, K. Mnich, M. Ljubic, A. Samali, and A. M. Gorman, “The integrated stress response,” *EMBO Rep*, vol. 17, no. 10, p. 1374, Oct. 2016, doi: 10.15252/EMBR.201642195.
- [85] W. Yan *et al.*, “Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 25, pp. 15920–15925, Dec. 2002, doi: 10.1073/PNAS.252341799.
- [86] P. Zhang *et al.*, “The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice,” *Mol Cell Biol*, vol. 22, no. 19, pp. 6681–6688, Oct. 2002, doi: 10.1128/MCB.22.19.6681-6688.2002.
- [87] D. Zhou, L. R. Palam, L. Jiang, J. Narasimhan, K. A. Staschke, and R. C. Wek, “Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions,” *J Biol Chem*, vol. 283, no. 11, pp. 7064–7073, Mar. 2008, doi: 10.1074/JBC.M708530200.
- [88] C. J. Fiorese, A. M. Schulz, Y. F. Lin, N. Rosin, M. W. Pellegrino, and C. M. Haynes, “The transcription factor ATF5 mediates a mammalian mitochondrial UPR,” *Curr Biol*, vol. 26, no. 15, p. 2037, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.CUB.2016.06.002.
- [89] P. M. Quirós *et al.*, “Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals,” *J Cell Biol*, vol. 216, no. 7, pp. 2027–2045, Jul. 2017, doi: 10.1083/JCB.201702058.

- [90] S. J. Marciniak *et al.*, “CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum,” *Genes Dev*, vol. 18, no. 24, pp. 3066–3077, Dec. 2004, doi: 10.1101/GAD.1250704.
- [91] C. J. Fiorese, A. M. Schulz, Y. F. Lin, N. Rosin, M. W. Pellegrino, and C. M. Haynes, “The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR,” *Current Biology*, vol. 26, no. 15, pp. 2037–2043, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.cub.2016.06.002.
- [92] T. K. Rainbolt, J. M. Saunders, and R. L. Wiseman, “Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response,” *Trends Endocrinol Metab*, vol. 25, no. 10, pp. 528–537, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.TEM.2014.06.007.
- [93] C. M. Haynes, C. J. Fiorese, and Y. F. Lin, “Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond,” *Trends Cell Biol*, vol. 23, no. 7, pp. 311–318, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.TCB.2013.02.002.
- [94] J. Yang *et al.*, “Lon in maintaining mitochondrial and endoplasmic reticulum homeostasis,” *Arch Toxicol*, vol. 92, no. 6, pp. 1913–1923, Jun. 2018, doi: 10.1007/S00204-018-2210-3.
- [95] S. S. Cha *et al.*, “Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber,” *EMBO J*, vol. 29, no. 20, pp. 3520–3530, Oct. 2010, doi: 10.1038/EMBOJ.2010.226.
- [96] W. Voos, “Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1833, no. 2, pp. 388–399, 2013, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2012.06.005.
- [97] R. Wadhwa *et al.*, “Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/MTHSP70 and HSP60,” *Biochem J*, vol. 391, no. Pt 2, pp. 185–190, Oct. 2005, doi: 10.1042/BJ20050861.
- [98] C. C. Deocaris, S. C. Kaul, and R. Wadhwa, “On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60,” *Cell Stress Chaperones*, vol. 11, no. 2, pp. 116–128, 2006, doi: 10.1379/CSC-144R.1.

- [99] T. Y. Kao *et al.*, “Mitochondrial Lon regulates apoptosis through the association with Hsp60-MTHSP70 complex,” *Cell Death Dis*, vol. 6, no. 2, Jan. 2015, doi: 10.1038/CDDIS.2015.9.
- [100] T. Inui *et al.*, “A novel mutation in the proteolytic domain of LONP1 causes atypical CODAS syndrome,” *Journal of Human Genetics* 2017 62:6, vol. 62, no. 6, pp. 653–655, Feb. 2017, doi: 10.1038/jhg.2017.11.
- [101] W. Voos, W. Jaworek, A. Wilkening, and M. Bruderek, “Protein quality control at the mitochondrion,” *Essays Biochem*, vol. 60, no. 2, pp. 213–225, Oct. 2016, doi: 10.1042/EBC20160009.
- [102] T. Suzuki, A. Nagao, and T. Suzuki, “Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases,” *Annu Rev Genet*, vol. 45, pp. 299–329, 2011, doi: 10.1146/ANNUREV-GENET-110410-132531.
- [103] M. Patron, H. G. Sprenger, and T. Langer, “m-AAA proteases, mitochondrial calcium homeostasis and neurodegeneration,” *Cell Res*, vol. 28, no. 3, p. 296, Mar. 2018, doi: 10.1038/CR.2018.17.
- [104] Y. E. Kim, M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, and F. Ulrich Hartl, “Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis,” *Annu Rev Biochem*, vol. 82, pp. 323–355, Jun. 2013, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060208-092442.
- [105] F. Gloge, A. H. Becker, G. Kramer, and B. Bukau, “Co-translational mechanisms of protein maturation,” *Curr Opin Struct Biol*, vol. 24, no. 1, pp. 24–33, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.SBI.2013.11.004.
- [106] W. Holtkamp, G. Kokic, M. Jäger, J. Mittelstaet, A. A. Komar, and M. v. Rodnina, “Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time,” *Science*, vol. 350, no. 6264, pp. 1104–1107, Nov. 2015, doi: 10.1126/SCIENCE.AAD0344.
- [107] I. Dikic, “Proteasomal and Autophagic Degradation Systems,” *Annu Rev Biochem*, vol. 86, pp. 193–224, Jun. 2017, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-044908.
- [108] F. U. Hartl, “Cellular Homeostasis and Aging,” *Annu Rev Biochem*, vol. 85, pp. 1–4, Jun. 2016, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-011116-110806.

- [109] A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, and N. Pfanner, "Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms," *Cell*, vol. 138, no. 4, p. 628, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.CELL.2009.08.005.
- [110] P. J. Kang, J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E. A. Craig, and N. Pfanner, "Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins," *Nature*, vol. 348, no. 6297, pp. 137–143, 1990, doi: 10.1038/348137A0.
- [111] P. E. Scherer, U. C. Krieg, S. T. Hwang, D. Vestweber, and G. Schatz, "A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein.," *EMBO J*, vol. 9, no. 13, p. 4315, 1990, doi: 10.1002/J.1460-2075.1990.TB07880.X.
- [112] J. Ostermann, W. Voos, P. J. Kang, E. A. Craig, W. Neupert, and N. Pfanner, "Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix," *FEBS Lett*, vol. 277, no. 1–2, pp. 281–284, Dec. 1990, doi: 10.1016/0014-5793(90)80865-G.
- [113] Q. Liu, J. Krzewska, K. Liberek, and E. A. Craig, "Mitochondrial Hsp70 Ssc1: Role in Protein Folding\*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 6112–6118, 2000, doi: 10.1074/jbc.M009519200.
- [114] R. Dutkiewicz, B. Schilke, H. Knieszner, W. Walter, E. A. Craig, and J. Marszalek, "Ssq1, a Mitochondrial Hsp70 Involved in Iron-Sulfur (Fe/S) Center Biogenesis SIMILARITIES TO AND DIFFERENCES FROM ITS BACTERIAL COUNTERPART\*," 2003, doi: 10.1074/jbc.M303527200.
- [115] R. I. Morimoto, "Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes," *Science (1979)*, vol. 259, no. 5100, pp. 1409–1410, 1993, doi: 10.1126/SCIENCE.8451637/ASSET/BEC359DA-0ACA-497A-B2F7-550DC190B54D/ASSETS/SCIENCE.8451637.FP.PNG.
- [116] D. Balchin, M. Hayer-Hartl, and F. U. Hartl, "In vivo aspects of protein folding and quality control," *Science (1979)*, vol. 353, no. 6294, Jul. 2016, doi:

10.1126/SCIENCE.AAC4354/ASSET/7AD6F635-37FB-483A-878F-FDB9477D1AD6/ASSETS/GRAPHIC/353\_AAC4354\_FA.JPEG.

- [117] K. Richter, M. Haslbeck, and J. Buchner, “The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death,” *Mol Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 253–266, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.10.006/ATTACHMENT/BFF2FC30-41D1-4EE0-9FE1-1D8B605F6F20/MMC1.PDF.
- [118] J. Weibezahn, C. Schlieker, P. Tessarz, A. Mogk, and B. Bukau, “Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation,” *Biol Chem*, vol. 386, no. 8, pp. 739–744, Aug. 2005, doi: 10.1515/BC.2005.086/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [119] S. Priya *et al.*, “Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides,” *FEBS Lett*, vol. 587, no. 13, pp. 1981–1987, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2013.05.014.
- [120] R. M. Vabulas, S. Raychaudhuri, M. Hayer-Hartl, and F. U. Hartl, “Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, no. 12, 2010, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A004390.
- [121] D. J. Naylor and F. U. Hartl, “Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells,” *Biochem Soc Symp*, vol. 68, no. 68, pp. 45–68, 2001, doi: 10.1042/BSS0680045.
- [122] A. L. Fink, “Chaperone-mediated protein folding,” *Physiol Rev*, vol. 79, no. 2, pp. 425–449, 1999, doi: 10.1152/PHYSREV.1999.79.2.425/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0290006005.JPEG.
- [123] F. U. Hartl, A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, “Molecular chaperones in protein folding and proteostasis,” *Nature*, vol. 475, no. 7356, pp. 324–332, Jul. 2011, doi: 10.1038/NATURE10317.
- [124] R. E. Lackie *et al.*, “The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases,” *Front Neurosci*, vol. 11, no. MAY, p. 254, May 2017, doi: 10.3389/FNINS.2017.00254.

- [125] M. P. Mayer and B. Bukau, “Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 6, p. 670, Mar. 2005, doi: 10.1007/S00018-004-4464-6.
- [126] S. K. Calderwood, A. Murshid, and T. Prince, “The Shock of Aging: Molecular Chaperones and the Heat Shock Response in Longevity and Aging – A Mini-Review,” *Gerontology*, vol. 55, no. 5, p. 550, Sep. 2009, doi: 10.1159/000225957.
- [127] K. Dokladny, O. B. Myers, and P. L. Moseley, “Heat shock response and autophagy—cooperation and control,” *Autophagy*, vol. 11, no. 2, p. 200, 2015, doi: 10.1080/15548627.2015.1009776.
- [128] F. Ritossa, “A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila,” *Experientia 1962 18:12*, vol. 18, no. 12, pp. 571–573, Dec. 1962, doi: 10.1007/BF02172188.
- [129] L. Zhang, J. H. L. Fok, and F. E. Davies, “Heat shock proteins in multiple myeloma,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 5, pp. 1132–1148, 2014, doi: 10.18632/ONCOTARGET.1584.
- [130] J. M. Matz, M. J. Blake, H. M. Tatelman, K. P. Lavoie, and N. J. Holbrook, “Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue,” *Am J Physiol*, vol. 269, no. 1 Pt 2, 1995, doi: 10.1152/AJPREGU.1995.269.1.R38.
- [131] Y. Cao, N. Ohwatari, T. Matsumoto, M. Kosaka, A. Ohtsuru, and S. Yamashita, “TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts,” *Pflugers Arch*, vol. 438, no. 3, pp. 239–244, 1999, doi: 10.1007/S004240050905.
- [132] A. F. Laplante *et al.*, “Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing,” *J Histochem Cytochem*, vol. 46, no. 11, pp. 1291–1301, 1998, doi: 10.1177/002215549804601109.
- [133] A. de Maio, “Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams,” *Shock*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 1999, doi: 10.1097/00024382-199901000-00001.



- [134] C. Wu, "Heat shock transcription factors: structure and regulation," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 11, pp. 441–469, 1995, doi: 10.1146/ANNUREV.CB.11.110195.002301.
- [135] P. K. Sorger, "Heat shock factor and the heat shock response," *Cell*, vol. 65, no. 3, pp. 363–366, May 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90452-5.
- [136] J.-S. Hahn, Z. Hu, D. J. Thiele, and V. R. Iyer, "Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor," *Mol Cell Biol*, vol. 24, no. 12, pp. 5249–5256, Jun. 2004, doi: 10.1128/MCB.24.12.5249-5256.2004.
- [137] C. Voisine, K. Orton, and R. I. Morimoto, "Protein Misfolding, Chaperone Networks, and the Heat Shock Response in the Nervous System," *Molecular Neurology*, pp. 59–76, Jan. 2007, doi: 10.1016/B978-012369509-3.50007-X.
- [138] A. Parcellier, E. Schmitt, M. Brunet, A. Hammann, E. Solary, and C. Garrido, "Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions," *Antioxid Redox Signal*, vol. 7, no. 3–4, pp. 404–413, Mar. 2005, doi: 10.1089/ARS.2005.7.404.
- [139] P. Mehlen, C. Kretz-Remy, X. Préville, and A. P. Arrigo, "Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death," *EMBO J*, vol. 15, no. 11, p. 2695, Jun. 1996, doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00630.x.
- [140] N. Launay, B. Goudeau, K. Kato, P. Vicart, and A. Lilienbaum, "Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton," *Exp Cell Res*, vol. 312, no. 18, pp. 3570–3584, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.YEXCR.2006.07.025.
- [141] S. P. Su, J. D. McArthur, R. J. W. Truscott, and J. A. Aquilina, "Truncation, cross-linking and interaction of crystallins and intermediate filament proteins in the aging human lens," *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, vol. 1814, no. 5, pp. 647–656, May 2011, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.03.014.

- [142] R. K. Gangalum, M. J. Schibler, and S. P. Bhat, "Small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin is part of cell cycle-dependent golgi reorganization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 42, pp. 43374–43377, Oct. 2004, doi: 10.1074/jbc.C400371200.
- [143] Z. Zhu, R. Li, R. Stricker, and G. Reiser, "Extracellular  $\alpha$ -crystallin protects astrocytes from cell death through activation of MAPK, PI3K/Akt signaling pathway and blockade of ROS release from mitochondria," *Brain Res*, vol. 1620, pp. 17–28, Sep. 2015, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2015.05.011.
- [144] A. P. Arrigo, "Analysis of HspB1 (Hsp27) Oligomerization and Phosphorylation Patterns and Its Interaction with Specific Client Polypeptides," *Methods Mol Biol*, vol. 1709, pp. 163–178, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7477-1\_12.
- [145] F. Xu, H. Yu, J. Liu, and L. Cheng, " $\alpha$ B-crystallin regulates oxidative stress-induced apoptosis in cardiac H9c2 cells via the PI3K/AKT pathway," *Mol Biol Rep*, vol. 40, no. 3, pp. 2517–2526, Mar. 2013, doi: 10.1007/S11033-012-2332-2.
- [146] W.-F. Hu *et al.*, " $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallins interact with caspase-3 and Bax to guard mouse lens development," *Curr Mol Med*, vol. 12, no. 2, pp. 177–187, Jan. 2012, doi: 10.2174/156652412798889036.
- [147] Y. W. Mao, J. P. Liu, H. Xiang, and D. W. C. Li, "Human  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallins bind to Bax and Bcl-XS to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis," *Cell Death & Differentiation 2004 11:5*, vol. 11, no. 5, pp. 512–526, Jan. 2004, doi: 10.1038/sj.cdd.4401384.
- [148] K. Itoh *et al.*, "An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 236, no. 2, pp. 313–322, Jul. 1997, doi: 10.1006/BBRC.1997.6943.
- [149] M.-K. Kwak, K. Itoh, M. Yamamoto, and T. W. Kensler, "Enhanced Expression of the Transcription Factor Nrf2 by Cancer Chemopreventive Agents: Role of Antioxidant Response Element-Like Sequences in the nrf2 Promoter," *Mol Cell Biol*, vol. 22, no. 9, p. 2883, May 2002, doi: 10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002.

- [150] A. Raghunath *et al.*, “Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications,” *Redox Biol*, vol. 17, p. 297, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.REDOX.2018.05.002.
- [151] P. Moi, K. Chan, I. Asunis, A. Cao, and Y. W. Kan, “Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 21, p. 9926, Oct. 1994, doi: 10.1073/PNAS.91.21.9926.
- [152] R. Gold *et al.*, “Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 367, no. 12, pp. 1098–1107, Sep. 2012, doi: 10.1056/NEJMOA1114287/SUPPL\_FILE/NEJMOA1114287\_DISCLOSURES.PDF.
- [153] A. P. Gureev, V. N. Popov, and A. A. Starkov, “Crosstalk between the mTOR and Nrf2/ARE signaling pathways as a target in the improvement of long-term potentiation,” *Exp Neurol*, vol. 328, p. 113285, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113285.
- [154] Y. Zhu, Q. Yang, H. Liu, Z. Song, and W. Chen, “Phytochemical compounds targeting on Nrf2 for chemoprevention in colorectal cancer,” *Eur J Pharmacol*, vol. 887, p. 173588, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2020.173588.
- [155] H. K. Bryan, A. Olayanju, C. E. Goldring, and B. K. Park, “The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation,” *Biochem Pharmacol*, vol. 85, no. 6, pp. 705–717, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.BCP.2012.11.016.
- [156] Y. Zhou *et al.*, “Sulfiredoxin-1 Attenuates Oxidative Stress via Nrf2/ARE Pathway and 2-Cys Prdxs After Oxygen-Glucose Deprivation in Astrocytes,” *Journal of Molecular Neuroscience* 2014 55:4, vol. 55, no. 4, pp. 941–950, Nov. 2014, doi: 10.1007/S12031-014-0449-6.
- [157] L. Li, H. Dong, E. Song, X. Xu, L. Liu, and Y. Song, “Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling,” *Chem Biol Interact*, vol. 209, no. 1, pp. 56–67, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.CBI.2013.12.005.

- [158] K. U. Tufekci, E. Civi Bayin, S. Genc, and K. Genc, “The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson’s Disease,” *Parkinsons Dis*, vol. 2011, 2011, doi: 10.4061/2011/314082.
- [159] C. Gorrini, I. S. Harris, and T. W. Mak, “Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy,” *Nature Reviews Drug Discovery* 2013 12:12, vol. 12, no. 12, pp. 931–947, Nov. 2013, doi: 10.1038/nrd4002.
- [160] C. P. Ramsey *et al.*, “Expression of Nrf2 in Neurodegenerative Diseases,” *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 66, no. 1, p. 75, Jan. 2007, doi: 10.1097/NEN.0B013E31802D6DA9.
- [161] Z. Sun, S. Zhang, J. Y. Chan, and D. D. Zhang, “Keap1 Controls Postinduction Repression of the Nrf2-Mediated Antioxidant Response by Escorting Nuclear Export of Nrf2,” *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 18, p. 6334, Sep. 2007, doi: 10.1128/MCB.00630-07.
- [162] L. C. Greaves *et al.*, “Clonal Expansion of Early to Mid-Life Mitochondrial DNA Point Mutations Drives Mitochondrial Dysfunction during Human Ageing,” *PLoS Genet*, vol. 10, no. 9, Sep. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1004620.
- [163] H. K. Park *et al.*, “Unleashing the full potential of Hsp90 inhibitors as cancer therapeutics through simultaneous inactivation of Hsp90, Grp94, and TRAP1,” *Exp Mol Med*, vol. 52, no. 1, p. 79, Jan. 2020, doi: 10.1038/S12276-019-0360-X.
- [164] C. M. Haynes and D. Ron, “The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis,” *J Cell Sci*, vol. 123, no. Pt 22, pp. 3849–3855, Nov. 2010, doi: 10.1242/JCS.075119.
- [165] P. Deng and C. M. Haynes, “Mitochondrial dysfunction in cancer: Potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR,” *Semin Cancer Biol*, vol. 47, p. 43, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2017.05.002.
- [166] D. Dluzen, G. Li, D. Tacelosky, M. Moreau, and D. X. Liu, “BCL-2 Is a Downstream Target of ATF5 That Mediates the Prosurvival Function of ATF5 in a Cell Type-dependent Manner,” *J Biol Chem*, vol. 286, no. 9, p. 7705, Mar. 2011, doi: 10.1074/JBC.M110.207639.

- [167] Z. Sheng, L. Ma, J. E. Sun, L. J. Zhu, and M. R. Green, “BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription,” *Blood*, vol. 118, no. 10, p. 2840, Sep. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2010-12-322537.
- [168] Y. Na *et al.*, “Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis,” *Cancer Res*, vol. 76, no. 9, pp. 2754–2765, May 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2704.
- [169] Y. Na *et al.*, “Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis,” *Cancer Res*, vol. 76, no. 9, pp. 2754–2765, May 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2704/652151/AM/STRESS-CHAPERONE-MORTALIN-CONTRIBUTES-TO.
- [170] L. Gibellini *et al.*, “Silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in colon cancer cells,” *FASEB J*, vol. 28, no. 12, pp. 5122–5135, Dec. 2014, doi: 10.1096/FJ.14-255869.
- [171] F. M. Chen, L. J. Huang, F. Ou-Yang, J. Y. Kan, L. C. Kao, and M. F. Hou, “Activation of mitochondrial unfolded protein response is associated with Her2-overexpression breast cancer,” *Breast Cancer Res Treat*, vol. 183, no. 1, pp. 61–70, Aug. 2020, doi: 10.1007/S10549-020-05729-9.
- [172] V. Jovaisaite and J. Auwerx, “The mitochondrial unfolded protein response - synchronizing genomes,” *Curr Opin Cell Biol*, vol. 33, p. 74, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.CEB.2014.12.003.
- [173] Y. Cai *et al.*, “Overexpression of PGC-1 $\alpha$  influences the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) induced by MPP<sup>+</sup> in human SH-SY5Y neuroblastoma cells,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41598-020-67229-6.
- [174] G. Karpel-Massler *et al.*, “A synthetic cell-penetrating dominant-negative ATF5 peptide exerts anti-cancer activity against a broad spectrum of treatment resistant cancers,” *Clin Cancer Res*, vol. 22, no. 18, p. 4698, Sep. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2827.

- [175] J. C. Ghosh, T. Dohi, H. K. Byoung, and D. C. Altieri, "Hsp60 Regulation of Tumor Cell Apoptosis \*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 8, pp. 5188–5194, Feb. 2008, doi: 10.1074/JBC.M705904200.
- [176] H. M. Wang *et al.*, "Obtusilactone A and (–)-sesamin induce apoptosis in human lung cancer cells by inhibiting mitochondrial Lon protease and activating DNA damage checkpoints," *Cancer Sci*, vol. 101, no. 12, pp. 2612–2620, Dec. 2010, doi: 10.1111/J.1349-7006.2010.01701.X.
- [177] A. Cole *et al.*, "Inhibition of the mitochondrial protease, ClpP, as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia," *Cancer Cell*, vol. 27, no. 6, p. 864, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.CCELL.2015.05.004.
- [178] N. Fang and J. E. Casida, "Anticancer action of cubé insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH:ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 7, pp. 3380–3384, Mar. 1998, doi: 10.1073/PNAS.95.7.3380.
- [179] N. Xiong *et al.*, "Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models," <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2012.680431>, vol. 42, no. 7, pp. 613–632, Aug. 2012, doi: 10.3109/10408444.2012.680431.
- [180] S. S. Barham and B. R. Brinkley, "Action of rotenone and related respiratory inhibitors on mammalian cell division. I Cell kinetics and biochemical aspects," *Cytobios*, vol. 15, no. 58–59, pp. 85–96, 1976, Accessed: Jun. 16, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1001024/>
- [181] N. Li *et al.*, "Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production \*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 10, pp. 8516–8525, Mar. 2003, doi: 10.1074/JBC.M210432200.
- [182] E. Hasegawa, K. Takeshige, T. Oishi, Y. Murai, and S. Minakami, "1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles," *Biochem*

- Biophys Res Commun*, vol. 170, no. 3, pp. 1049–1055, Aug. 1990, doi: 10.1016/0006-291X(90)90498-C.
- [183] J. F. Turrens and A. Boveris, “Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.,” *Biochemical Journal*, vol. 191, no. 2, p. 421, Nov. 1980, doi: 10.1042/BJ1910421.
- [184] R. Takayanagi, K. Takeshige, and S. Minakami, “NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol.,” *Biochemical Journal*, vol. 192, no. 3, p. 853, Dec. 1980, doi: 10.1042/BJ1920853.
- [185] K. Takeshige and S. Minakami, “NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH–ubiquinone reductase preparation,” *Biochemical Journal*, vol. 180, no. 1, p. 129, Apr. 1979, doi: 10.1042/BJ1800129.
- [186] J. F. Morley and R. I. Morimoto, “Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones,” *Mol Biol Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 657–664, Feb. 2004, doi: 10.1091/MBC.E03-07-0532/ASSET/IMAGES/LARGE/ZMK0020425390004.JPEG.
- [187] J. Barna, P. Csermely, and T. Vellai, “Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response,” *Cellular and Molecular Life Sciences 2018 75:16*, vol. 75, no. 16, pp. 2897–2916, May 2018, doi: 10.1007/S00018-018-2836-6.
- [188] M. Åkerfelt, D. Trouillet, V. Mezger, and L. Sistonen, “Heat Shock Factors at a Crossroad between Stress and Development,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1113, no. 1, pp. 15–27, Oct. 2007, doi: 10.1196/ANNALS.1391.005.
- [189] N. D. Trinklein, J. I. Murray, S. J. Hartman, D. Botstein, and R. M. Myers, “The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response,” *Mol Biol Cell*, vol. 15, no. 3, p. 1254, Mar. 2004, doi: 10.1091/MBC.E03-10-0738.

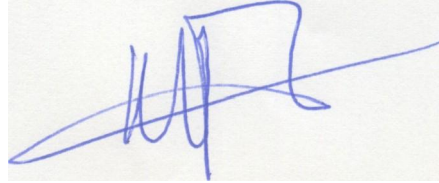
- [190] J. B. Stewart and P. F. Chinnery, “The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease,” *Nat Rev Genet*, vol. 16, no. 9, pp. 530–542, Aug. 2015, doi: 10.1038/NRG3966.
- [191] B. L. Gitschlag, C. S. Kirby, D. C. Samuels, R. D. Gangula, S. A. Mallal, and M. R. Patel, “Homeostatic responses regulate selfish mitochondrial genome dynamics in *C. elegans*,” *Cell Metab*, vol. 24, no. 1, p. 91, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.CMET.2016.06.008.
- [192] Y. F. Lin, A. M. Schulz, M. W. Pellegrino, Y. Lu, S. Shaham, and C. M. Haynes, “Maintenance and propagation of a deleterious mitochondrial genome by the mitochondrial UPR,” *Nature*, vol. 533, no. 7603, p. 416, May 2016, doi: 10.1038/NATURE17989.
- [193] A. M. Nargund, M. W. Pellegrino, C. J. Fiorese, B. M. Baker, and C. M. Haynes, “Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation,” *Science*, vol. 337, no. 6094, p. 587, Aug. 2012, doi: 10.1126/SCIENCE.1223560.
- [194] M. A. Qureshi, C. M. Haynes, and M. W. Pellegrino, “The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 33, American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., pp. 13500–13506, Aug. 18, 2017. doi: 10.1074/jbc.R117.791061.
- [195] Y. F. Lin, A. M. Schulz, M. W. Pellegrino, Y. Lu, S. Shaham, and C. M. Haynes, “Maintenance and propagation of a deleterious mitochondrial genome by the mitochondrial UPR,” *Nature*, vol. 533, no. 7603, p. 416, May 2016, doi: 10.1038/NATURE17989.
- [196] A. Barrientos and C. T. Moraes, “Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 23, pp. 16188–16197, Jun. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.23.16188.
- [197] J. Hirst, “Energy transduction by respiratory complex I – an evaluation of current knowledge,” *Biochem Soc Trans*, vol. 33, no. 3, pp. 525–529, Jun. 2005, doi: 10.1042/BST0330525.



- [198] L. A. Sazanov and P. Hinchliffe, “Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*,” *Science (1979)*, vol. 311, no. 5766, pp. 1430–1436, Mar. 2006, doi: 10.1126/SCIENCE.1123809/SUPPL\_FILE/SAZANOV.SOM.PDF.
- [199] J. Hirst, “Towards the molecular mechanism of respiratory complex I,” *Biochem J*, vol. 425, no. 2, pp. 327–339, 2009, doi: 10.1042/BJ20091382.
- [200] B. Chance and G. Hollunger, “Inhibition of Electron and Energy Transfer in Mitochondria: I. EFFECTS OF AMYTAL, THIOPENTAL, ROTENONE, PROGESTERONE, AND METHYLENE GLYCOL,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 238, no. 1, pp. 418–431, Jan. 1963, doi: 10.1016/S0021-9258(19)84014-0.
- [201] R. R. Ramsay and T. P. Singer, “Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP+,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 189, no. 1, pp. 47–52, Nov. 1992, doi: 10.1016/0006-291X(92)91523-S.
- [202] S. Rasheed, W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein, and M. B. Gardner, “Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080),” *Cancer*, vol. 33, no. 4, pp. 1027–1033, 1974, doi: 10.1002/1097-0142(197404)33:4<1027::aid-cncr2820330419>3.0.co;2-z.
- [203] E. G. Konstantakou *et al.*, “Deep-proteome mapping of WM-266-4 human metastatic melanoma cells: From oncogenic addiction to druggable targets,” *PLoS One*, vol. 12, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0171512.
- [204] L. Hayflick and P. S. Moorhead, “The serial cultivation of human diploid cell strains,” *Exp Cell Res*, vol. 25, no. 3, pp. 585–621, Dec. 1961, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- [205] “mirna, mirna expression vector, microRNA, neonatal cardiomyocyte isolation, adult cardiomyocyte isolation, inducible mirna.” [http://www.cellutron.com/rna\\_isol.html](http://www.cellutron.com/rna_isol.html) (accessed Jul. 08, 2022).

- [206] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001, doi: 10.1006/METH.2001.1262.
- [207] J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, and A. Blázquez-Castro, “Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives,” *Acta Histochem*, vol. 120, no. 3, pp. 159–167, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.ACTHIS.2018.02.005.
- [208] E. Taouktsi *et al.*, “Organismal and Cellular Stress Responses upon Disruption of Mitochondrial Lonp1 Protease,” *Cells*, vol. 11, no. 8, Apr. 2022, doi: 10.3390/CELLS11081363/S1.
- [209] A. Katiyar *et al.*, “HSF1 is required for induction of mitochondrial chaperones during the mitochondrial unfolded protein response,” *FEBS Open Bio*, vol. 10, no. 6, pp. 1135–1148, Jun. 2020, doi: 10.1002/2211-5463.12863.

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

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.