



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

Θέμα: Αλληλεπίδραση μεταξύ της απαρτιωμένης απόκρισης στο στρες (Integrated Stress Response - ISR) και του μονοπατιού NRF2/KEAP1 (Nuclear factor erythroid derived 2-like 2/Kelch-like ECH-associated protein 1) σε καρκινικά κύτταρα: Μελέτη του σχηματισμού κοκκίων του στρες.

Κυριάκου Παναγιώτα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Παρασκευά Ευφροσύνη, Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Ζαρογιάννης Σωτήριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Διπλωματική εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φυσιολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Interaction between the Integrated Stress Response (ISR) and the NRF2/KEAP1
(Nuclear factor erythroid derived 2-like 2/Kelch-like ECH-associated protein 1)
pathway in cancer cells: Study of the formation of stress granules**

Kyriakou Panagiota

Advisory Thesis Committee:

- Paraskeva Efrosyni, Professor of Cellular Physiology, Faculty of Medicine, University of Thessaly (supervisor)
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune disorders, Faculty of Medicine, University of Thessaly
- Zarogiannis Sotirios, Associate Professor of Physiology, Faculty of Medicine, University of Thessaly

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of master's in Physiology.

Larissa, October 2024

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Κυτταρικό στρες.....	8
1.2. Απαρτιωμένη απόκριση στο στρες (Integrated stress response - ISR).....	8
1.2.1. Κινάσες ISR - eIF2α κινάσες.....	8
1.2.2. Ο ρόλος του παράγοντα eIF2α στην έναρξη της μετάφρασης.....	11
1.2.3. Ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω του ISR.....	13
1.2.4. Ο ρόλος του ISR στις ασθένειες.....	13
1.2.5. Ο ρόλος του ISR στον καρκίνο.....	15
1.2.6. Το ISR ως θεραπευτικός στόχος.....	15
1.3. Κοκκία του στρες.....	17
1.3.1. Σύσταση των κοκκίων του στρες	17
1.3.2. Σχηματισμός κοκκίων του στρες.....	18
1.3.3. Ο ρόλος των κοκκίων του στρες σε ασθένειες.....	20
1.3.4. Ο ρόλος των κοκκίων του στρες στον καρκίνο.....	20
1.4. Το σύστημα NRF2/KEAP1.....	21
1.4.1. Δομή του παράγοντα NRF2.....	21
1.4.2. Δομή της πρωτεΐνης KEAP1.....	22
1.4.3. Ρύθμιση του μονοπατιού NRF2/KEAP1	22
1.4.4. Γονίδια στόχοι του NRF2.....	24
1.4.5. Ο ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε ασθένειες.....	25
1.4.6. Ο ρόλος μονοπατιού NRF2/KEAP1 στον καρκίνο.....	25
1.5. Αλληλεπίδραση ISR – NRF2/KEAP1.....	27
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	29
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1. Κυτταροκαλλιέργειες.....	30
3.1.1. Κατεργασία κυττάρων.....	31
3.1.2. Πάγωμα κυττάρων από καλλιέργεια και επανέναρξη καλλιιεργειών.....	31

3.1.3. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με χρωστική Trypan Blue.....	32
3.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blotting.....	33
3.2.1. Λύση κυττάρων και παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος.....	33
3.2.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.....	33
3.2.3. Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	35
3.2.4. Ανοσοαποτύπωση.....	37
3.2.5. Ανίχνευση πρωτεϊνών με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια.....	38
3.3. Πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού – Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	39
3.4. Ποσοτική ανάλυση δεδομένων μικροσκοπίας φθορισμού.....	40
3.5. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	40
3.5.1. Απομόνωση ολικού RNA από βιολογικά δείγματα.....	40
3.5.2. Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με Nanodrop.....	41
3.5.3. Παρασκευή cDNA.....	41
3.5.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time Quantitative Polymerase chain reaction RT-qPCR).....	43
3.5.5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA.....	45
3.5.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
4.1. Μελέτη της επίδρασης του Salubrinal στον παράγοντα NRF2 και στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα HeLa	47
4.2. Μελέτη της επίδρασης του Sulforaphane στον παράγοντα NRF2 και στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα HeLa	53
4.3. Μελέτη της επίδρασης του Salubrinal στον παράγοντα NRF2 και στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα A549	58
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής”, με επιβλέπουσα καθηγήτρια την κ. Παρασκευά Ευφροσύνη. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην εκπόνηση και την ολοκλήρωση της διπλωματικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από την καρδιά μου την κ. Παρασκευά, η οποία ήταν η επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τα πειράματα στο εργαστήριό της, συμμετέχοντας στο μεταπτυχιακό. Την ευχαριστώ, για την άμεση στήριξη και ενθάρρυνση που μου έδειξε, το χρόνο που αφιέρωσε στην καθοδήγησή μου κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπόγδανο, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω στο μεταπτυχιακό, ως διευθυντής του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής” και τον κ. Ζαρογιάννη για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας για την άριστη συνεργασία και τη στήριξη κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κύτταρα εκτίθενται συχνά σε συνθήκες στρες και τοξικές ουσίες, που διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία τους, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μηχανισμών αντίδρασης στο στρες, μέσω διαφορετικών οδών, για την προσαρμογή και την επιβίωσή τους. Μία τέτοια οδός είναι η απαρτιωμένη απόκριση στο στρες (Integrated stress response – ISR). Το ISR ενεργοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2α, γεγονός που οδηγεί σε γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης των mRNA του κυττάρου, με σκοπό τον επαναπρογραμματισμό της πρωτεϊνσύνθεσης και την αντιμετώπιση των δυσμενών συνθηκών για την αποκατάσταση της ισορροπίας του κυττάρου. Όταν αναστέλλεται η μετάφραση, τα μη μεταφρασμένα mRNAs και πρωτεΐνες συσσωρεύονται και σχηματίζουν κοκκία του στρες, τα οποία συμμετέχουν στην επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες στρες. Μία ακόμη απόκριση των κυττάρων είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ο NRF2 ενεργοποιεί τη μεταγραφή κυτταροπροστατευτικών γονιδίων για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Η ενεργοποίηση του ISR και του NRF2, έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, όπου οδηγούν στην ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση διαφόρων τύπων καρκίνου. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα δύο μονοπάτια ενεργοποιούνται υπό παρόμοιες συνθήκες στρες σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης του μονοπατιού NRF2/KEAP1 με το ISR και το σχηματισμό κοκκίων του στρες σε καρκινικά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές σειρές, HeLa και A549, οι οποίες επωάστηκαν με τον οξειδωτικό παράγοντα NaAsO₂, για το σχηματισμό κοκκίων του στρες, με salubrinal για την ενεργοποίηση του ISR και με sulforaphane για την ενεργοποίηση του NRF2. Με ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του ISR μέσω αύξησης των επιπέδων φωσφορυλίωσης του eIF2α. Αυξημένα επίπεδα των mRNA του NRF2 και των γονιδίων στόχων του NQO1 και TXNRD1, σε κύτταρα που επωάστηκαν με salubrinal, έδειξαν ότι το salubrinal επηρεάζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού NRF2/KEAP1. Τέλος, πειράματα ανοσοφθορισμού με αντισώματα ενάντια στην πρωτεΐνη G3BP1, έδειξαν ότι το salubrinal μείωσε τον αριθμό των κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, χωρίς να επηρεάζει το μέγεθός τους. Η επώαση των κυττάρων HeLa με sulforaphane αύξησε τον αριθμό των κοκκίων των στρες που σχηματίστηκαν. Από την άλλη σε κύτταρα A549 που επωάστηκαν με salubrinal σχηματίστηκαν κοκκία του στρες και επηρεάστηκε το μέγεθος των κοκκίων που

σχηματίστηκαν. Επομένως, τα πειράματα έδειξαν αλληλεπίδραση του ISR με το μονοπάτι NRF2/KEAP1 και επίδραση στο σχηματισμό κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa, ενώ σε κύτταρα A549 παρατηρήθηκε διαφορετική δράση των μονοπατιών.

ABSTRACT

Cells are often exposed to stressful conditions and toxic substances, which disrupt cell physiological function. As a result, cells have developed stress response mechanisms for their adaptation and survival, through different pathways. Such pathway is the Integrates Stress Response (ISR) which is activated by the phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . This leads to the attenuation of general mRNA translation in cells which helps cope with adverse conditions to reprogram their protein synthesis and restore cellular balance. When translation initiation is inhibited, untranslated mRNAs and protein aggregate to form stress granules (SGs). The formation of SGs plays a vital role in cell survival under adverse stress conditions. Another cellular response to oxidative stress is the activation of the NRF2/KEAP1 pathway. NRF2 has been found to trigger the transcription of cytoprotective genes to maintain cellular homeostasis. Activation of the ISR and NRF2 pathways has been found to play an important role in the development of various diseases, including the progression and metastasis of various types of cancer. Studies have shown that the pathways could cooperate since they are activated under similar stress conditions in different types of cancer.

The aim of this study was to investigate the effect of the ISR and the NRF2/KEAP1 pathway on the formation of SGs in cancer cells. We used HeLa and A549 cancer cell lines. Cells were incubated with NaAsO₂, a compound with oxidizing abilities, to study the formation of SGs. Cells were also incubated with salubrinal, to trigger ISR activation and sulforaphane to activate NRF2. Western immunoblotting confirmed ISR activation through an increase in eIF2 α phosphorylation levels. Cells treated with salubrinal presented with increased levels of NRF2 mRNA levels and increased mRNAs of its target genes. These results showed that salubrinal affects the activation of the NRF2/KEAP1 pathway in cancer cells. Finally, immunofluorescence using antibodies against the G3BP1 protein presented that salubrinal reduced the number of stress granules in HeLa cells compared to the control condition without affect their size though. Incubation of HeLa cells with sulforaphane increased the number of stress granules that were formed. On the other hand, incubation with salubrinal activated SGs assembly in A549 cells and affected their size. Therefore, it was shown that the ISR interacts with the NRF2/KEAP1 pathway and affect the formation of SGs in HeLa cells, whereas in A549 a different interaction was observed.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κυτταρικό στρες

Τα κύτταρα πολλές φορές υποβάλλονται σε συνθήκες στρες, από διαφορετικά εξωκυτταρικά και εσωτερικά ερεθίσματα, τα οποία επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία τους. Αυτά τα ερεθίσματα αποτελούν το οξειδωτικό, θερμικό στρες, ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS), έλλειψη θρεπτικών στοιχείων (αμινοξέων και γλυκόζης) και μεταβολικό στρες. Τέτοιες συνθήκες προκαλούν βλάβες σε διάφορα συστατικά των κυττάρων, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια των μεμβρανών και διαταράσσουν μεταβολικά μονοπάτια, επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.^[1] Έχουν αναπτύξει, λοιπόν, μηχανισμούς με τους οποίους αντιλαμβάνονται και αντιδρούν στο στρες μέσω διαφορετικών οδών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μονοπατιών για την επιβίωση των κυττάρων ή και την έναρξη κυτταρικού θανάτου για την εξουδετέρωση των κατεστραμμένων κυττάρων. Αν τα κύτταρα ενεργοποιήσουν μονοπάτια για την άμυνα ή την καταστροφή τους εξαρτάται από το είδος και τη διάρκεια του στρες και τον τύπο των κυττάρων.^[2,3]

1.2. Απαρτιωμένη απόκριση στο στρες (Integrated stress response - ISR)

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, οι οποίοι ανιχνεύουν και ενεργοποιούνται σε συνθήκες στρες.^[4,5] Ένα από τα μονοπάτια αυτά αποτελεί η απαρτιωμένη απόκριση στο στρες (Integrated stress response - ISR). Το ISR είναι ένα εξελικτικά διατηρημένο ενδοκυτταρικό δίκτυο σηματοδότησης, το οποίο έχει ως βασικό ρόλο τον επαναπρογραμματισμό της πρωτεϊνσύνθεσης για την αντιμετώπιση των δυσμενών συνθηκών και την αποκατάσταση της ισορροπίας του κυττάρου.^[6,7] Αυτό επιτυγχάνεται με τη γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης των mRNA και την ενεργοποίηση της έκφρασης ειδικών mRNA, τα οποία κωδικοποιούν γονίδια για την αντιμετώπιση του κυτταρικού στρες και την αποκατάσταση της ομοιόστασης του κυττάρου.^[8] Έτσι, επιτυγχάνεται η διατήρηση της ισορροπίας των κυττάρων.^[6]

1.2.1. Κινάσες ISR - eIF2α κινάσες

Το μονοπάτι ISR ενεργοποιείται μέσω τεσσάρων κινάσων σερίνης/θρεονίνης, τις PERK (PKR-like ER kinase), GCN2 (general control non-derepressible 2), PKR (double-stranded RNA-dependent

protein kinase) και HRI (heme-regulated eIF2 α kinase).^[9] Η ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί στη φωσφορυλίωση της σερίνης 51 (ser51) της α υπομονάδας του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 2 (eukaryotic translation initiation factor 2 – eIF2 α).^[8,10,11]

➤ PERK (PKR-like ER kinase)

Η PERK είναι μία διαμεμβρανική κινάση που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER – endoplasmic reticulum). Στην επικράτεια της κινάσης, που βρίσκεται στον αυλό του ER, είναι προσδεμένη η πρωτεΐνη GRP78 (78kDa glucose-regulated protein). Η GRP78 είναι μία πρωτεΐνη συνοδός, η οποία συμμετέχει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ. Σε συνθήκες στρες του ΕΔ, ενεργοποιείται η κινάση PERK μαζί με την GRP78, οι οποίες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, που έχουν συσσωρευτεί στον αυλό του ΕΔ, για την αποσυμφόρηση του στρες. (Εικόνα 1).^[9] Έχουν βρεθεί δύο μοντέλα ενεργοποίησης της PERK κινάσης. Στο πρώτο μοντέλο, η συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οδηγεί στην απομάκρυνση της GRP78 από την PERK, με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση της PERK και την ενεργοποίησή της. Από την άλλη, η PERK μπορεί να ενεργοποιηθεί με την απευθείας πρόσδεση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στην επικράτεια που βρίσκεται στον αυλό του ER.^[8,11,12]

➤ GCN2 (general control non-derepressible 2)

Η κινάση GCN2 διαθέτει μία ρυθμιστική επικράτεια που παρουσιάζει ομολογία με τη συνθετάση των histidyl-tRNA.^[6] Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, έλλειψης αμινοξέων ή θρεπτικών στοιχείων η κινάση ενεργοποιείται με την πρόσδεση απακυλιωμένων μεταφορικών RNAs - tRNAs (Εικόνα 1).^[8,9]

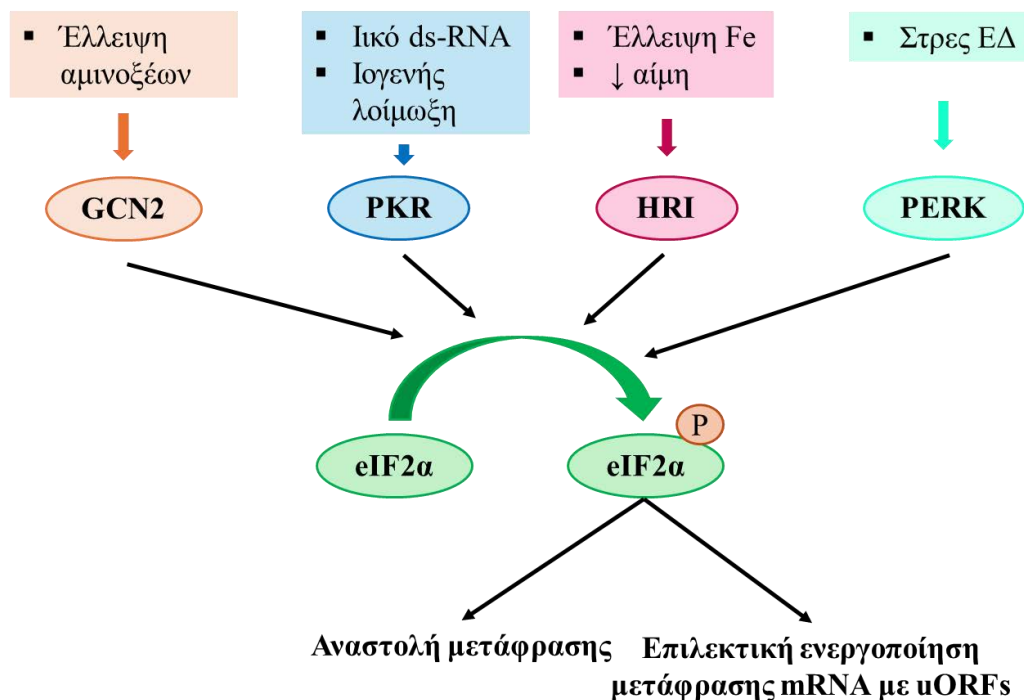
➤ PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase)

Η PKR ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων από δίκλωνο RNA (dsRNA), μέσω μίας επικράτειας πρόσδεσης δίκλωνου RNA (double-stranded RNA binding domain).^[6,9] Με την ενεργοποίηση μονομερή κινάσης PKR διμερίζονται μέσω της C-τελικής επικράτειας, το οποίο οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση στη θέση T446 (θρεονίνη 446). Η ενεργοποίηση της κινάσης έχει ως

αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνوسύνθεσης των ιών και του κυττάρου λόγω φωσφορυλίωσης του eIF2α (Εικόνα 1).^[8,9]

➤ HRI (heme-regulated eIF2α kinase)

Έχει βρεθεί ότι η κινάση HRI εκφράζεται στα κύτταρα της ερυθράς σειράς, όπου συμμετέχει στη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων κατά την ερυθροποίηση.^[6] Όταν τα επίπεδα της συγκέντρωσης της αίμης είναι χαμηλά, προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από τη συσσώρευση τοξικών συμπλόκων σφαιρίνης, καθώς συνδέει τη μετάφραση των mRNAs της σφαιρίνης με τη διαθεσιμότητα του κυττάρου σε αίμη, ρυθμίζοντας την παραγωγή αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα (Εικόνα 1).^[6,9] Η HRI ενεργοποιείται μέσω δύο επικρατειών πρόσδεσης της αίμης που βρίσκονται στο N-τελικό άκρο και την περιοχή εισαγωγής κινάσης (kinase insertion domain). Η κινάση ενεργοποιείται με την πρόσδεση της αίμης στις 2 επικράτειες στο N-τελικό άκρο ενώ, η πρόσδεση της αίμης στην περιοχή εισαγωγής κινάσης οδηγεί στην αναστολή της δράσης της.^[6,8]



Εικόνα 1: Κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον eIF2α (GCN2, PKR, HRI και PERK) για την απενεργοποίησή του κατά την έναρξη του ISR.

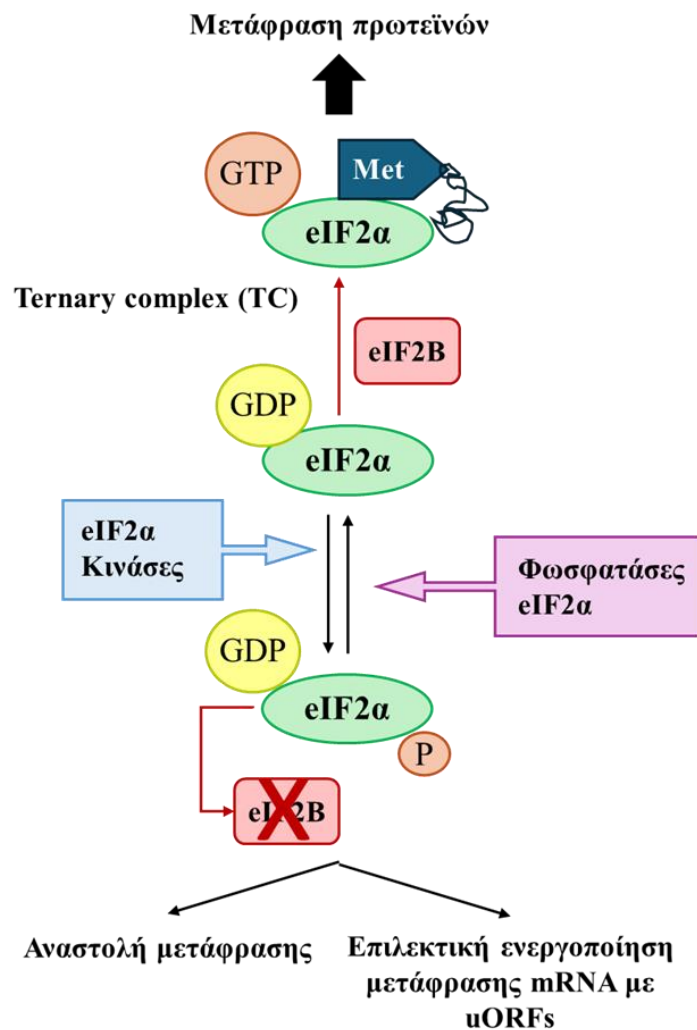
1.2.2. Ο ρόλος του παράγοντα eIF2α στην έναρξη της μετάφρασης

Η διαδικασία της μετάφρασης είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της 80S ριβοσωμικής υπομονάδας, ενός mRNA και του RNA έναρξης της μετάφρασης Met-tRNA_i (initiator methionyl-transfer RNA). Το Met-tRNA_i αναγνωρίζει ένα κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (AUG) στην αρχή ενός ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (open reading frame - ORF). Στη συνέχεια, η 80S ριβοσωμική υπομονάδα επιτρέπει τη σύνθεση της πρωτεΐνης, με την πρόσδεση ενός tRNA επιμήκυνσης (elongator aminoacyl-tRNA) στη θέση A της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας, το οποίο αναγνωρίζει τα διπλανά κωδικόνια. Πιο συγκεκριμένα, το Met-tRNA_i συνδέεται με την 80S ριβοσωμική υπομονάδα, μέσω της αλληλεπίδρασης με ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2 και GTP.^[13] Ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF2 είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τρεις υπομονάδες α, β και γ (eIF2αβγ), το οποίο προσδένεται με το Met-tRNA_i και GTP και σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο (ternary complex - TC). Το TC αναγνωρίζει τη 40S υπομονάδα του ριβοσώματος και προσδένεται με άλλους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIF1, eIF1A και eIF3), σχηματίζοντας το 43S preinitiation complex (PIC).^[7,10]

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το PIC προσδένεται, με τη βοήθεια του παράγοντα eIF4, στην m7G cap περιοχή στο 5' άκρο των ευκαρυωτικών mRNAs. Ο eIF4 σκανάρει το mRNA από την 5'UTR μέχρι την αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης.^[14] Με την αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης (AUG) στο mRNA, και το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης 48S, ενεργοποιείται η δράση GTPασης του παράγοντα eIF2, με υδρόλυση του GTP σε GDP, με τη δράση του παράγοντα ενεργοποίησης GTPασης, eIF5 και του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης eIF2B. Το σύμπλοκο eIF2-GDP και άλλοι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIF1, eIF5, eIF2-GDP και eIF3) απομακρύνονται από το Met-tRNA_i^{Met}. Η 60S υπομονάδα του ριβοσώματος προσδένεται στο mRNA, βήμα που σηματοδοτεί τη λήξη της διαδικασίας έναρξης της μετάφρασης και ακολουθείται από τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων.^[13]

Σε συνθήκες στρες το σύμπλοκο eIF2-GDP απομακρύνεται από το ριβόσωμα και επιτρέπεται στον παράγοντα eIF2 να συμμετέχει ξανά στη διαδικασία έναρξης της μετάφρασης. Για να γίνει αυτό είναι αναγκαία η ανταλλαγή του GDP, προσδεμένου στον eIF2 με GTP από τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης eIF2B. Οι κινάσες HRI, PERK, PKR και GCN2, που ενεργοποιούνται κατά την το ISR, φωσφορυλιώνουν την α υπομονάδα του παράγοντα eIF2, όπως αναφέρθηκε. Ο φωσφορυλιωμένος eIF2α (peIF2α) λειτουργεί ως αναστολέας του παράγοντα eIF2B,

με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η ανταλλαγή του GDP με GTP. Συνεπώς, παρουσιάζεται συνεχής μείωση των ενεργών συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης και τελικά, γενικευμένη αναστολή της πρωτεϊνوسύνθεσης.^[7,8] Από την άλλη, υπό αυτές τις συνθήκες ενεργοποιείται η μετάφραση mRNAs που διαθέτουν ένα uORF (short upstream open reading frame) στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR). Τα mRNA που μεταφράζονται σε αυτές τις συνθήκες στρες κωδικοποιούν για πρωτεΐνες όπως, η aminoacyl-tRNA συνθετάση (EPRS), ο μεταφορέας θετικά φορτισμένων αμινοξέων (CAT1), η φωσφατάση GADD34, που λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού ISR και οι μεταγραφικοί παράγοντες ATF4, 5, CHOP και CEBPB (Εικόνα 2).^[5,7,8]



Εικόνα 2: Διαδικασία φωσφορυλίωσης του eIF2α από τις 4 κινάσες. Αναστολή της μετάφρασης και επιλεκτική ενεργοποίηση της μετάφρασης mRNAs με uORFs. Η γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης επιτυγχάνεται με την αναστολή σχηματισμού του TC.

Όταν τα κύτταρα απαλλάσσονται από τους στρεσογόνους παράγοντες, οι κινάσες του ISR απενεργοποιούνται. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω της δράσης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (protein phosphatase 1 - PP1), η οποία λειτουργεί σε σύμπλοκο με τις ρυθμιστικές υπομονάδες CReP (constitutive repressor of eIF2a phosphorylation) ή τη φωσφατάση GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein).^[7,8,9] Ο παράγοντας CReP εκφράζεται συνεχώς σε αντίθεση με τον GADD34, του οποίου η έκφραση ενεργοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα ATF4.^[7] Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο CReP σε σύμπλοκο με τον PP1 διατηρεί χαμηλά τα επίπεδα του p-eIF2α, συμμετέχοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης. Η ενεργοποίηση της φωσφατάσης GADD34 λειτουργεί ως ένας μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης για την απενεργοποίηση του ISR, συμβάλλοντας στην επιβίωση των κυττάρων.^[9] Και οι δύο παράγοντες σε σύμπλοκο με την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 οδηγούν σε αποφωσφορυλίωση του eIF2, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η πρόσδεση του παράγοντα με GTP και η συμμετοχή του ξανά στη διαδικασία έναρξης της μετάφρασης.^[7]

1.2.3. Ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω του ISR

Σε συνθήκες παρατεταμένου ή υπερβολικού στρες, το ISR ενεργοποιεί μονοπάτια απόπτωσης για την εξάλειψη των κατεστραμμένων κυττάρων.^[6] Ο βασικός παράγοντας για την ενεργοποίηση της απόπτωσης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP (C/EBP homologous protein), ο οποίος ενεργοποιεί τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες BIM και PUMA και τους υποδοχείς DR4 και 5 (death receptor 4 και 5). Παράλληλα, μειώνει τη δράση των αντιαποπτωτικών παραγόντων MCL1 (myeloid cell leukemia-1) και Bcl2 (B-cell lymphoma 2). Ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP ενεργοποιεί τη μετατόπιση και δέσμευση του παράγοντα απόπτωσης Bcl2 με τον παράγοντα ASPP2 στον πυρήνα των κυττάρων, με αποτέλεσμα την εκκίνηση της αυτοφαγίας και οι πρωτεΐνες BIM και PUMA αλληλοεπιδρούν με το p53 για την ενεργοποίηση της απόπτωσης.^[7]

1.2.4. Ο ρόλος του ISR στις ασθένειες

Μεταλλάξεις στα στοιχεία του μονοπατιού ISR έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών, όπως ασθένειες του μεταβολισμού, πνευμονοπάθειες και ασθένειες του νευρικού συστήματος.^[5] Στις μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το ISR συγκαταλέγονται μεταλλάξεις

απενεργοποίησης του γονιδίου της πρωτεΐνης CreP, οι οποίες σχετίζονται με νοητική αναπηρία, κοντό ανάστημα και διαβήτη στους ασθενείς. Οι μεταλλάξεις αυτές, επηρεάζουν τη θέση πρόσδεσης PP1 στην πρωτεΐνη CreP, σταθεροποιώντας το σύμπλοκο της φωσφατάσης CreP-PP1, αυξάνοντας, έτσι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του eIF2α. Άλλες μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με γνωστική δυσλειτουργία και οδηγούν στη μείωση σχηματισμού των τριμερών συμπλόκων (TC), ενεργοποιώντας τα μονοπάτια του ISR. Εκτός από τις παραπάνω, μεταλλάξεις που οδηγούν στην απενεργοποίηση των μονοπατιών του ISR, έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με το σύνδρομο Wolcott-Rallison (WRS). Οι ασθενείς αυτοί, παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της κινάσης PERK και χαρακτηρίζονται από πρόωμη εμφάνιση διαβήτη και πολλαπλή επιφυσιική δυσπλασία (Multiple epiphyseal dysplasia - MED). Η παθολογία της ασθένειας είναι αποτέλεσμα της αδυναμίας των ασθενών να αντιμετωπίσουν το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου λόγω συσσώρευσης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών εξαιτίας της απενεργοποίησης του ISR. Επίσης, μεταλλάξεις του γονιδίου της κινάσης GCN2, που καταστέλλουν τη δράση της κατά την αγγειογένεση, έχουν ταυτοποιηθεί σε μία σπάνια μορφή πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων.^[6]

Από την άλλη, έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση του ISR ανεξάρτητα από τη φωσφορυλίωση του eIF2α, σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. Στους ασθενείς που πάσχουν από λευκοεγκεφαλοπάθεια, με εξαφάνιση λευκής ουσίας (Vanishing White Matter - VWM) είναι συνεχώς ενεργοποιημένο το ISR, ανεξάρτητα από τη φωσφορυλίωση του eIF2α, λόγω μεταλλάξεων στις 5 υπομονάδες του παράγοντα eIF2B που καταστέλλουν τη δράση του, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η ανταλλαγή του GDP με GTP και τελικά, να παρατηρείται αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης.^[5,14] Ομοίως, ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο διανοητικής αναπηρίας συνδεδεμένο με το χρωμόσωμα X (MEHMO), έχουν συνεχώς ενεργοποιημένο το μονοπάτι ISR λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τη γ υπομονάδα του συμπλόκου eIF2αβγ. Έτσι, αναστέλλεται η πρόσδεση των Met-tRNAi^{Met} στον eIF2, οδηγώντας στη μη φυσιολογική διαφοροποίηση των κυττάρων των ασθενών.^[5] Τα μονοπάτια του ISR έχουν βρεθεί ότι ενεργοποιούνται και σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease), η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease), η νόσος Huntington, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), στο σύνδρομο Down, στη νόσο Charcot-Marie-Tooth και σε άλλους τραυματισμούς του εγκεφάλου. Το ISR ενεργοποιείται για τον επαναπρογραμματισμό της πρωτεϊνσύνθεσης και τη ρύθμιση της ομοιόστασης, εξαιτίας των

δυσμενών συνθηκών (συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, οξειδωτικό στρες και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων) των κυττάρων στις παθήσεις αυτές.^[6]

1.2.5. Ο ρόλος του ISR στον καρκίνο

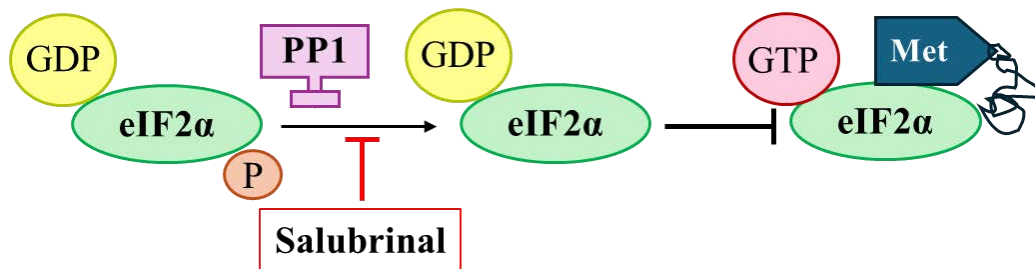
Τα καρκινικά κύτταρα, σε στερεούς όγκους έρχονται αντιμέτωπα με δυσμενείς συνθήκες που επικρατούν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (π.χ. υποξία, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων).^[11,16] Οι συνθήκες αυτές ασκούν επιπλέον πίεση στο δίκτυο σύνθεσης πρωτεϊνών των κυττάρων, εξαιτίας αύξησης στη σύνθεση πρωτεϊνών στους καρκινικούς όγκους.^[11] Το ISR, λοιπόν ενεργοποιείται για τον έλεγχο και τη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και την αποκατάσταση της ισορροπίας.^[6] Επομένως, το μονοπάτι ISR φαίνεται να είναι συχνά ενεργοποιημένο στα διάφορα στάδια της εμφάνισης, της εξέλιξης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων.^[11]

Οι κινάσες PKR, PERK και GCN2 του ISR έχουν βρεθεί να παίζουν κύριο ρόλο στα στάδια εμφάνισης και εξέλιξης των καρκινικών όγκων. Η δράση του ISR επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών ATF4 και CHOP, που αποτελούν κύριους ρυθμιστές των μονοπατιών επιβίωσης και απόπτωσης των κυττάρων. Σε καρκινικά κύτταρα η ενεργοποίηση της κινάσης PERK προωθεί την καρκινογένεση. Επιπλέον, η κινάση GCN2 έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των αμινοξέων στα καρκινικά κύτταρα, καθώς καρκινικοί όγκοι με έλλειψη των πρωτεϊνών GCN2 ή ATF4 φαίνεται να μεγαλώνουν πιο αργά από τους φυσιολογικούς.^[16]

1.2.6. Το ISR ως θεραπευτικός στόχος

Τα στοιχεία του μονοπατιού ISR μπορούν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους, ανάλογα με τις μεταλλάξεις και τον τύπο κυττάρων κάθε διαφορετικού τύπου καρκίνου. Η ενεργοποίηση του ISR μπορεί να γύρει την ισορροπία των καρκινικών κυττάρων προς την ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών, καθιστώντας το ιδανικό χημειοθεραπευτικό στόχο κατά του καρκίνου, οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα προς απόπτωση. Ωστόσο, υπάρχει αυξημένη δυσκολία στην ειδική στόχευση των στοιχείων του ISR, εξαιτίας της πολυπλοκότητας της ρύθμισης τους καθώς συμμετέχουν στην ενεργοποίηση μονοπατιών για την επιβίωση αλλά και την απόπτωση των κυττάρων.^[6,17]

Για τη θεραπευτική στόχευση του ISR έχουν βρεθεί φάρμακα ενεργοποιητές ή αναστολείς του μονοπατιού, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Φαρμακευτική ενεργοποίηση του ISR μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενεργοποίησης των eIF2α κινάσων για τη φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α, αλλά και μέσω αναστολής της φωσφατάσης αποφωσφορυλίωσης του eIF2α. Ενώσεις που προωθούν τη φωσφορυλίωση του eIF2α περιλαμβάνουν ενεργοποιητές της κινάσης HRI (π.χ. BTdCPU), της PERK (π.χ. CCT020312), της GCN2 (π.χ. ασπαραγινάση) και της κινάσης PKR (π.χ. BEPP monohydrochloride).^[9] Έχουν βρεθεί και αναστολείς της φωσφατάσης του eIF2α, με πιο γνωστό το Salubrinal. Το Salubrinal δρα ανεξάρτητα των τεσσάρων κινάσων του ISR και αποτελεί αναστολέα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1), που συμμετέχει στην αποφωσφορυλίωση του eIF2α, επειδή εμποδίζει την πρόσδεση του GADD34 στην PP1 (Εικόνα 3).^[7,9] Έχει βρεθεί να παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα της νόσου Αλτσχάιμερ και της νόσου Huntington.^[9]



Εικόνα 3: Το Salubrinal θεωρείται αναστολέας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1), για τη φαρμακευτική ενεργοποίηση του ISR.

Από την άλλη αναστολείς του ISR έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και διαβήτη. Ορισμένους από αυτούς αποτελούν οι αναστολείς GSK2606414 και GSK2656157, οι οποίοι εμποδίζουν την αυτοφωσφορυλίωση της PERK, διατηρώντας την σε ανενεργή κατάσταση. Άλλοι, αναστολείς μικρών μορίων έχουν βρεθεί να ανταγωνίζονται την πόσδεση του ATP, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των κινάσων του ISR. Πιο αναλυτικά, το C16 εμποδίζει την αυτοφωσφορυλίωση της PKR, η αμινοπυραζολινδάνη (Aminopyrazolindane) την κινάση HRI και το SP600125 αναστέλλει την ενεργοποίηση της GCN2.^[9] Πιο μελετημένος είναι ο αναστολέας του ISR, ISRIB (integrated stress response inhibitor), ο οποίος διευκολύνει το σχηματισμό του ενεργού eIF2B.^[7] Το ISRIB αναστέλλει τις συνέπειες φωσφορυλίωσης

του eIF2α, οδηγώντας, έτσι, στη μειωμένη σύνθεση του ATF4. Με αυτή του τη δράση, συμμετέχει στην αποκατάσταση της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συνθήκες χρόνιου στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, μειώνοντας την ικανότητα προσαρμογής των κυττάρων στις συνθήκες αυτές. Επίσης, έχει βρεθεί να αποτρέπει το σχηματισμό κοκκίων του στρες λόγω φωσφορυλίωσης του eIF2α.

Επομένως, η ενεργοποίηση του ISR παίζει βασικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες, λόγω της συμμετοχής του στην ενεργοποίηση μονοπατιών για την επιβίωση και το θάνατο των κυττάρων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η στόχευση του ISR παρουσιάζει ποικίλες παρενέργειες στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων και στους διαφορετικούς τύπους ασθενειών.^[9]

1.3. Κοκκία του στρες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε συνθήκες στρες φωσφορυλιώνεται ο παράγοντας eIF2α, με αποτέλεσμα τη γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης. Τα μη μεταφρασμένα mRNAs συσσωρεύονται και σχηματίζουν συσσωματώματα, τα οποία ονομάζονται κοκκία του στρες (stress granules). Τα κοκκία του στρες συμμετέχουν στην προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες στρες καθώς συσσωρεύουν πρωτεΐνες και δεσμεύουν μόρια απαραίτητα για την αντιμετώπιση αυτών των συνθηκών.^[18,19,20]

1.3.1. Σύσταση των κοκκίων του στρες και πρωτεΐνες

Τα κοκκία του στρες είναι μη μεμβρανικά, κυτταροπλασματικά οργανίδια, τα οποία σχηματίζονται όταν συσσωρεύονται διάφορα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (mRNPs), πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA (RBPs), μη μεταφραζόμενα RNAs, ριβοσωμικές υπομονάδες, μεταγραφικοί παράγοντες και διάφορες άλλες μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες.^[21,22,23] Τα συστατικά των SGs σχηματίζουν μία πυκνή δομή πυρήνα, που περιβάλλεται από μία πιο ασταθή δομή. Έτσι, τα SGs παρουσιάζουν μία διφασική κατανομή στοιχείων, με διαφορετικές πυκνότητες (*Εικόνα 4*).^[24] Οι πρωτεΐνες των κοκκίων του στρες διαθέτουν περιοχές μεθυλίωσης αργινίνης - γλυκίνης RGG (arginine-glycine or arginine-glycine-glycine), IDPs (protein intrinsically disordered regions / intrinsically disordered proteins), LCDs (low-complexity domains) και PrLDs (prion-like domains), που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και με μόρια και συμμετέχουν στη φάση υγρού διαχωρισμού - LLPS (Liquid-liquid phase separation).^[25,26] Στις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κοκκία του στρες ανήκουν

μεταγραφικοί παράγοντες, RBPs, στοιχεία της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας, TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen-1), TDP43 (TAR DNA-binding protein-43) και G3BP1 (Ras-GTPaseactivating protein SH3-domain-binding protein 1).^[18,23,26]

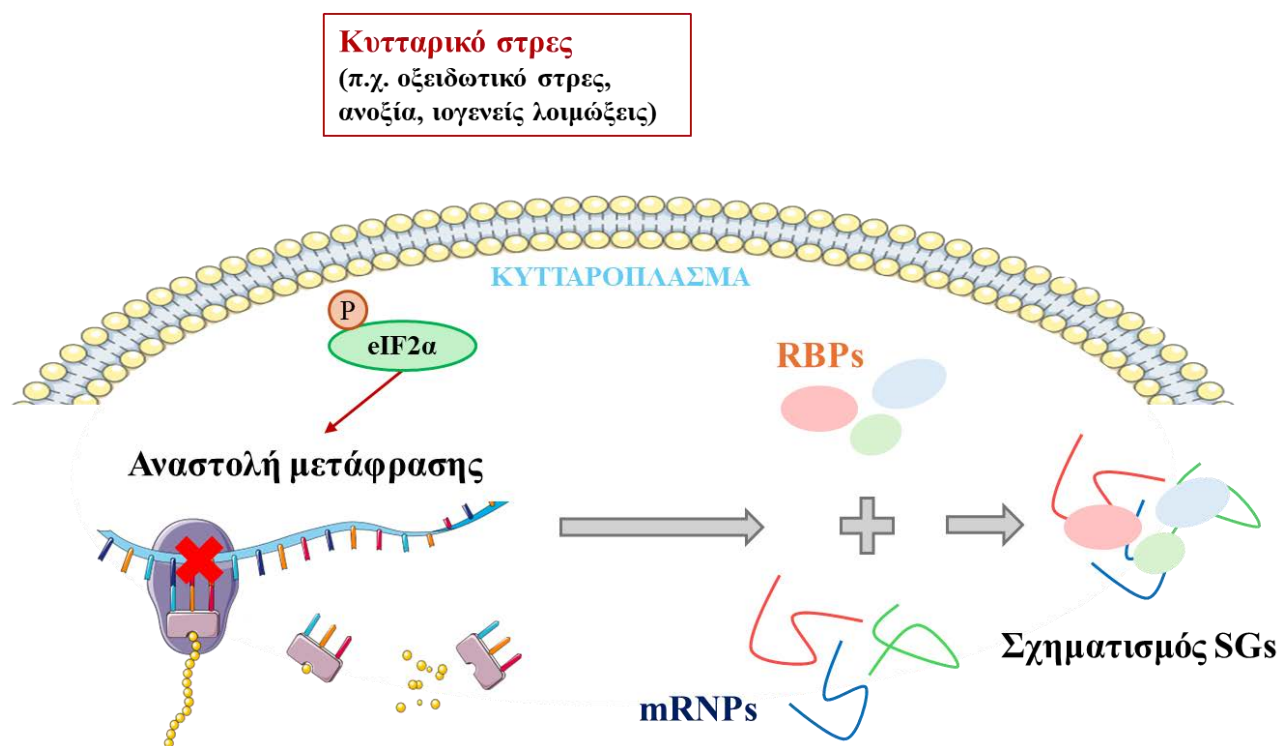
Η G3BP1 είναι μία από τις βασικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο εσωτερικό των κοκκίων του στρες. Ρυθμίζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεϊνών – RNA, μέσω της επικράτειας που μοιάζει με τον παράγοντα πυρηνικής μεταφοράς 2, NTF2L (nuclear transport factor 2-like domain) και την επικράτεια πρόσδεσης RNA, RBD (RNA-binding domain). Η συσσώρευση της G3BP1 στα SGs καθορίζεται από δύο ρυθμιστικά στοιχεία των SGs, την Caprin1 (cell cycle associated protein 1) και την πεπτιδάση USP10 (ubiquitin specific peptidase 10). Η πρόσδεση της caprin1 ανταγωνίζεται την πρόσδεση της USP10 καθώς η caprin1 προωθεί το σχηματισμό των SGs, ενώ η πρόσδεση της USP10 αναστέλλει τη διαδικασία σχηματισμού. Μελέτες έδειξαν ότι η caprin1 αλληλοεπιδρά με την RBD, μέσω της C-τελικής περιοχής, για την ενίσχυση της πρόσδεσης των RNAs στα κοκκία του στρες. Από την άλλη, η USP10 δε διαθέτει περιοχή RBD, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την περαιτέρω συσσώρευση RNAs στα κοκκία του στρες.^[27]

Τα κοκκία του στρες διατηρούν τη διαμόρφωσή τους μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, RNA-RNA, RNA-πρωτεϊνών και άλλων αλληλεπιδράσεων.^[24,28] Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών των κοκκίων του στρες εξαρτώνται από διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση, η σουμυλίωση και η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, που επηρεάζουν το σχηματισμό των SGs. Ένα μεγάλο ποσοστό των mRNAs των SGs έχουν υποστεί m⁶A μεθυλίωση (N⁶-adenosine methylation) κοντά στο κωδικόνιο λήξης ή στην 3' UTR. Ένα άλλο παράδειγμα όπου μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζουν τη δράση πρωτεϊνών, αποτελεί η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης G3BP1, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό των SGs καθώς δεν μπορεί να πολυμεριστεί.^[28,29]

1.3.2. Σχηματισμός κοκκίων του στρες

Ο σχηματισμός των κοκκίων του στρες εκκινείται σε συνθήκες κυτταρικού στρες όπως η έλλειψη γλυκόζης, το θερμικό σοκ, το χημικό, οξειδωτικό και οσμωτικό στρες, συνθήκες ανοξίας, οι ιογενείς λοιμώξεις και η UV ακτινοβολία.^[25] Είναι μία διαδικασία διαχωρισμού υγρή φάσης που ονομάζεται liquid-liquid phase separation (LLPS), όπου στις συνθήκες στρες, φωσφορυλιώνεται ο

παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF2α, με αποτέλεσμα την γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης, όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω.^[19,26,30] Στη συνέχεια, τα μονομερή των μη μεταφρασμένων mRNPs συσσωρεύονται και σχηματίζουν ολιγομερή και πολυμερή μέσω συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων. Ο σχηματισμός των κοκκίων του στρες εξαρτάται από ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές συνθήκες, οι οποίες περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση των μορίων στο κύτταρο.^[20] Συνεπώς, η σύσταση των SGs και η αναλογία RNA-πρωτεϊνών εξαρτάται από τους διαφορετικούς τύπους στρες, το χρόνο έκθεσης στις συνθήκες κυτταρικού στρες και τον τύπο του κυττάρου.^[31] Έχει παρατηρηθεί φαρμακευτική ενεργοποίηση του σχηματισμού των SGs, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αρσενικόδες νάτριο NaAsO₂ (sodium arsenite), το οποίο προκαλεί οξειδωτικό στρες και ενεργοποιεί το σχηματισμό των SGs, με γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης των mRNAs.^[18,21,29]



Εικόνα 4: Σχηματισμός SGs, λόγω αναστολής της μετάφρασης σε συνθήκες στρες.

Όταν τα βλαβερά ερεθίσματα απομακρύνονται, τα SGs διαχωρίζονται στα μονομερή στοιχεία τους, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της μετάφρασης των mRNAs των κυττάρων.^[20] Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση των RBPs, μέσω ATP-εξαρτώμενων μηχανισμών. Τέτοιους μηχανισμούς

αποτελούν η αναστολή των DNA/RNA ελικάσων που σταθεροποιούν τα SGs και η ενεργοποίηση μονοπατιών αυτοφαγίας για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών τους SGs.^[31]

1.3.3. Ο ρόλος των κοκκίων του στρες σε ασθένειες

Ανωμαλίες στο σχηματισμό των κοκκίων του στρες, όπως σχηματισμός μειωμένου αριθμού κοκκίων, ή διαρκής σχηματισμός τους έχει συνδεθεί με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η οικογενής αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (familial amyotrophic lateral sclerosis - ALS), η νόσος Huntington και η νόσος Αλτσχάιμερ αλλά και διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Στις ιογενείς λοιμώξεις, ενεργοποιείται η φωσφορυλίωση του eIF2α από την κινάση PKR, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασης των ιικών mRNAs και των mRNAs του κυττάρου.^[22] Για την αποφυγή της αναστολής της μετάφρασης πολλοί ιοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τη διάσπαση πρωτεϊνών (όπως η G3BP1) των SGs μέσω μίας ιικής πρωτεάσης. Επίσης, στο σύνδρομο εύθραυστου X (fragile X syndrome) έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη πρόσδεσης του mRNA, FMRP, που οδηγούν στη μη σωστή διαμόρφωση των SGs. Η νόσος Αλτσχάιμερ και το σύνδρομο ALS έχουν χαρακτηριστεί από παθολογικά συσσωματώματα πρωτεϊνών, τα οποία περιέχουν βασικές πρωτεΐνες για το σχηματισμό των SGs, όπως η TIA1, η TDP43 και η G3BP1.^[21]

1.3.4. Ο ρόλος των κοκκίων του στρες στον καρκίνο

Σχηματισμός κοκκίων του στρες έχει παρατηρηθεί να ενισχύεται σε διάφορους τύπους καρκίνων, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του στομάχου του παγκρέατος και του πνεύμονα. Οι δυσμενείς συνθήκες στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών όγκων, όπως η υποξία και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οδηγούν στην υπερέκφραση πρωτεϊνών των SGs. Ο σχηματισμός των SGs προωθεί την επιβίωση, την ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, ενισχύοντας την κυτταροπροστατευτική λειτουργία των καρκινικών όγκων ενάντια σε χημειοθεραπείες και αντικαρκινικά φάρμακα.^[18] Τα κοκκία του στρες ρυθμίζουν το mTOR (mammalian target of rapamycin) και MAPK (mitogen-activated protein kinase), μονοπάτια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των κυττάρων και την επιβίωσή τους.^[19] Επιπλέον, η πρωτεΐνη G3BP1 έχει βρεθεί να προωθεί την ανάπτυξη, την εξέλιξη, τη μετάσταση των καρκινικών όγκων αλλά και την αντίσταση των κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.^[31] Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η

αναστολή σχηματισμού των SGs επηρεάζει την εξέλιξη των όγκων και αυξάνει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αντιπροσωπεύοντας μία πολλά υποσχόμενη θεραπεία για τον καρκίνο.^[29]

1.4. Το σύστημα NRF2/KEAP1

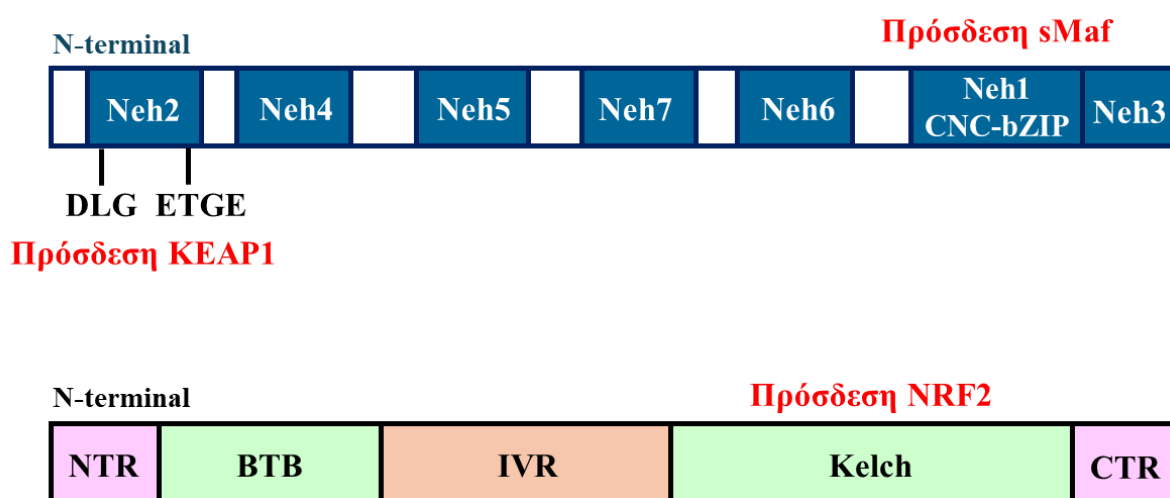
Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται μηχανισμοί απόκρισης για την προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων, όπως το μονοπάτι NRF2/KEAP1 (Nuclear factor erythroid derived 2-like 2/Kelch-like ECH-associated protein 1), το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων για την προστασία των κυττάρων στις συνθήκες αυτές. Οι κύριες πρωτεΐνες του συστήματος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2) και η πρωτεΐνη KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein).^[32,33]

1.4.1. Δομή του παράγοντα NRF2

Ο NRF2 είναι μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας cap'n'collar (CNC) basic-region leucine zipper, που αποτελείται από 589 αμινοξέα. Η δράση του καθορίζεται από 7 εξελικτικά διατηρημένες επικράτειες, τις Neh1-7. Η επικράτεια Neh1 έχει μία βασική περιοχή ομολογίας CNC και ένα μοτίβο bZip (δομή φερμουάρ λευκίνης L-Zip). Παρουσιάζει ομολογία για τους μεταγραφικούς παράγοντες NRF1/2/3, p45, BACH1 και BACH2.^[32] Συμμετέχει στην αναγνώριση του DNA και το διμερισμό του NRF2 με τις μικρές πρωτεΐνες της οικογένειας του μυοαπονευρωτικού ινοσαρκώματος, sMaf (small musculoaponeurotic fibrosarcoma). Η επικράτεια Neh7 αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης αρνητικών ρυθμιστών του NRF2, ενώ οι επικράτειες Neh4 και 5 συμμετέχουν στην πρόσδεση του NRF2 με τις πρωτεΐνες CBP (cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein) και RAC3 (receptor-associated coactivator 3), για την ενεργοποίησή του. Η Neh6 ενεργοποιεί το μονοπάτι αποικοδόμησης του NRF2 μέσω των β-TrCP πρωτεϊνών (β-transducin repeat-containing protein). Τέλος, η Neh2, που βρίσκεται κοντά στο αμινοτελικό άκρο (N-terminal), μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του NRF2 με την πρωτεΐνη KEAP1. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω δύο περιοχών ETGE και DLG στην Neh2 επικράτεια, οι οποίες μαζί με μία υδρόφιλη περιοχή 7 καταλοίπων λυσίνης συμμετέχουν στην εξαρτώμενη από τον KEAP1 πολυουβικουτίνωση και αποικοδόμηση του NRF2 (Εικόνα 5).^[33,34]

1.4.2. Δομή της πρωτεΐνης KEAP1

Η πρωτεΐνη KEAP1 αποτελείται από 624 αμινοξέα και 5 επικράτειες. Η επικράτεια BTB (Tramtrack and Bric a brac domain) βρίσκεται δίπλα το αμινοτελικό άκρο και ενεργοποιεί τον ομοδιμερισμό του KEAP1 και την πρόσδεσή του με την πρωτεΐνη cullin3 (cul3). Στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται η επικράτεια Kelch που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του KEAP1 με την Neh2 επικράτεια του NRF2. Η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων ρυθμίζεται περαιτέρω από κατάλοιπα κυστεΐνης της πρωτεΐνης KEAP1, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις στα κατάλοιπα αυτά να επακολουθούν τη δυσλειτουργία του συστήματος NRF2/KEAP1. Τέλος, οι δύο επικράτειες διαχωρίζονται από μία ενδιάμεση περιοχή IVR (Εικόνα 5).^[32,33]

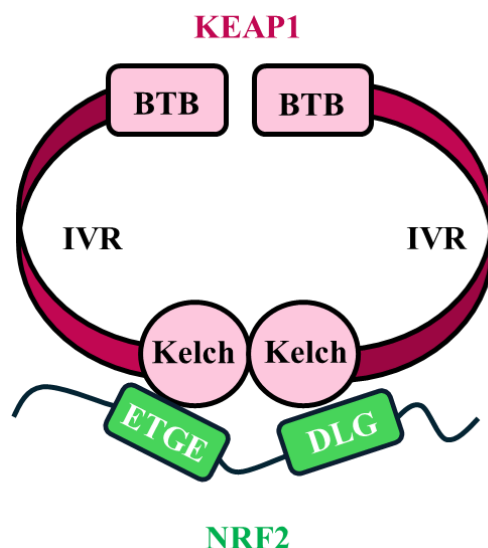


Εικόνα 5: Δομή παραγόντων NRF2 και KEAP1. Περιοχές του NRF2: Neh2 περιοχή αλληλεπίδρασης με τον KEAP1 και Neh1 σταθεροποίηση, είσοδο στον πυρήνα και ενεργοποίηση, Neh3,4,5,6,7. Περιοχές του KEAP1: Kelch (πρόσδεση με τον NRF2), BTB, IVR.

1.4.3. Ρύθμιση του μονοπατιού NRF2/KEAP1

Ο παράγοντας NRF2 είναι μία ασταθής πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται διαρκώς και σε φυσιολογικές συνθήκες η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα, ενώ ένα μικρό ποσοστό του παράγοντα εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην επιβίωση και τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων.^[35] Το βασικό σύστημα ρύθμισης του μονοπατιού περιλαμβάνει την αναγνώριση των δύο επικρατειών ETGE και DLG του NRF2 από την επικράτεια Kelch του KEAP1, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με

δύο μόρια του KEAP1 και ένα μόριο του NRF2 (Εικόνα 6). Σε αυτή τη διαμόρφωση ο NRF2 αναγνωρίζεται από το σύμπλοκο Cul3/Rbx1 της E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης και οδηγείται σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, ενώ ο KEAP1 είναι ελεύθερος να προσδεθεί ξανά σε νέο μόριο NRF2 στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 7Α).^[34,35,36]

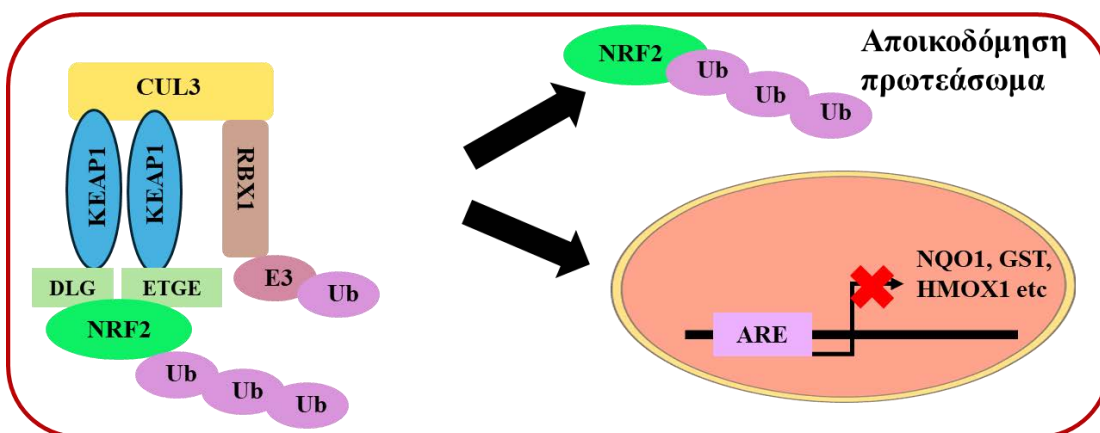


Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση ομοδιμερισμού KEAP1 σε σύμπλοκο με τον NRF2. Βασικές επικράτειες αλληλεπίδρασης η Kelch επικράτεια του KEAP1 και ETGE και DLG επικράτειες στον NRF2.

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ο KEAP1 απενεργοποιείται και ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 εισέρχεται στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Κατάλοιπα κυστεΐνης στην IVR και στην επικράτεια BTB, παίζουν βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του KEAP1 με τον NRF2. Τέτοια κατάλοιπα που συμμετέχουν στην παραπάνω αλληλεπίδραση είναι οι Cys273 και Cys288 στην IVR και το κατάλοιπο Cys151 στην BTB, τα οποία λειτουργούν ως αισθητήρες του οξειδωτικού στρες και μεταβάλλουν την αναδιαμόρφωση του KEAP1. Κύριος αισθητήρας του οξειδωτικού στρες είναι το κατάλοιπο Cys151, το οποίο, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ανακόπτει την αλληλεπίδραση του KEAP1 με την cul3 και οδηγεί στην απελευθέρωση του NRF2 και την είσοδό του στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων στόχων του (Εικόνα 7Β).^[37,38]

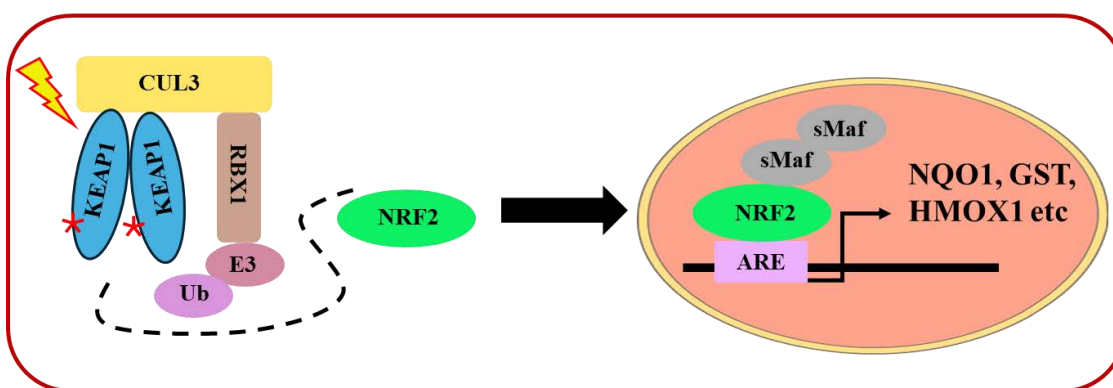
A)

Φυσιολογικές συνθήκες



B)

Συνθήκες οξειδωτικού στρες



Εικόνα 7: Ρύθμιση ενεργοποίησης του μονοπατιού NRF2/KEAP1 και γονίδια στόχοι του NRF2. A) Φυσιολογικές συνθήκες και B) Συνθήκες οξειδωτικού στρες.

1.4.4. Γονίδια στόχοι του NRF2

Στα γονίδια στόχοι του NRF2 περιλαμβάνονται γονίδια που σχετίζονται με μεταβολικές και κυτταροπροστατευτικές διαδικασίες για την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες στρες.^[39] Στις συνθήκες στρες ο NRF2 προσδένεται με πρωτεΐνες sMaf, σταθεροποιείται και εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων όπου ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων, τα οποία περιλαμβάνουν ενισχυτές με αλληλουχίες AREs (antioxidant response elements). Τέτοια γονίδια συμμετέχουν στο μεταβολισμό φαρμάκων, στη διατήρηση της ομοιόστασης, στο μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπιδίων, σιδήρου και αμινοξέων, στην επιδιόρθωση του DNA, στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και στην προστασία των κυττάρων από τη γήρανση.^[40,41] Μερικά παραδείγματα των γονιδίων αυτών είναι

τα γονίδια NQO1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase 1) και TXNRD1 (Thioredoxin Reductase 1).^[42,43] Το γονίδιο NQO1 στα κύτταρα φυσιολογικά συμμετέχει στην προστασία από τις επιβλαβείς οξειδωτικές επιδράσεις των κινονών. Η αποτοξικοποίηση των κινονών από την NQO1 επιτυγχάνεται με την αναγωγή των κινονών σε υδροκινόνες, με απομάκρυνση δύο ηλεκτρονίων. Σε διάφορους τύπους καρκίνων έχει βρεθεί αυξημένη ενεργοποίηση του γονιδίου NQO1, το οποίο οφείλεται στην υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2.^[44] Το γονίδιο TXNRD1 είναι μέλος του συστήματος θειορεδοξίνης, Trx (thioredoxin), το οποίο αποτελεί ένα βασικό αναγωγικό ενζυμικό σύστημα στα κύτταρα. Το TrxR1 (κωδικοποιείται από το γονίδιο TXNRD1) ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων, αναγωγάσες της θειορεδοξίνης, TrxRs (thioredoxin reductases). Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα ένζυμα TrxRs ελαττώνουν τα δισουλφίδια του ενεργού κέντρου των Trxs σε διθειόλες μέσω του NADPH. Επομένως, το γονίδιο TXNRD1 καθοδηγεί την έμφυτη ανοσολογική απόκριση των γερασμένων κυττάρων και εμπλέκεται σε μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την εμφάνιση φλεγμονής που σχετίζεται με την ηλικία των κυττάρων.^[45]

1.4.5. Ο ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε ασθένειες

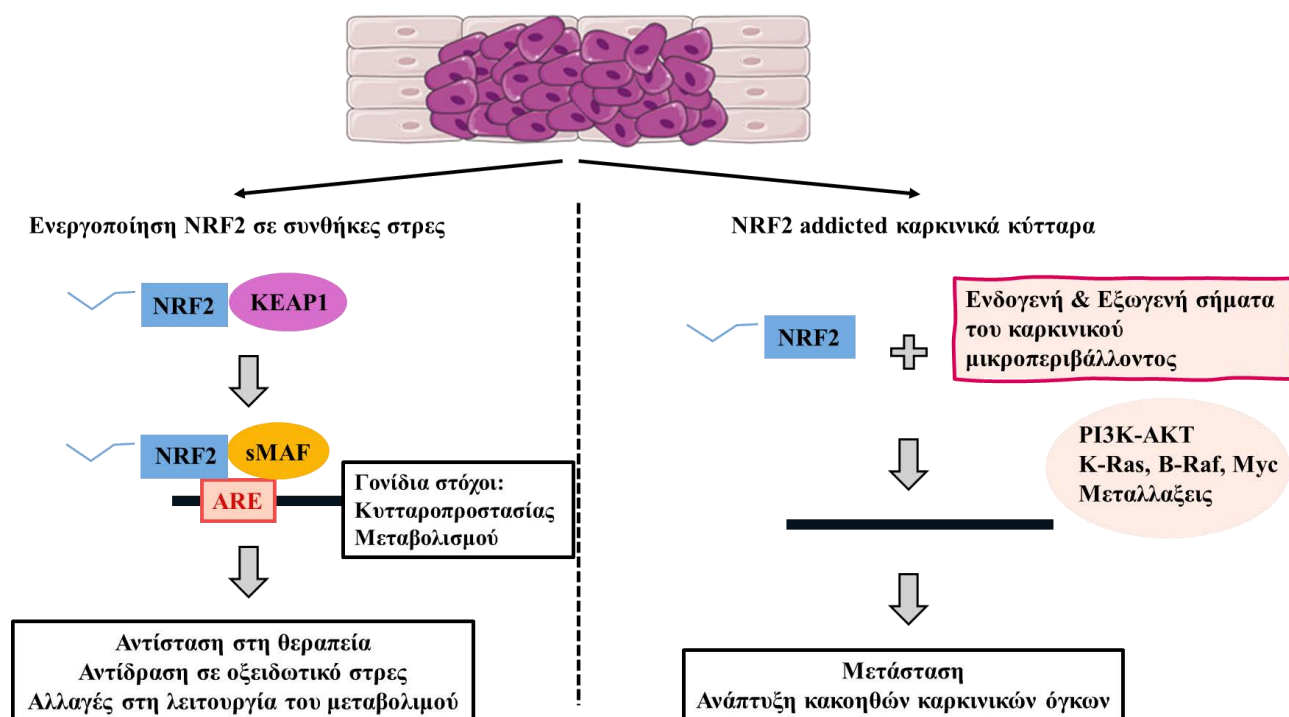
Μεταλλάξεις στο μονοπάτι NRF2/KEAP1 οδηγούν στην απορρύθμιση του μονοπατιού και τη μειωμένη έκφραση του NRF2, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων ασθενειών.^[34] Μελέτες έχουν δείξει ότι μειωμένη ενεργοποίηση του NRF2 οδηγεί στην αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες λόγω της μειωμένης έκφρασης των γονιδίων στόχων του. Ασθένειες που σχετίζονται με το παραπάνω μονοπάτι είναι ο αυτισμός,^[46] διάφορες νευρολογικές παθήσεις, όπως η νόσος Huntington,^[47] η αταξία Friedreich^[48] και ο σακχαρώδης διαβήτης,^[49] αναπνευστικές ανεπάρκειες, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια^[50] και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Πάρκινσον.^[51,52,53]

1.4.6. Ο ρόλος μονοπατιού NRF2/KEAP1 στον καρκίνο

Σε φυσιολογικές συνθήκες, μικρές συγκεντρώσεις του παράγοντα NRF2 είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων. Ο NRF2 αναστέλλει την ανάπτυξη και τη μετάσταση καρκινικών όγκων, εξουδετερώνοντας τοξικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και άλλες καρκινογόνες ουσίες στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών όγκων.^[33] Ωστόσο, σε διάφορους τύπους καρκίνων έχει

παρατηρηθεί ότι ενισχύεται η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του NRF2, λόγω της συνεχούς έκφρασης και σταθεροποίησης του NRF2 (*Εικόνα 8-Αριστερά*). Η αυξημένη έκφραση του NRF2 προκαλεί μεταβολικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Επιπλέον, καρκινικοί όγκοι με υψηλά επίπεδα NRF2 εμφανίζουν αυξημένη μεταστατική ικανότητα. Τα κύτταρα των όγκων αυτών έχουν ονομαστεί NRF2-addicted καρκινικά κύτταρα. Τέτοιες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο του μαστού, του δέρματος και του οισοφάγου (*Εικόνα 8-Δεξιά*).^[54]

Η συνεχής ενεργοποίηση του NRF2 επιτυγχάνεται μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών, όπως μεταλλάξεις στο γονίδιο του KEAP1 και στις περιοχές DLG και ETGE του NRF2. Επιπλέον, επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA επηρεάζουν τη λειτουργία του συστήματος NRF2/KEAP1 και έχουν ως συνέπεια την αυξημένη ενεργοποίηση του NRF2. Επομένως, η αυξημένη ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του NRF2 στα NRF2-addicted καρκινικά κύτταρα, που οφείλεται σε μεταλλάξεις, οδηγεί στην ενίσχυση κακοήθων καρκινικών φαινοτύπων κατά την παρουσία εξωγενών ή ενδογενών ογκογόνων σημάτων.^[39,42] Η ενεργοποίηση του παράγοντα NRF2 μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της δράσης φαρμάκων. Χαρακτηριστικό φάρμακο αποτελεί το sulforaphane, που αποτελεί ενεργοποιητή του παράγοντα NRF2, μέσω της σταθεροποίησής του και χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο.^[60]



Εικόνα 8: Ενεργοποίηση NRF2 σε καρκινικά κύτταρα. Αριστερά) Ενεργοποίηση NRF2 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και Δεξιά) NRF2-addicted καρκινικά κύτταρα.

Ο ενεργός ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1 στην προστασία των κυττάρων, την εξέλιξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων καθιστά επιτακτική τη μελέτη για την εύρεση φαρμάκων που στοχεύουν τις δύο βασικές πρωτεΐνες του μονοπατιού και τους παράγοντες που σχετίζονται με την ομαλή λειτουργία του.^[39] Έχουν σχεδιαστεί φάρμακα αναστολείς του NRF2 που ενεργοποιούν το μηχανισμό αποικοδόμησης μέσω του KEAP1 και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία καρκίνων, όπως ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα. Επίσης, φάρμακα αναστολείς του KEAP, τα οποία ενεργοποιούν τον NRF2 αλλά και φάρμακα ενεργοποιητές των γονιδίων στόχων ανεξάρτητα από τον NRF2 μελετώνται για τη θεραπεία ασθενειών όπως παθήσεις του αναπνευστικού, αλλεργίες και διαβήτης.^[40,55]

1.5. Αλληλεπίδραση ISR – NRF2/KEAP1

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι παράγοντες ATF4 και NRF2 ενεργοποιούνται υπό παρόμοιες συνθήκες στρες σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου.^[57,58] Το οξειδωτικό στρες είναι στενά συνδεδεμένο με το

στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς το ένα μπορεί να ενεργοποιήσει το άλλο.^[12,58] Πιο συγκεκριμένα, η κινάση PERK που ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες του ΕΔ μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει τον παράγοντα NRF2. Επιπλέον, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC - non-small cell lung cancer), ο ενεργός NRF2 δίνει έναυσμα για την έκφραση ενζύμων (PHGDH, PSAT1 και SHMT2), που συμμετέχουν στη σύνθεση σερίνης και γλυκίνης μέσω ενεργοποίησης του ATF4.^[12,57] Αυτά τα ένζυμα παράγουν σερίνη και γλυκίνη διοχετεύοντας άνθρακα στη γλουταθειόνη και σε νουκλεοτίδια μέσω του κύκλου του φυλλικού οξέος. Επίσης, στον NSCLC έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη KRAS ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NRF2 μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT και τελικά, αυξάνει τα επίπεδα mRNA του ATF4. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών για τη σύνθεση ασπαραγίνης και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την καταστολή μονοπατιών απόπτωσης.^[58] Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστό αν η αλληλεπίδραση μεταξύ του ATF4 και του NRF2 αποτελεί ένα γενικευμένο φαινόμενο ή είναι εξειδικευμένη σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.^[12]

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης του μονοπατιού NRF2/KEAP1 με το ISR, στο σχηματισμό κοκκίων του στρες σε καρκινικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα από τις καρκινικές σειρές HeLa και A549 επώαστηκαν με salubrinal για τη μελέτη της ενεργοποίησης του ISR, με NaAsO₂ για τη μελέτη σχηματισμού κοκκίων του στρες και με sulforaphane για τη φαρμακευτική ενεργοποίηση του NRF2. Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του μονοπατιού NRF2/KEAP1, μετρήθηκαν τα επίπεδα των mRNAs του NRF2 και των γονιδίων στόχων του. Τέλος, με πειράματα ανοσοφθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στην πρωτεΐνη G3BP1, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο για τον εντοπισμό της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών στο σχηματισμό των SGs, στον αριθμό τους και στο μέγεθός τους.

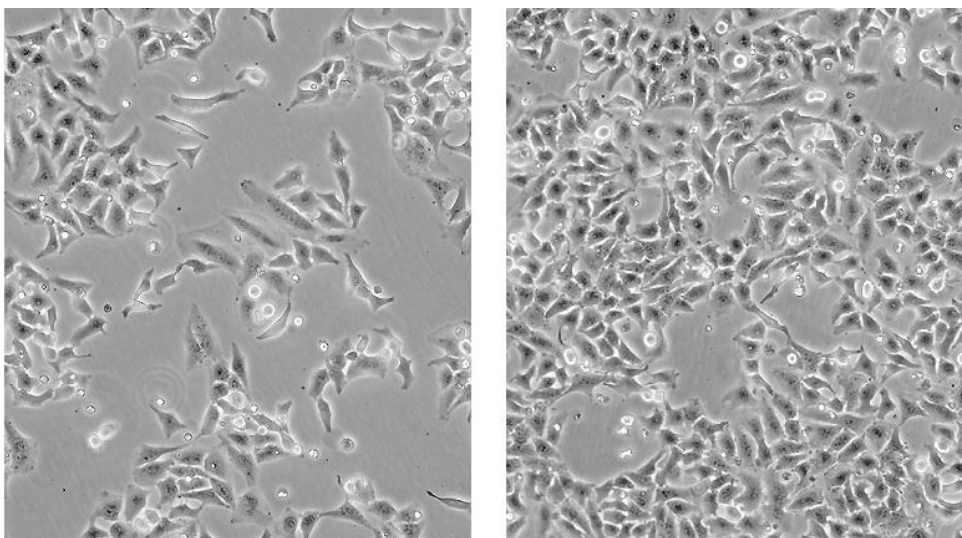
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Κυτταροκαλλιέργειες

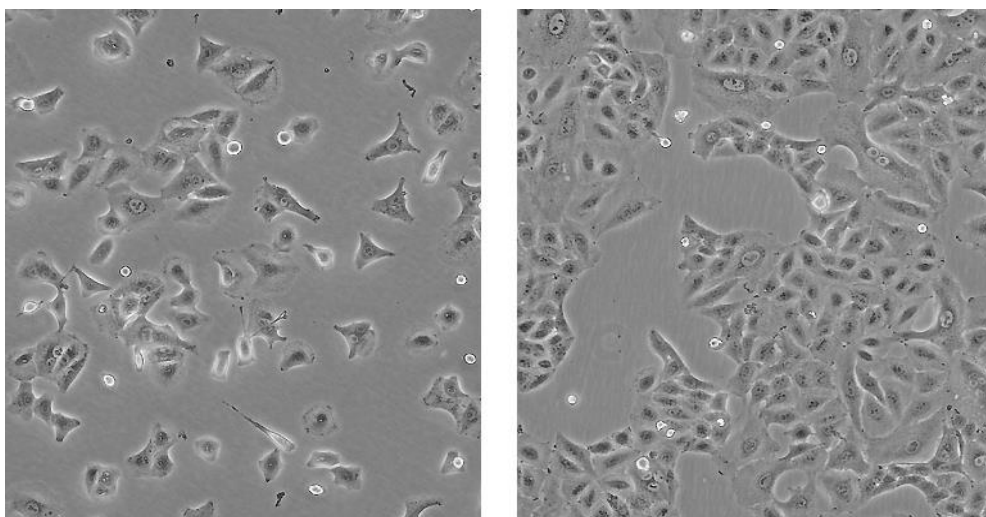
Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές:

- Κύτταρα αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549 και
- Κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας HeLa

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό DMEM (high glucose, 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη) σε ειδικό κλίβανοο επώασης σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂. Το θρεπτικό υλικό στις καλλιέργειες ανανεώνεται κάθε 48-72 ώρες. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά, αφαίρεση του προϋπάρχοντος θρεπτικού μέσου και πλύση των κυττάρων με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄). Η αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο έγινε με προσθήκη θρυψίνης και επώαση των κυττάρων στον κλίβανο. Τέλος τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο με θρεπτικό μέσο DMEM σε κατάλληλη αραιώση. Όλες οι διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Στις *Εικόνες 9 και 10* απεικονίζονται δείγματα καλλιέργειών των κυτταρικών σειρών HeLa και A549 αντίστοιχα:



Εικόνα 9: Απεικόνιση καλλιέργειας κυττάρων HeLa (από <https://www.atcc.org/>).



Εικόνα 10: Απεικόνιση καλλιέργειας κυττάρων A549 (από <https://www.atcc.org/>).

3.1.1. Κατεργασία κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε διαφορετικές συνθήκες σε πιάτα και με αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες:

1. Salubrinal (TargetMol) με συγκέντρωση 20 μ M για 24h.
2. Sulforaphane (Cayman) με συγκέντρωση 20 μ M για 24h και
3. NaAsO₂ για 30 και 60 λεπτά με συγκέντρωση 0,5mM.

3.1.2. Πάγωμα κυττάρων από καλλιέργεια και επανέναρξη καλλιιεργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων από καλλιέργεια, αρχικά έγινε απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πλύση με διάλυμα 1X PBS. Όπως και στη διαδικασία ανακαλλιέργειας, η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με επώαση των κυττάρων στους 37°C και 5% O₂ με διάλυμα θρυψίνης. Μετά την προσθήκη DMEM, το διάλυμα με τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε ειδικό σωληνάριο falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 1200rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του υπερκείμενου και επαναιώρηση με διάλυμα ορού FBS με 10% DMSO. Το DMSO αποτελεί έναν οργανικό διαλύτη που εμποδίζει το σχηματισμό κρυστάλλων νερού μέσα στα κύτταρα και χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό, αποτρέποντας τον κυτταρικό θάνατο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα, που επαναιωρήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε

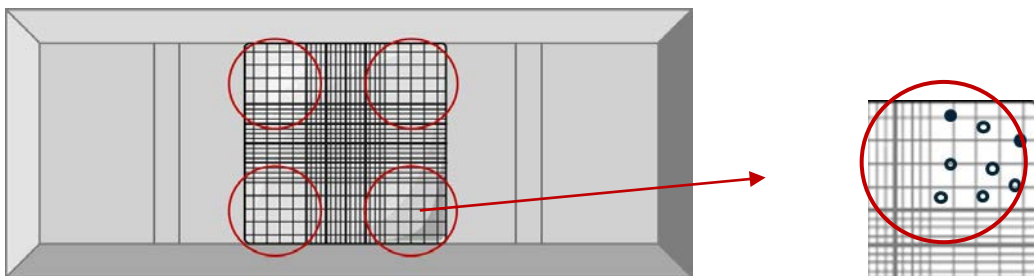
ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes), καταψύχθηκαν στους -20°C και τελικά, αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

Για την επανέναρξη των καλλιιεργειών, οι μικροσωλήνες που βρίσκονται στους -80°C , μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο των 37°C ώστε να ξεπαγώσουν. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε φιάσκα 75cm^2 με 15ml θρεπτικού μέσου. Η φιάσκα επώαστηκε σε κλίβανο στους 37°C σε $5\% \text{CO}_2$.

3.1.3. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με χρωστική Trypan Blue

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Για τη διαδικασία αυτή αρχικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη και επαναιωρήθηκαν με θρεπτικό υλικό, όπως αναφέρεται παραπάνω. Συλλέχθηκαν $100\mu\text{l}$ κύτταρα σε σωληνάρια τύπου erpendorf, τα οποία αραιώθηκαν με $300\mu\text{l}$ διάλυμα PBS. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη $100\mu\text{l}$ της χρωστικής Trypan Blue και το διάλυμα, μετρήθηκε στην πλάκα Neubauer. Η χρωστική Trypan Blue χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των κυττάρων, επειδή βάφει με μπλε χρώμα τα νεκρά κύτταρα ώστε να διαχωρίζονται από τα ζωντανά. Τελικά, τα κύτταρα μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στα τέσσερα εξωτερικά τετράγωνα της πλάκας, όγκου $0,1\text{mm}^3$ που είναι κυκλωμένα στην *Εικόνα 11*:



Εικόνα 11: Απεικόνιση πλάκας Neubauer. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στα τετράγωνα κυκλωμένα με κόκκινο χρώμα.

Και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\frac{\text{Αριθμός κυττάρων}}{\text{ml}} = \text{Μέσος όρος κυττάρων στα 4 τετράγωνα της πλάκας} * 5 \text{ (αραίωση διαλύματος)} * 10^4.$$

3.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blotting

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα σύνθετο μίγμα πρωτεϊνών που εξάχθηκε από βιολογικά δείγματα. Οι πρωτεΐνες του εκχυλίσματος διαχωρίζονται στην ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό βάρος. Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μία μεμβράνη όπου αναγνωρίζονται από ειδικά αντισώματα και τελικά φαίνεται μία ζώνη για την κάθε πρωτεΐνη. Το μέγεθος και η ένταση της ζώνης που εντοπίζεται είναι ανάλογα της ποσότητας της πρωτεΐνης που απομονώθηκε.

3.2.1. Λύση κυττάρων και παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος

Κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 35mm (6well plate). Πραγματοποιήθηκε πλύση με 1X PBS και προστέθηκε 1ml από το Loading buffer (4X Laemli buffer - 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25mM DTT - με 1mM DTT). Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με ειδική σπάτουλα και το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου erppendorf. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υπέστη υπερήχηση (sonication) με 3-4 παλμούς σε χαμηλή ένταση, για την ενίσχυση της διαλυτότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν στους 95°C για 5 λεπτά. Τελικά τα δείγματα των πρωτεϊνών αποθηκευτήκαν στους -20°C.

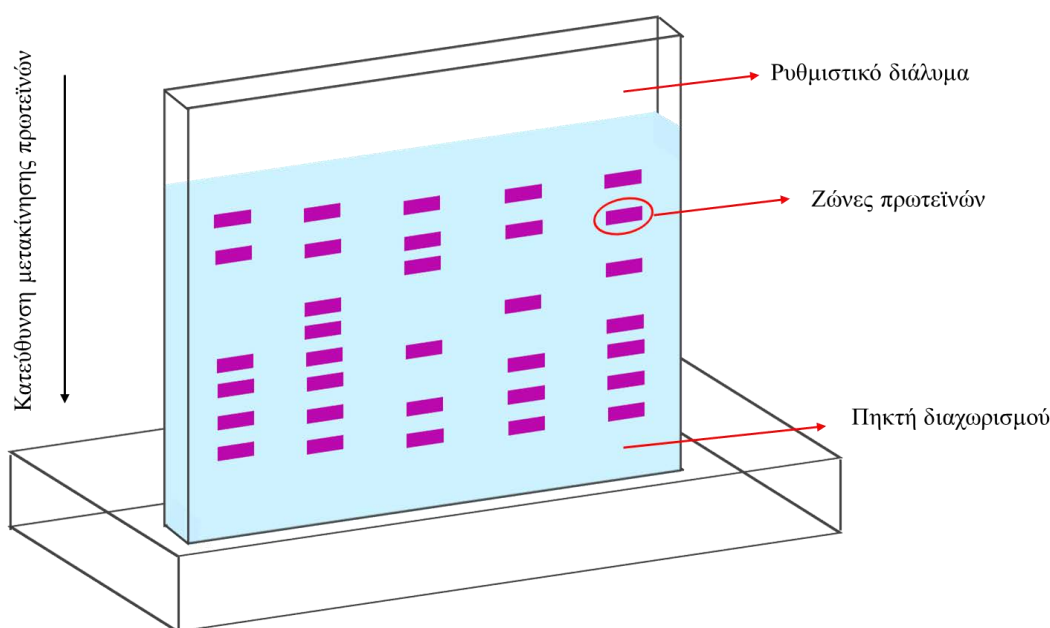
3.2.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Η πηκτή που χρησιμοποιείται περιέχει μόρια ακρυλαμίδιου και bis-ακρυλαμίδιου, τα οποία σχηματίζουν ένα πλέγμα (Εικόνα 12). Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμίδιου. Γενικά, πηκτώματα με μεγάλη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου έχουν μικρότερους πόρους και το αντίστροφο. Η ταχύτητα μετατόπισης των πρωτεϊνών στην πηκτή είναι ανάλογη του φορτίου και του μοριακού βάρους τους. Οι μεγάλες πρωτεΐνες κινούνται προς το θετικό πόλο πιο αργά από τις μικρές όταν η πηκτή διαπερνάται με ηλεκτρικό ρεύμα. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα:

- Πηκτή επιστοίβαξης - 4ml (stacking gel buffer/upper gel) ➔ 0,45ml από 40% ακρυλαμίδιο, 0,5M Tris, 8mM EDTA, 0,4% SDS, pH 6,8, 30μl APS (10%) και 15μl TEMED.

- Πηκτή διαχωρισμού - 5ml(separating gel buffer/lower gel) → 1,25ml από 40% ακρυλαμίδιο, 1,5M Tris, 8mM EDTA, 0,4% SDS, pH 8,8, 40μl APS (10%) και 20μl TEMED.

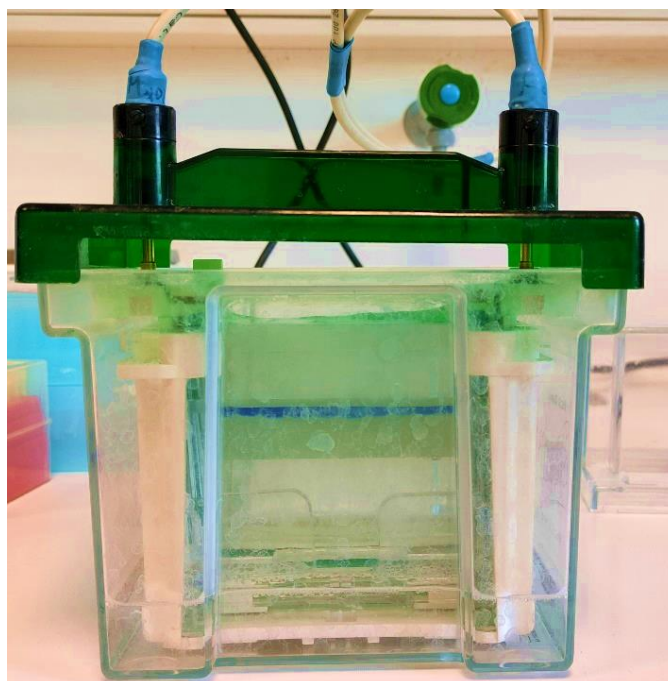
Ο σχηματισμός των πηκτωμάτων γίνεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου σε θερμοκρασία δωματίου με τους πολυμεριστικούς παράγοντες υπερθειικό αμμώνιο (APS, ammonium persulfate) και N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (TEMED). Στο πήκτωμα επιστοίβαξης οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται ενώ στο πήκτωμα διαχωρισμού οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται. Το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει ελαφρώς όξινο pH και μικρή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που το καθιστά πορώδες, τα οποία διευκολύνουν τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών. Από την άλλη, τη πηκτή διαχωρισμού έχει βασικό pH και μεγάλη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (γαλάζιο) για Western blotting. Με μωβ χρώμα φαίνονται οι πρωτεΐνες όταν κινούνται στην πηκτή.

Για την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα επεξεργάστηκαν με το loading buffer, το οποίο σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS) δεσμεύονται στις πρωτεΐνες με αναλογία 1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 0,25M Tris, 1,92M glycine, 10mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,6).

Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά κι έπειτα, φορτώθηκαν στην πηκτή επιστοίβαξης. Ως δείκτης μεγέθους πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το blue star prestained protein marker (Nipon Genetics), το οποίο περιέχει 10 προχρωματισμένες πρωτεΐνες που καλύπτουν μεγάλο εύρος μοριακών βαρών (από 10kDa μέχρι 180kDa). Το τροφοδοτικό ρυθμίστηκε στα 150V, 400mA για 1 ώρα (Εικόνα 13).

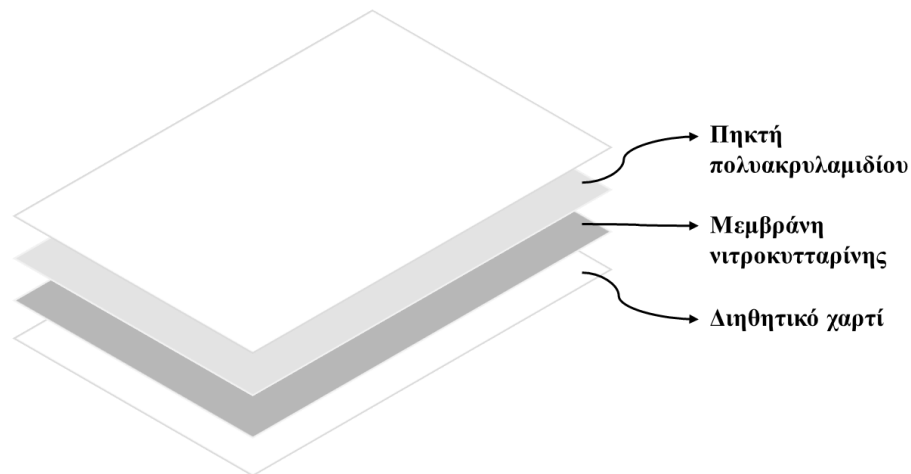


Εικόνα 13: Συσκευή Western blotting του εργαστηρίου. Στο καπάκι η συσκευή συνδέεται με το ηλεκτρικό ρεύμα. Με μπλε φαίνεται η ζώνη των πρωτεϊνών στην πηκτή.

3.2.3. Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

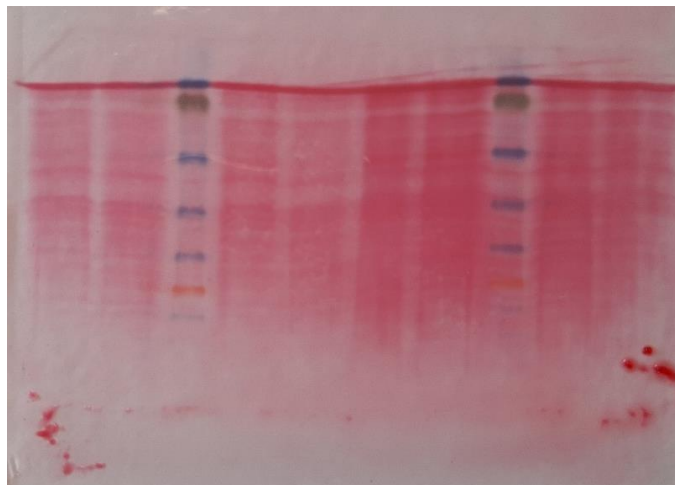
Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Εφαρμόστηκαν ημίξηρες συνθήκες και ηλεκτρικό ρεύμα (semi-dry electroblotting). Πιο συγκεκριμένα, κατά την ηλεκτρομεταφορά, το ηλεκτρικό ρεύμα διαπερνά την πηκτή, μεγιστοποιώντας την ταχύτητα της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Στη συσκευή τοποθετήθηκε αρχικά, διηθητικό χαρτί (3mm) και έπειτα η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου και από πάνω ξανά διηθητικό χαρτί, τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε ειδικό διάλυμα

μεταφοράς (Transfer buffer: 39mM glycine, 48mM Tris, 0,037% SDS και 20% μεθανόλη). Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 75V, 80mA για 1 ώρα (*Εικόνα 14*).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση δομής των υλικών για την ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ), η οποία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Η χρώση αντιστρέφεται με την πλύση της μεμβράνης με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια με 1X TBS (50mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.6) - 0,1% Tween 20. Η χρώση των πρωτεϊνών φαίνεται στην παρακάτω *Εικόνα*:



Εικόνα 15: Πρωτεΐνες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφού βαφτούν με τη χρωστική Ponceau. Οι χρωματιστές ζώνες αποτελούν το μάρτυρα.

3.2.4. Ανοσοαποτύπωση

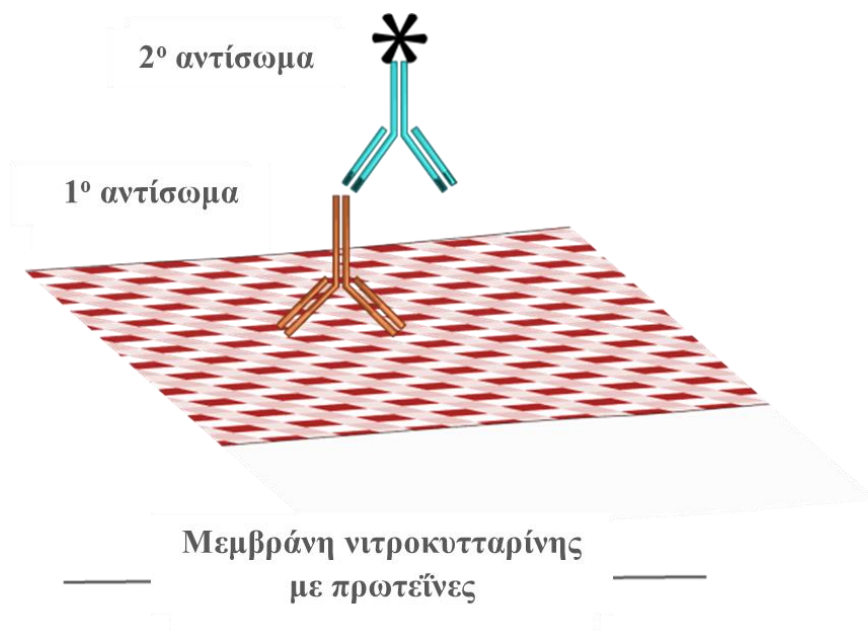
Η αναγνώριση των πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πραγματοποιείται με αντισώματα ειδικά για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Το πρώτο αντίσωμα αντιδρά ειδικά με τους αντιγονικούς επίτοπους των προς μελέτη πρωτεϊνών. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη IgG του πρώτου αντισώματος και είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη την υπεροξειδάση (HRP - horseradish peroxidase). Η υπεροξειδάση καταλύει την οξείδωση των υποστρωμάτων λουμινόλης, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να φθορίζουν κατά την απελευθέρωση φωτός. Η αντίδραση εκπέμπει φθορισμό στα 428nm και το σήμα αναγνωρίζεται από ειδική συσκευή (Εικόνα 16).

Για την αναγνώριση των πρωτεϊνών, η μεμβράνη αρχικά, επώαστηκε σε διάλυμα κορεσμού (1x TBS, 0,1% Tween20 και 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη) για 1 ώρα υπό ανάδευση, ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης και να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Η μεμβράνη επώαστηκε με το πρώτο αντίσωμα ολονύχτια στους 4°C υπό ανάδευση και την επόμενη μέρα επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Μετά από κάθε επώαση με τα αντισώματα πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1x TBS – 0,1% Tween20.

Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα της εταιρείας Cell Signaling Technology:

1 ^ο αντίσωμα	Αραίωση	Διάλυμα	2 ^ο αντίσωμα	Αραίωση
Phospho-eIF2 α (Rabbit)	1:1000	TBS-0,1%Tween-5% BSA	Anti-rabbit IgG	1:5000
eIF2 α (L57A5) IgG Mouse	1:1000	TBS-0,1%Tween-5% BSA	Anti-Mouse	1:5000

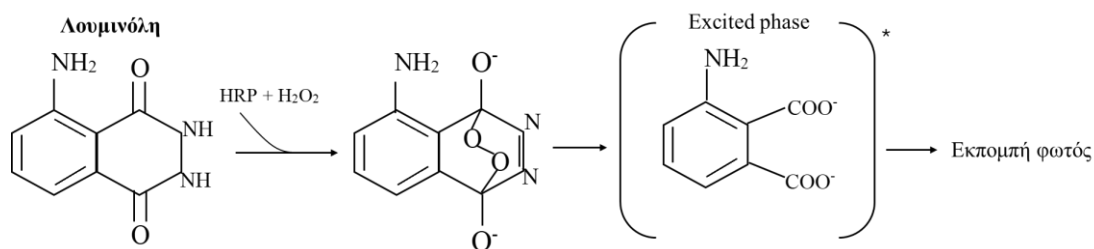
Πίνακας 1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση, με την αραίωση και τα διαλύματα στα οποία αραιώθηκαν.



Εικόνα 16: Βασική αρχή απεικόνισης της ανοσοαποτύπωσης. Στο σχήμα φαίνεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το 1^ο αντίσωμα που αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες στη μεμβράνη και το 2^ο αντίσωμα.

3.2.5. Ανίχνευση πρωτεϊνών με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια

Η ανίχνευση γίνεται με έκλυση φωτός από χημική αντίδραση κατά την οποία η λουμινόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση (HRP) σε αλκαλικό περιβάλλον, με επίδραση του H_2O_2 και ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Η αντίδραση φαίνεται παρακάτω:

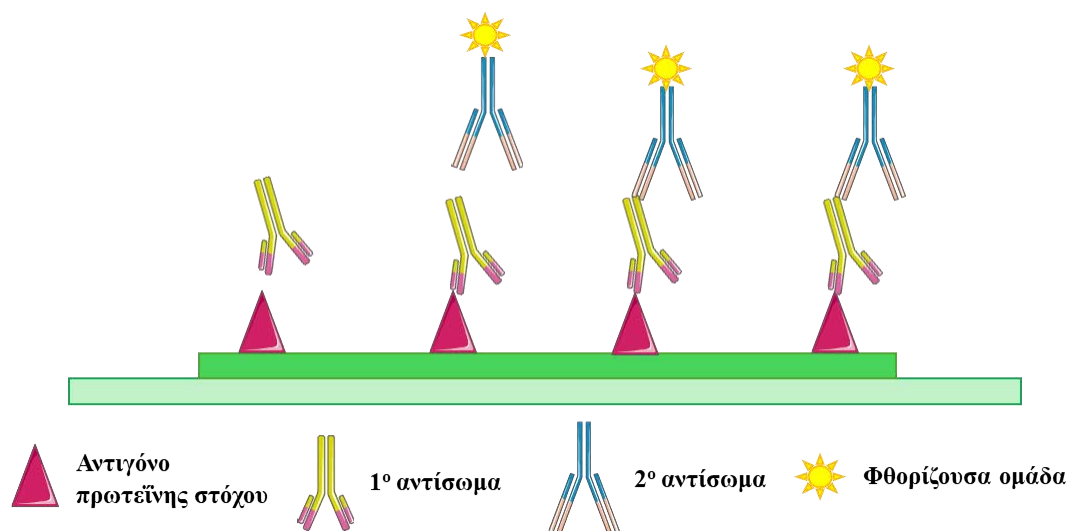


Εικόνα 17: Αντίδραση λουμινόλης για την τελική εκπομπή φωτός.

Στο πείραμα η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα λουμινόλης (Immobilon® Crescendo Western HRF Substrate - Millipore) για 3 λεπτά. Το σήμα ανιχνεύτηκε σε συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (UVItec chemiluminescence Imager).

3.3. Πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού – Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ενδοκυττάρια ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι τα αντισώματα αναγνωρίζουν ειδικά τις πρωτεΐνες και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα προσδεμένο με μία φθορίζουσα ομάδα αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο (Εικόνα 18). Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα κατάλληλου μήκους κύματος.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας έμμεσου ανοσοφθορισμού. Φαίνεται η αναγνώριση των αντιγόνων της πρωτεΐνης από το πρώτο αντίσωμα, η αναγνώριση του 1^{ου} αντισώματος από το 2^ο αντίσωμα και η εκπομπή φωτός στο μικροσκόπιο.

Για τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 10mm. Το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε από τις καλλιέργειες και έγινε πλύση των κυττάρων με 1x PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄). Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα PBS - 3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για τη σταθεροποίηση των εσωτερικών δομών των κυττάρων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις για 5 λεπτά με 1X PBS και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 15 λεπτά σε διάλυμα 1X PBS-1% Triton X - 100 στους 4°C, για να γίνουν διαπερατές οι μεμβράνες των κυττάρων. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με 1X PBS - 0.1% Tween 20 και επώαση των κυττάρων σε διάλυμα κορεσμού 1X PBS - 0.1% Tween 20 - 1% BSA για 1 ώρα στους 37°C.

Τα κύτταρα επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα anti – G3BP1 mouse της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology, INC, σε αραιώση 1:500 σε διάλυμα κορεσμού, ολονύχτια στους 4°C. Την επόμενη μέρα, έγιναν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με 1X PBS - 0.1% Tween 20 και επώαση των κυττάρων με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Anti-mouse IgG (Fab2 Alexa Fluor® 594 CST) με αραιώση 1:300. Με το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκαν, όπως και με το πρώτο αντίσωμα 3 πλύσεις των 5 λεπτών με 1X PBS - 0.1% Tween 20. Έπειτα, οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν στιγμιαία σε H₂O. τελικά τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα επιστοιβαξης Mowiol με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI (20 µg/ml). Αφέθηκαν για 20-30 λεπτά στο σκοτάδι να στεγνώσει το διάλυμα επιστοιβαξης και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axio Imager. Z2).

3.4. Ποσοτική ανάλυση δεδομένων μικροσκοπίας φθορισμού

Για την επεξεργασία των φωτογραφιών των κυττάρων από το μικροσκόπιο και την ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ. Αναλυτικά, η εικόνα από το μικροσκόπιο αναστράφηκε, ώστε τα λευκά pixels, που αντιστοιχούν στα κοκκία του στρες να γίνουν μαύρα και επιλέχτηκε η περιοχή του υπό μελέτη μεμονωμένου κυττάρου. Ορίστηκε ο ουδός μέτρησης (threshold) και αναλύθηκαν ο αριθμός των κοκκίων ανά κύτταρο (count) και η περιοχή που καλύπτεται από κάθε κοκκίο ανά κύτταρο. Τελικά, έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων από την επεξεργασία των κοκκίων του στρες.

3.5. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

3.5.1. Απομόνωση ολικού RNA από βιολογικά δείγματα

Στα πειράματα απομόνωσης ολικού RNA από κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL protocol της εταιρείας Macherey-Nagel. Στο πειράματα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 35mm (6well plate). Αρχικά, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με 500µl από το αντιδραστήριο NucleoZOL. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε σωληνάριο τύπου erppendorf και αποθηκευτήκαν στους -20°C. Στη συνέχεια, για κάθε 500µl NucleoZOL στα erppendorf, έγινε προσθήκη 200µl H₂O. Τα δείγματα ανακατεύθηκαν έντονα για 15 δευτερόλεπτα και επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για

15 λεπτά στις 12000rpm και μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν 500μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι. Η κατακρήμνιση του RNA επιτεύχθηκε με την προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης 100% στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σωληνάκια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 12000rpm και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Οι πλύσεις του ιζήματος του RNA, πραγματοποιήθηκαν με 500μl αιθανόλης 75% και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 3000rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η πλύση επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά. Τελικά, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα H₂O και το RNA επαναιωρήθηκε με vortex για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5.2. Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με Nanodrop

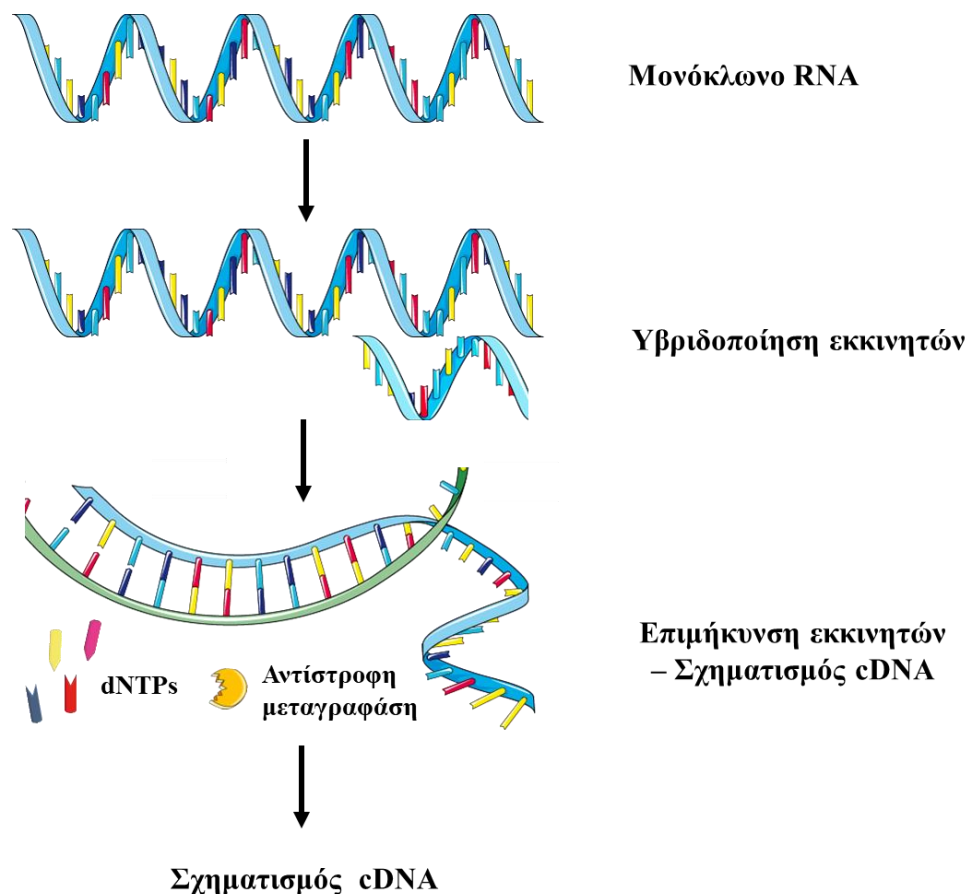
Η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA μετρήθηκε στη συσκευή NanoDrop. Το NanoDrop αποτελεί ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis πλήρους φάσματος. Με χρήση 1-2μl, μετρήθηκαν η συγκέντρωση του DNA και του RNA και οι λόγοι A260/A280 και A260/A230. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=260\text{nm}$ και διαχωρίζονται από διάφορα χαοτροπικά άλατα και απορρυπαντικά, τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=230\text{nm}$. Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται και η μέτρηση των πρωτεϊνών, που απορροφούν σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=280\text{nm}$. Οι παραπάνω λόγοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων. Έτσι, η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων καθορίζεται με τους παρακάτω τρόπους:

- Για το RNA: Απορρόφηση 1unit στα 260nm αντιστοιχεί σε 40μg RNA ανά ml ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$).
- Για το DNA: Απορρόφηση 1unit στα 260nm αντιστοιχεί σε 50μg DNA ανά ml ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$).

3.5.3. Παρασκευή cDNA

Η Παρασκευή cDNA από μονόκλωνο RNA βασίζεται στη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η αντίστροφη μεταγραφάση αποτελεί ένα ένζυμο που έχει την ιδιότητα να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως αλυσίδα εκμαγείο μονόκλωνο RNA. Τα μόρια DNA που παράγονται, χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση δειγμάτων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR). Η παρασκευή cDNA αρχίζει με τη δράση εκκινητών οι οποίοι είναι

συμπληρωματικοί για τις αλληλουχίες RNA. Στη συνέχεια, η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide Triphosphates - dNTPs) επιμηκώνει τις αλληλουχίες των εκκινητών και σχηματίζει υβριδικά σύμπλοκα RNA/cDNA (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Αναπαράσταση αντίδρασης σχηματισμού cDNA.

Στις αντιδράσεις των πειραμάτων προστέθηκαν το cDNA, το prime script buffer, τα νουκλεοτίδια για τη σύνθεση του DNA, τους κατάλληλους εκκινητές (oligo dT primers, random 6mers) και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (prime script RT enzyme). Για τον έλεγχο της σωστής λειτουργίας της διαδικασίας, παρασκευάστηκε ένα δείγμα που λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας, το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από την αντίστροφη μεταγραφάση. Τα δείγματα επωάστηκαν αρχικά:

1. Στους 25°C για 1 λεπτό και έπειτα,
2. στους 37°C για 15 λεπτά,
3. στους 85°C για 5 δευτερόλεπτα και τελικά,

4. στους 4°C.

Προστέθηκαν 50μl H₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Συστατικά αντίδρασης	1x (μl)	1x (μl) - RT
5X Prime script Buffer	2	2
Prime script RT enzyme	0,5	-
oligo dT primers	0,5	0,5
Random 6mers	0,5	0,5
H₂O	1,5	2
Δείγμα RNA	5	5
Τελικός όγκος	10	10

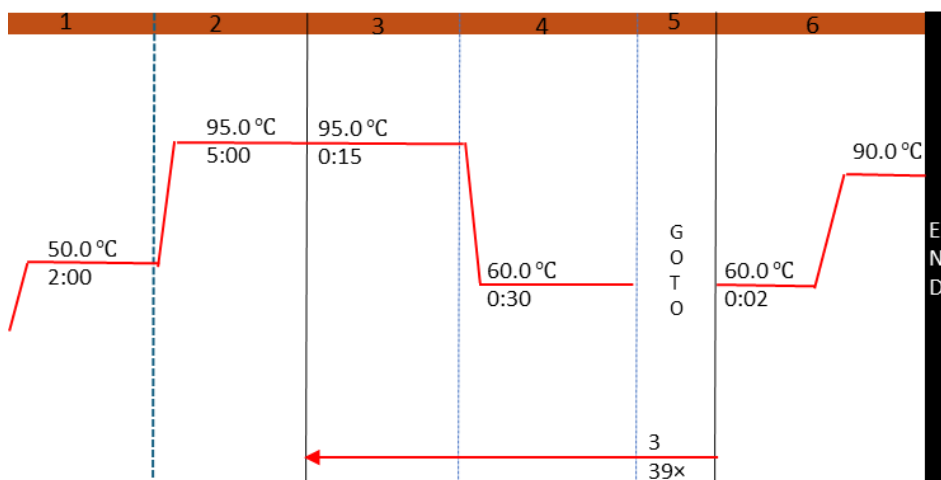
Πίνακας 2: Συστατικά αντίδρασης παρασκευής cDNA.

3.5.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time Quantitative Polymerase chain reaction RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, αποτελεί μία από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές για την ποσοτικοποίηση του mRNA κι επομένως, των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων. Το πλεονέκτημα της qPCR, σε σχέση με την κλασική PCR, είναι ότι επιτρέπει την ταχεία και υψηλής απόδοσης ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη αλληλουχιών του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ακριβής ανίχνευση των δειγμάτων επιτυγχάνεται με την προσθήκη του φθορίζοντος μορίου αναφοράς SYBR Green, που προσδένεται στο DNA. Όσα περισσότερα μόρια DNA σχηματίζονται στην PCR, αυξάνεται ο φθορισμός. Η διαδικασία αποτελείται από δύο φάσεις, την εκθετική όπου το DNA διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο και μία μη εκθετική φάση όπου η αντίδραση παύει σε ένα σημείο κορεσμού, αφού έχουν καταναλωθεί τα περισσότερα συστατικά της αντίδρασης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase - quinone 1) και TXNRD1 (Thioredoxin Reductase 1). Το γονίδιο της ακτίνης-β (ACTB) χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ως γονίδιο αναφοράς. Για την πραγματοποίηση της RT-qPCR, χρησιμοποιήθηκαν τα cDNA, που παρασκευάστηκαν, και τα συστατικά της αντίδρασης της πολυμεράσης, εκκινητές (forward και reverse) και το μίγμα της φθορίζουσας χρωστικής που περιέχει νουκλεοτίδια για την αντίδραση και το ένζυμο της πολυμεράσης. Ως μάρτυρας παρασκευάστηκε μία αντίδραση για κάθε συνθήκη, η οποία περιείχε όλα τα συστατικά της αντίδρασης χωρίς το cDNA. Το πρόγραμμα της αντίδρασης με τις συνθήκες ήταν (Εικόνα 20):

- 1) 50°C για 2 λεπτά → ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης.
- 2) 95°C για 5 λεπτά → αρχική αποδιάταξη.
- 3) 95°C για 15 δευτερόλεπτα → αποδιάταξη.
- 4) 60°C για 30 δευτερόλεπτα → πρόσδεση εκκινητών και επέκταση.
- 5) Επανάληψη για 40 κύκλους.



Εικόνα 20: Πρωτόκολλο αντίδρασης της RT-qPCR.

Οι ποσότητες που προστέθηκαν στις αντιδράσεις της RT-qPCR φαίνονται στον Πίνακα 3 παρακάτω:

Αντίδραση RT-qPCR 1X	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	1,5

Εκκινητές (forward) 10μM	0,5
Εκκινητές (reverse) 10μM	0,5
SYBR Green mix	5
cDNA	2,5
Τελικός όγκος αντίδρασης	10

3.5.5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA

Η καμπύλη ενίσχυσης προκύπτει από τη μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος του φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που πολλαπλασιάζεται στην RT-qPCR και σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση του δείγματος. Στην ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται τα γονίδια αναφοράς, των οποίων η έκφραση παραμένει σταθερή στις διάφορες πειραματικές συνθήκες. Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τον εσωτερικό μάρτυρα που είναι το γονίδιο αναφοράς και ως προς τη συνθήκη αναφοράς που ορίζεται σε κάθε πείραμα.

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων της PCR γίνεται με τον τύπο:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(treatment) - \Delta Ct(control), \text{ όπου ως}$$

$$\Delta Ct(control) = Ct(target\ control) - Ct(reference\ control) \text{ και}$$

$$\Delta Ct(treatment) = Ct(target\ treatment) - Ct(reference\ treatment)$$

Η αναλογία της έκφρασης ορίζεται ως η σχέση στη γονιδιωματική έκφραση μεταξύ του γονιδίου αναφοράς και του γονιδίου στόχου και προκύπτει από τον τύπο:

$$\text{Αναλογία έκφρασης} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Εκκινητές των υπό μελέτη γονιδίων για την RT-qPCR:

Εκκινητές	Αλληλουχίες
HS Actin forward	CCAACCGCGAGAAGATGA
HS Actin reverse	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

hNRF2 forward	TCATGATGGACTTGGAGCTG
hNRF2 reverse	CATACTCTTTCCGTCGCTGA
hNQO1 forward	CAAAAGAAGCTGGAAGCCGC
hNQO1 reverse	GCCTTCTTACTCCGGAAGGG
Hs TXNRD1 forward	TTGGAATCCACCCTGTCTGT
Hs TXNRD1 reverse	CATCCACACTGGGGCTTAAC

Πίνακας 4: Αλληλουχίες εκκινήτων των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-qPCR.

3.5.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

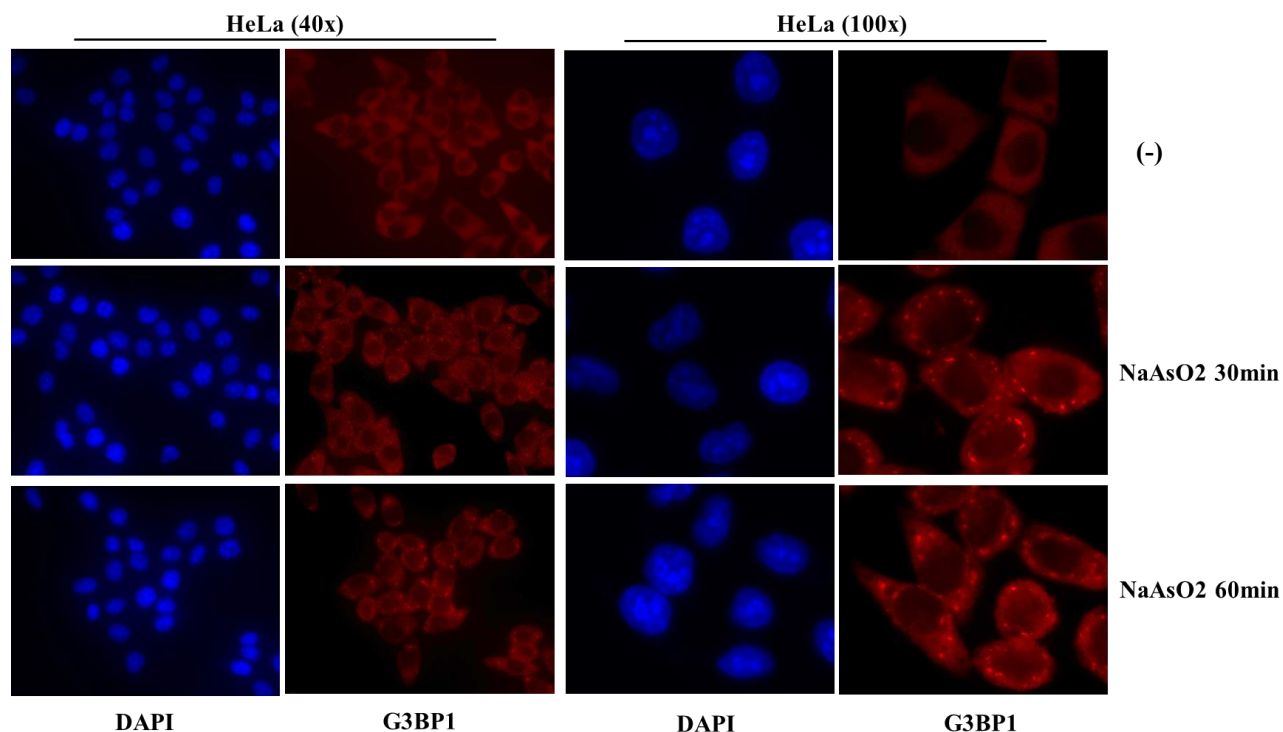
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία unpaired t-test. Στατιστικά σημαντική διαφορά ορίστηκε τιμή p-value < 0,05. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τις τιμές ***P < 0.001, **P < 0.01 και *P < 0.05. Τιμές μεγαλύτερες του 0,05 δεν θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ISR με το μονοπάτι NRF2/KEAP1 σε καρκινικά κύτταρα και την επίδραση στο σχηματισμό κοκκίων του στρες, κύτταρα HeLa και A549 επώαστηκαν με παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση των μονοπατιών και τα κοκκία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

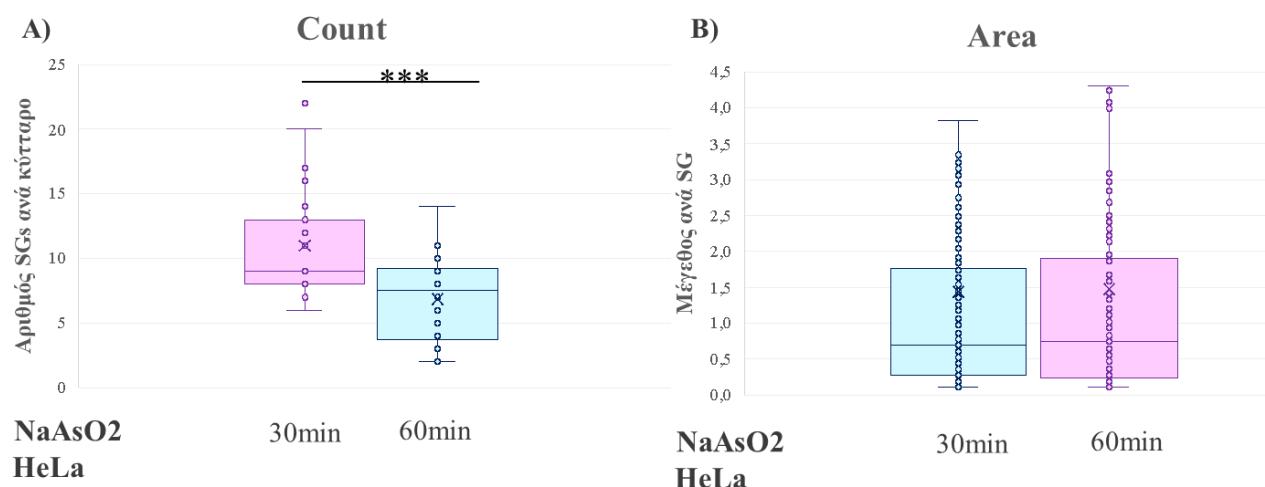
4.1. Μελέτη της επίδρασης του Salubrinal στον παράγοντα NRF2 και στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα HeLa

Αρχικά, για τη μελέτη του σχηματισμού κοκκίων του στρες, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά. Για την παρατήρηση σχηματισμού κοκκίων του στρες χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη G3BP1, η οποία ανιχνεύθηκε με επώαση των κυττάρων με αντισώματα ενάντια στη G3BP1, με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Στην *Εικόνα 21* φαίνεται ότι τα κύτταρα, ύστερα από επώαση με 30 και 60 λεπτά NaAsO₂ σχημάτισαν κοκκία του στρες, ενώ δεν παρατηρήθηκε σχηματισμό κοκκίων του στρες στα κύτταρα που επώαστηκαν στη συνθήκη αναφοράς (control).



Εικόνα 21: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa που επωάστηκαν με NaAsO₂. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 0, 30 και 60 λεπτά με NaAsO₂ (0,5mM). Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση 40X και 100X.

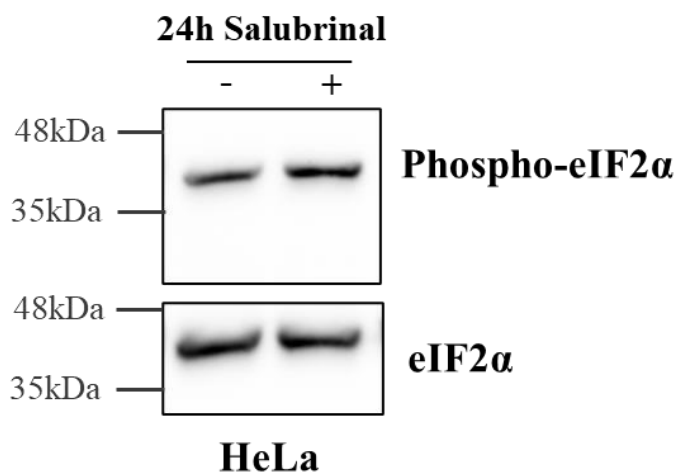
Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση και ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες που σχηματίστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ. Μετρήθηκε ο αριθμός των κοκκίων του στρες ανά κύτταρο (Εικόνα 22 - Α) και η επιφάνεια που καλύπτουν τα κοκκία σε σχέση με τη συνολική επιφάνεια του κυττάρου για τον υπολογισμό του μεγέθους τους (Εικόνα 22 - Β). Έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη δοκιμασία unpaired t-test.



Εικόνα 22: Επίδραση του NaAsO₂ στο σχηματισμό κοκκίων του στρες. Κύτταρα επωάστηκαν με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά. Ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες με το πρόγραμμα ImageJ.. A) Αριθμός SGs στα κύτταρα που επωάστηκαν με NaAsO₂ για 30 και 60 λεπτά. B) Περιοχή που καλύπτεται ανά κοκκίο (**P < 0.001).

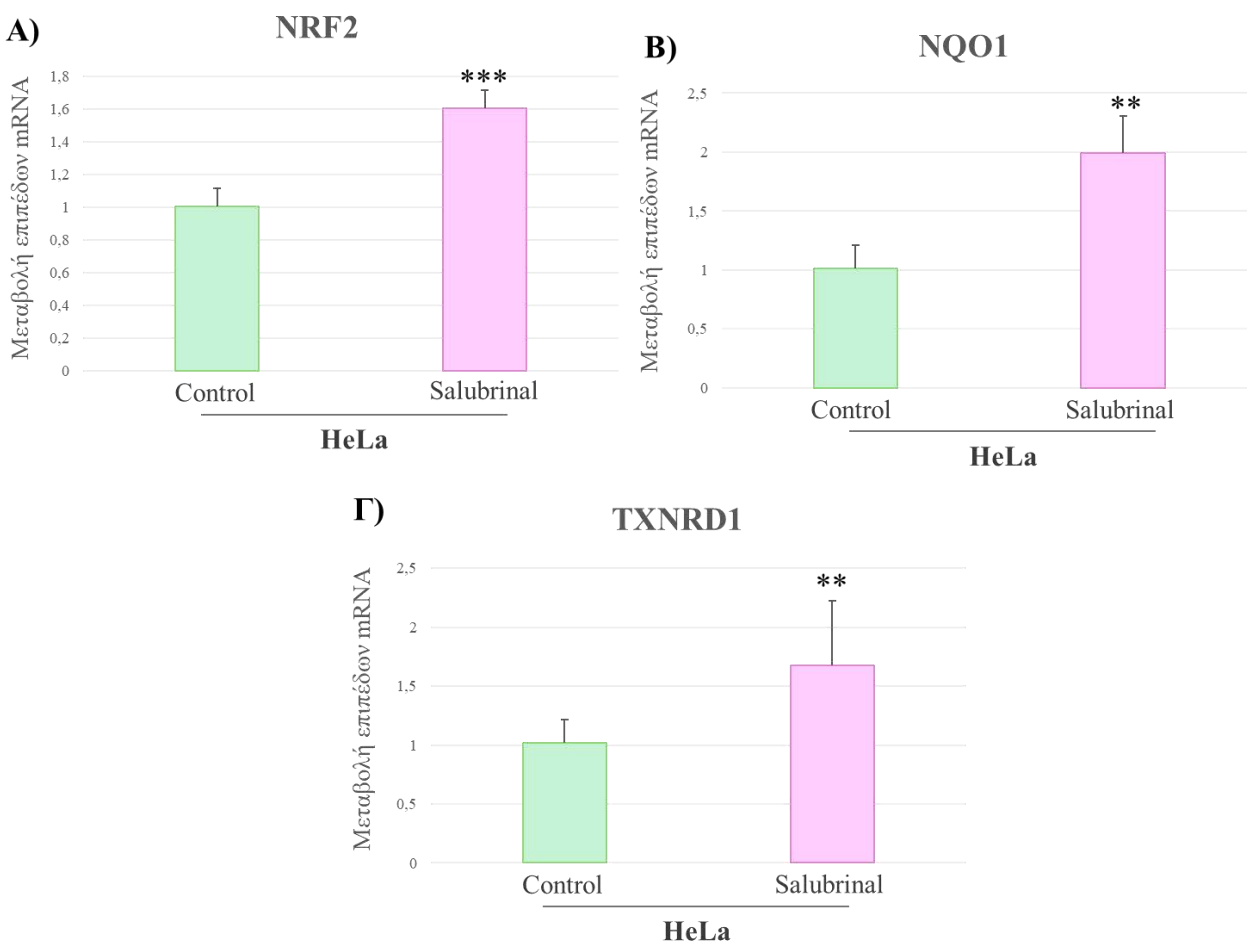
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με NaAsO₂ για 60 λεπτά ο αριθμός των κοκκίων του στρες μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί για 30 λεπτά με NaAsO₂ (Εικόνα 22-A). Από την άλλη στις δύο συνθήκες (30 και 60 λεπτά NaAsO₂) το μέγεθος των κοκκίων δεν μεταβλήθηκε (Εικόνα 22-B).

Στη συνέχεια, προκειμένου να ελεγχθεί η ενεργοποίηση του ISR, ελέγχθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p-eIF2α, με επώαση κυττάρων HeLa απουσία ή παρουσία salubrinal (24h) και παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών, τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του eIF2α. Η μεμβράνη επωάστηκε με τα αντισώματα anti-phospho-eIF2α rabbit και anti-eIF2α mouse και στη συνέχεια, με τα αντισώματα anti-rabbit IgG και anti-mouse IgG αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με salubrinal παρουσιάζεται αυξημένος ο p-eIF2α σε σχέση με τα κύτταρα control, επομένως το salubrinal προκάλεσε την ενεργοποίηση του μονοπατιού ISR σε κύτταρα HeLa (Εικόνα 23).



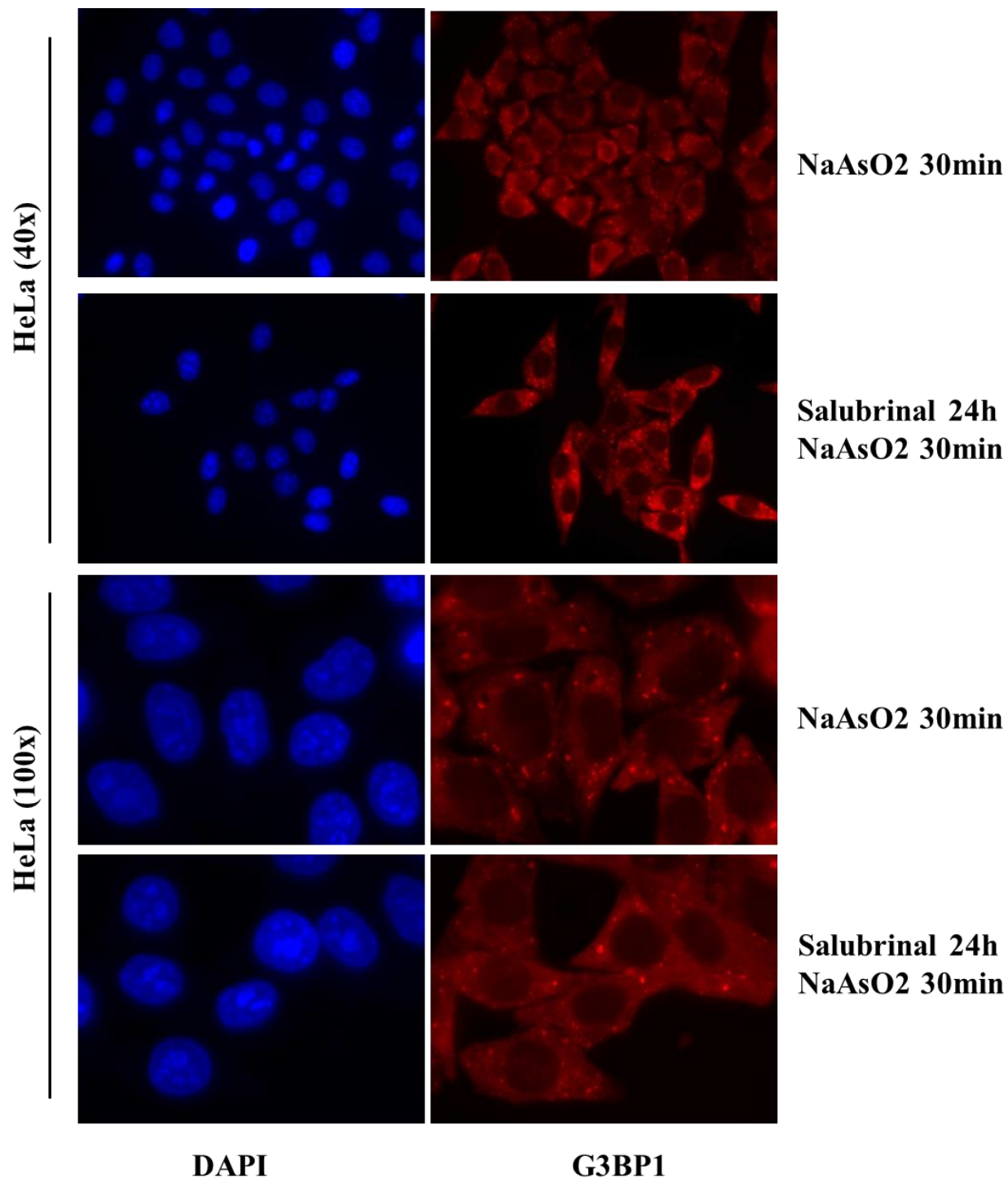
Εικόνα 23: Έλεγχος των επιπέδων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης *pEIF2α* με ανοσοαποτύπωση κατά *western* σε κύτταρα *HeLa*. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για τον *pEIF2α*. Ο *eIF2α* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

Έπειτα, μελετήθηκε η επίδρασή του στα επίπεδα mRNA του γονιδίου NRF2 των γονιδίων στόχων του, NQO1 και TXNRD1 σε δείγματα κυττάρων *HeLa*. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επώαστηκαν με salubrinal για 24h, έγινε απομόνωση ολικού RNA και πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων του NRF2, του NQO1 και TXNRD1 με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης (ACTB). Στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με salubrinal (24h) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων NRF2, NQO1 και TXNRD1 σε σχέση με τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς (απουσία salubrinal) (Εικόνα 24).

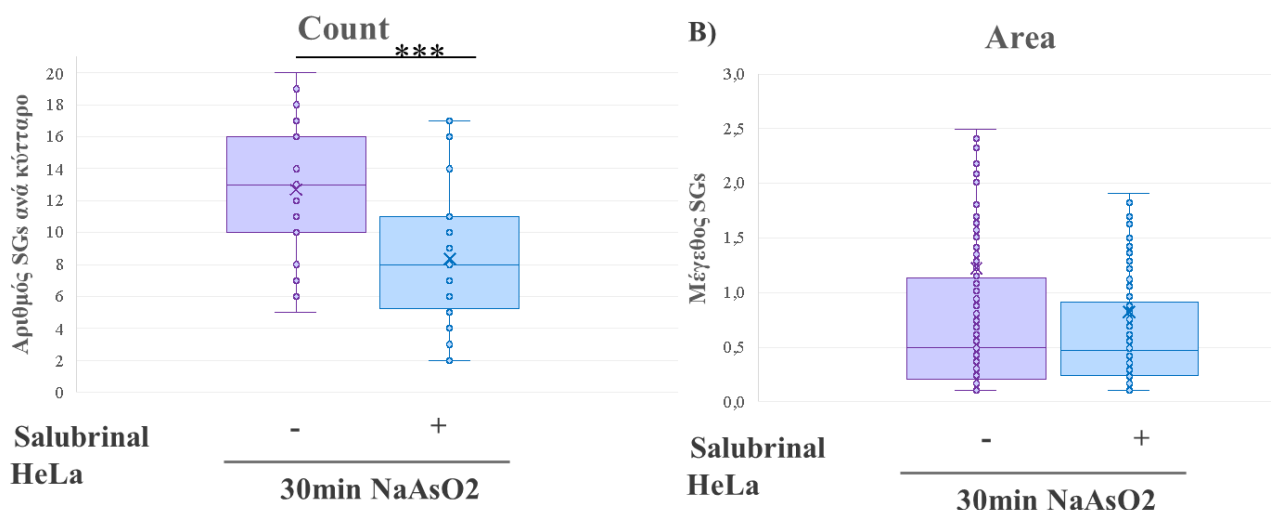


Εικόνα 24: Επίδραση του salubrinal στα επίπεδα mRNA των γονιδίων NRF2 και των γονιδίων στόχων του NQO1 και TXNRD1 σε κυττάρων HeLa. Σχετική έκφραση του NRF2 και των γονιδίων στόχων του NQO1 και TXNRD1 με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σύμφωνα με τη συνθήκη αναφοράς (συνθήκη Control). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το γονίδιο της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος 2-4 πειραμάτων που αναλύθηκαν εις διπλούν. (*** $P < 0.001$ και ** $P < 0.01$).

Για τη μελέτη της επίδρασης του salubrinal στο σχηματισμό κοκκίων του στρες, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με salubrinal (20μM) για 24 ώρες και έπειτα με NaAsO₂ (0,5mM) για 30 λεπτά. Για τον εντοπισμό του σχηματισμού κοκκίων του στρες χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη G3BP1. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X και 100X και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες.



Εικόνα 25: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa που επώαστηκαν με Salubrinal και NaAsO₂. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse και anti-mouse IgG. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h με salubrinal (20μM) και έπειτα για 30 λεπτά με NaAsO₂ (0,5mM). Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση 40X και 100X.



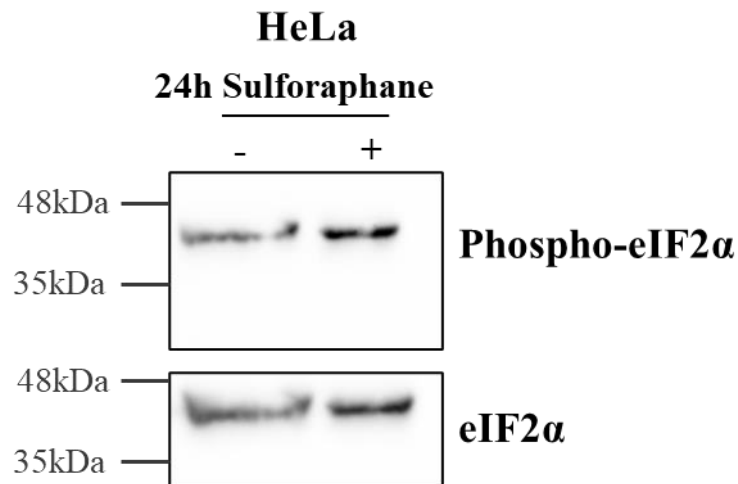
Εικόνα 26: Επίδραση του Salubrinal στο σχηματισμό κοκκίων του στρες. Κύτταρα επωάστηκαν με NaAsO_2 (0,5mM) για 30 λεπτά παρουσία ή απουσία salubrinal. Ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες με το πρόγραμμα ImageJ.. A) Αριθμός SGs στα κύτταρα που επωάστηκαν με salubrinal και NaAsO_2 για 30 λεπτά. B) Περιοχή που καλύπτεται ανά κοκκίο (***) ($P < 0.001$).

Στα κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με salubrinal (24h) και NaAsO_2 (30min) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των κοκκίων του στρες σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (30min NaAsO_2). Από την άλλη υπήρχε μικρή μείωση στο μέγεθος των κοκκίων στα κύτταρα που επωάστηκαν με salubrinal (24h) και NaAsO_2 (30min) σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (30min NaAsO_2), χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνες 25 και 26).

4.2. Μελέτη της επίδρασης του Sulforaphane στον παράγοντα NRF2 και στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα HeLa

Το sulforaphane είναι ενεργοποιητής του παράγοντα NRF2 και χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του μονοπατιού NRF2/KEAP1 στο σχηματισμό κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa. Έγινε επώαση των κυττάρων με sulforaphane (7,5μM) για 24h και ελέγχθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης pEIF2α σε κύτταρα HeLa. Τα ολικά εκχυλίσματα των πρωτεϊνών, που παρασκευάστηκαν αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του eIF2α. Τα εκχυλίσματα των πρωτεϊνών των κυττάρων που είχαν

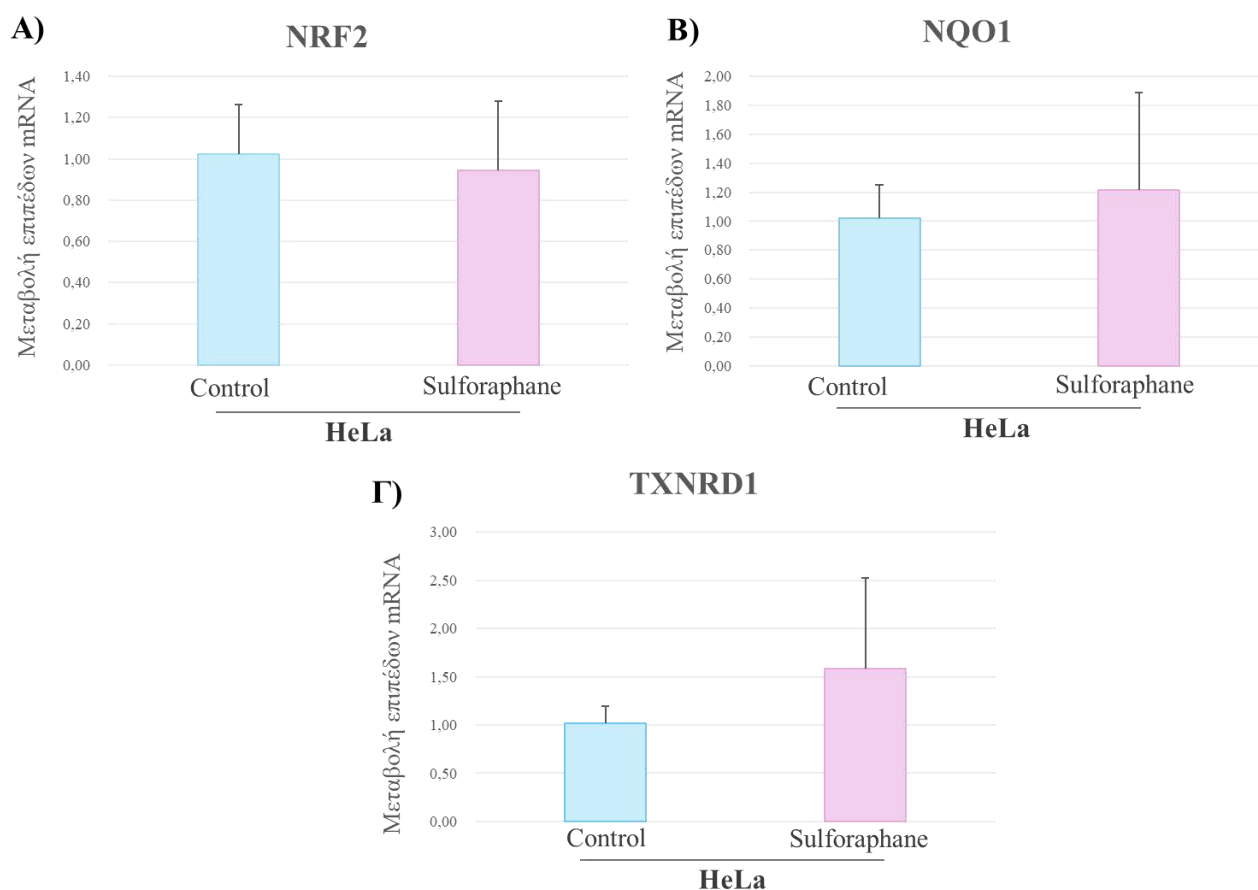
επωαστεί με sulforaphane παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p-eIF2α σε σχέση με τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς (control), όπως φαίνεται στην *Εικόνα 27*.



Εικόνα 27: Έλεγχος των επιπέδων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p-eIF2α με ανοσοαποτύπωση κατά western σε κύτταρα HeLa. Έλεγχος φωσφορυλίωσης του eIF2α σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία ή απουσία sulforaphane. Ο eIF2α χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του sulforaphane στα επίπεδα mRNA του γονιδίου NRF2 και των γονιδίων στόχων του, NQO1 και TXNRD1 σε δείγματα κυττάρων HeLa, με επώαση των κυττάρων με sulforaphane (7,5μM) για 24h, με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης (ACTB).

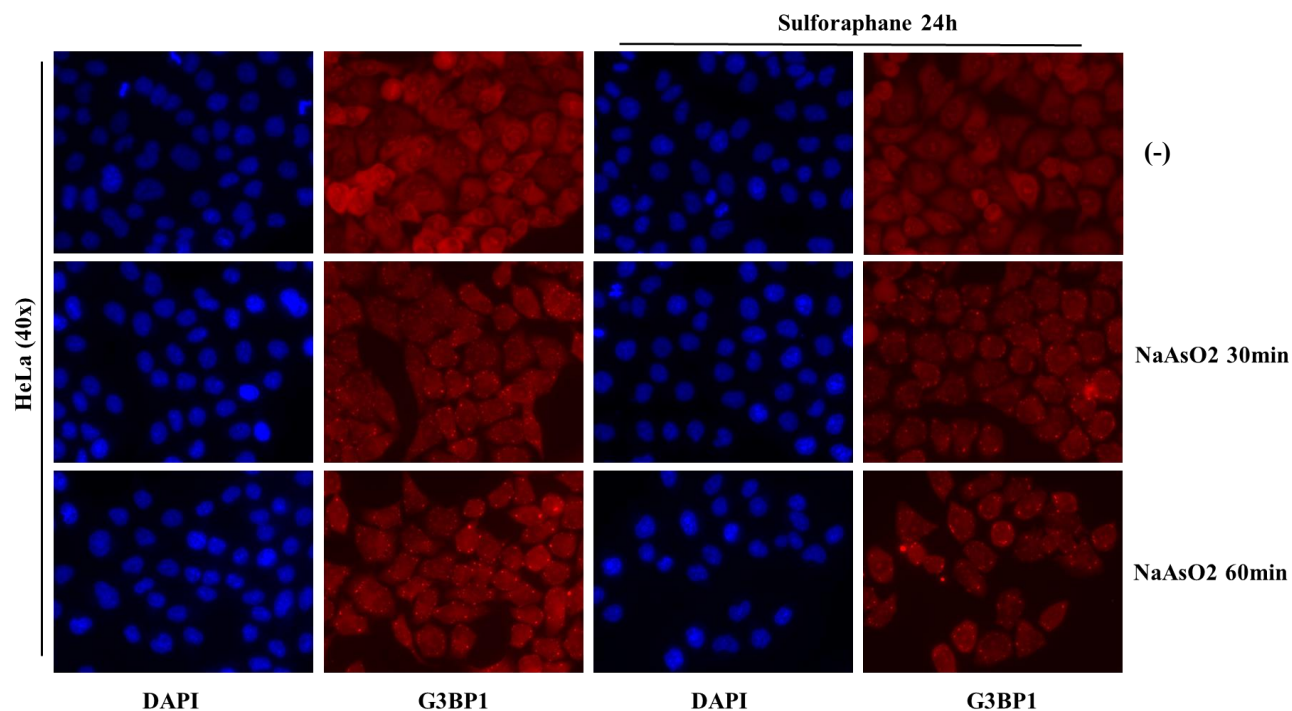
Στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με sulforaphane (24h) παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των mRNA των γονιδίων NQO1 και TXNRD1, σε σχέση με τα κύτταρα control η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Από την άλλη, τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου NRF2 παρέμειναν σταθερά στις δύο συνθήκες που μελετήθηκαν. (*Εικόνα 28*).



Εικόνα 28: Επίδραση του sulforaphane στα επίπεδα mRNA των γονιδίων NRF2 και γονιδίων στόχων του NQO1 και TXNRD1 σε κυττάρων HeLa με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σύμφωνα με τη συνθήκη αναφοράς (συνθήκη Control). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το γονίδιο της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 5 πειραμάτων που αναλύθηκαν εις διπλούν.

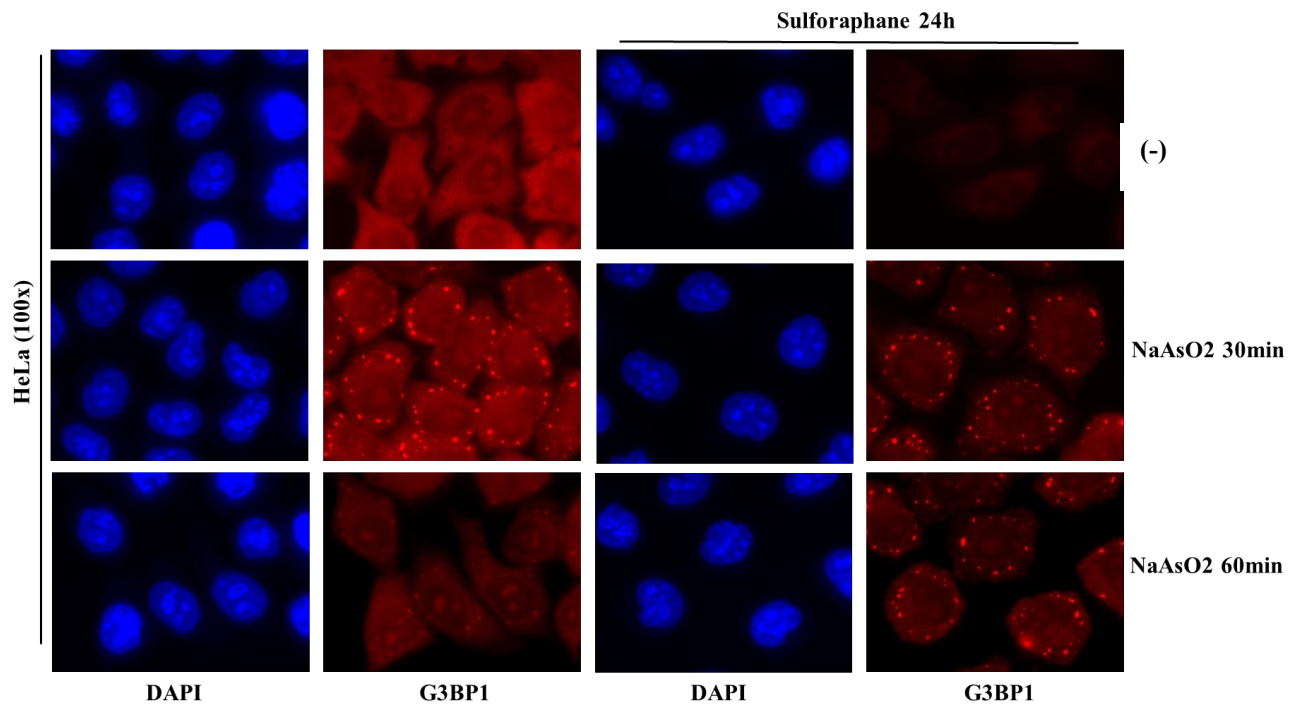
Για τη μελέτη του σχηματισμού κοκκίων του στρες, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά. Ο σχηματισμός κοκκίων του στρες επιβεβαιώθηκε με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης G3BP1 στα κύτταρα. Με παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40X), επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός κοκκίων του στρες στα κύτταρα που επώαστηκαν με NaAsO₂ για 0, 30 και 60 λεπτά με NaAsO₂ (Εικόνα 29). Για τη μελέτη της επίδρασης του sulforaphane στο σχηματισμό κοκκίων του στρες, κύτταρα HeLa επώαστηκαν με sulforaphane (7,5μM) για 24h και έπειτα, με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (40X). Στην Εικόνα 29 φαίνεται ότι στη συνθήκη αναφοράς (απουσία NaAsO₂), παρουσία ή απουσία sulforaphane στα κύτταρα δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κοκκίων του στρες.

Ενώ, τα κύτταρα που επωάστηκαν με NaAsO_2 για 30 και 60 λεπτά, παρουσία ή απουσία sulforaphane (24h) σχημάτισαν κοκκία του στρες.

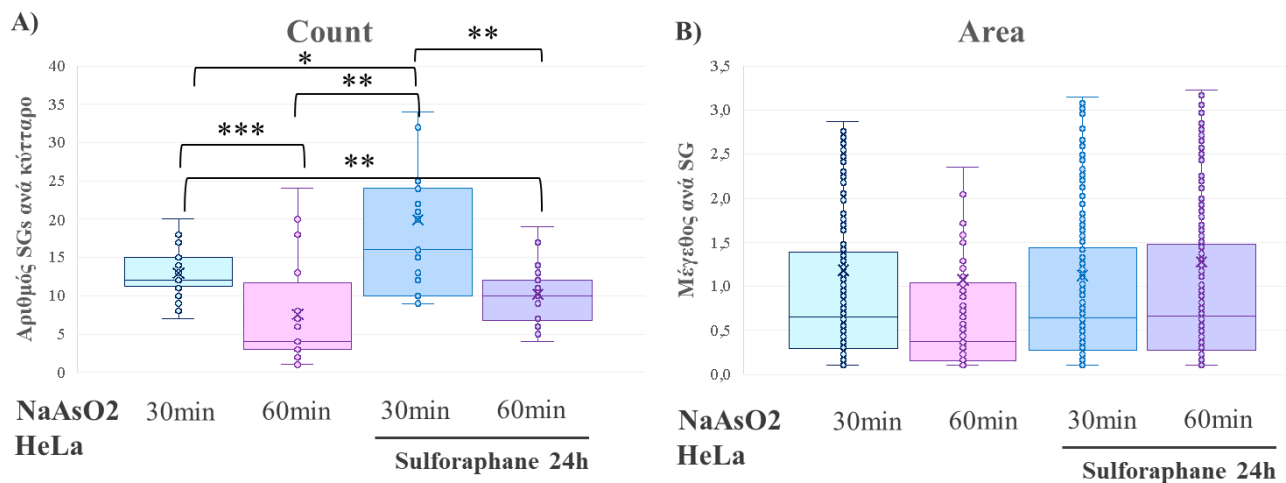


Εικόνα 29: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa που επωάστηκαν με Sulforaphane και NaAsO_2 . Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 0, 30 και 60 λεπτά με NaAsO_2 (0,5mM) παρουσία ή απουσία sulforaphane (7,5μM) για 24h. Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση 40X.

Στη συνέχεια, έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο για την ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100X και μετρήθηκε ο αριθμός των κοκκίων ανά κύτταρο και το μέγεθός τους.



Εικόνα 30: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa που επωάστηκαν με Sulforaphane και NaAsO₂. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 0, 30 και 60 λεπτά με NaAsO₂ (0,5mM) παρουσία ή απουσία sulforaphane (7,5μM) για 24h. Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση 100X.



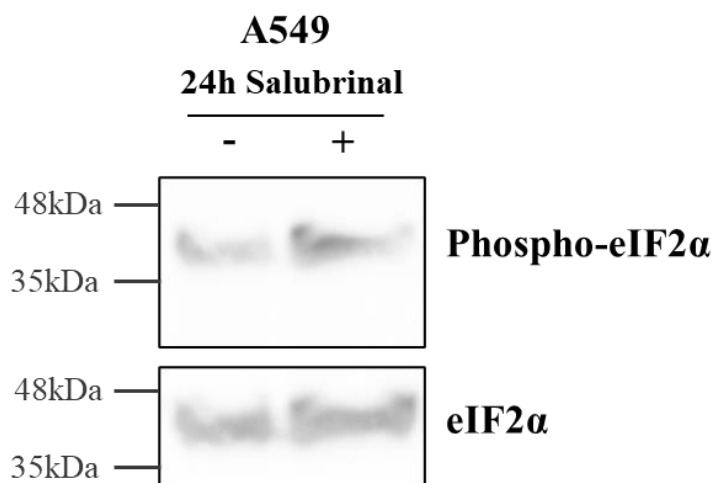
Εικόνα 31: Επίδραση του sulforaphane στο σχηματισμό κοκκίων του στρες. Κύτταρα επωάστηκαν με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά παρουσία ή απουσία sulforaphane. Ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες με το πρόγραμμα ImageJ.. A) Αριθμός SGs B) Περιοχή που καλύπτεται ανά κοκκίο (***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

Η ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες στα κύτταρα με NaAsO₂ έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των κοκκίων στα κύτταρα με επίδραση NaAsO₂ για 60 λεπτά σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με NaAsO₂ για 30 λεπτά, όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενα πειράματα. Κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς (Control) δε σχημάτισαν κοκκία του στρες. Επίσης, τα κύτταρα με επίδραση sulforaphane (24h) και 30 λεπτά NaAsO₂ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κοκκίων του στρες σε σχέση με τα κύτταρα στην ίδια συνθήκη χωρίς sulforaphane. Από την άλλη, τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με sulforaphane (24h) και NaAsO₂ για 60 λεπτά, δεν παρουσίασαν μεταβολή στον αριθμό των κοκκίων που σχημάτισαν σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με NaAsO₂ για 60 λεπτά (*Εικόνα 31-A*). Η μέτρηση του μεγέθους των κοκκίων του στρες στις διάφορες συνθήκες δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στο μέγεθος των κοκκίων που σχηματίστηκαν (*Εικόνα 31-B*).

4.3. Μελέτη της επίδρασης του Salubrinal στο μονοπάτι NRF2/KEAP1 και στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα A549

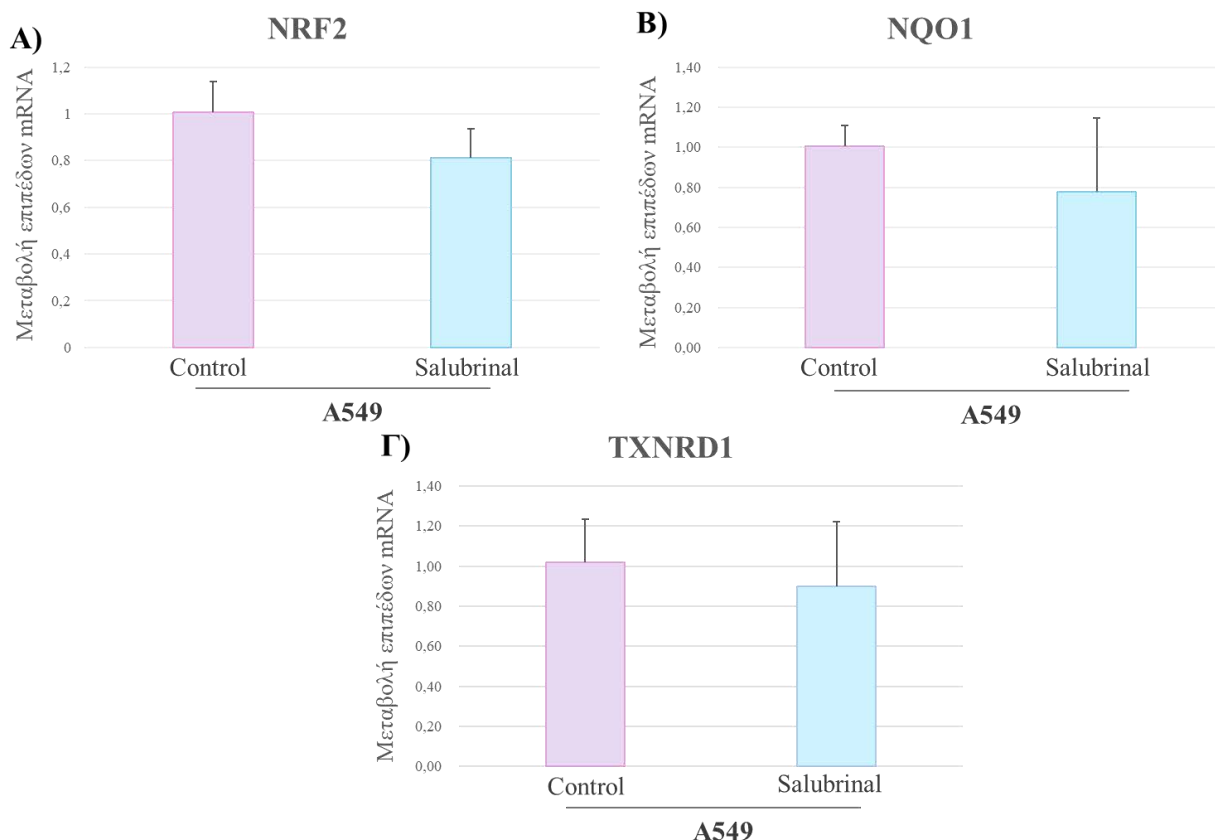
Για την περαιτέρω έρευνα της δράσης του salubrinal στο σχηματισμό κοκκίων του στρες, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε κύτταρα A549, στα οποία το μονοπάτι του NRF2 είναι συνεχώς ενεργοποιημένο. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν με salubrinal στις κατάλληλες συνθήκες και έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p-eIF2α, κύτταρα A549 έγινε επώαση με Salubrinal για 24h και παρασκευή ολικών εκχυλισμάτων πρωτεϊνών από τα κύτταρα, τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του eIF2α. Στην *Εικόνα 32* φαίνεται ότι τα κύτταρα που επώαστηκαν με salubrinal παρουσίασαν αυξημένη την πρωτεΐνη του p-eIF2α σε σχέση με τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς (control).



*Εικόνα 32: Έλεγχος των επιπέδων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης *peIF2α* με ανοσοαποτύπωση κατά western σε κύτταρα A549, παρουσία ή απουσία salubrinal (24h). Ο *eIF2α* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.*

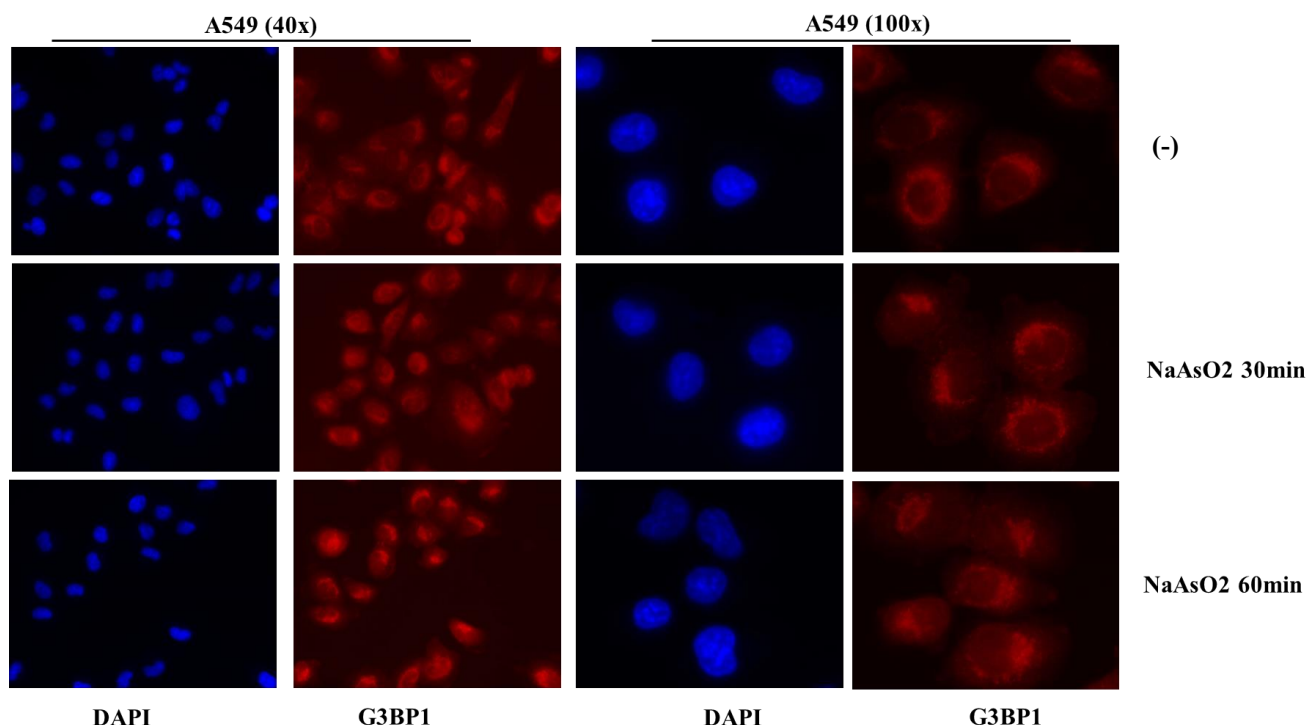
Έπειτα, μελετήθηκε η επίδραση του salubrinal στα επίπεδα mRNA του γονιδίου NRF2 και των γονιδίων στόχων του, NQO1 και TXNRD1, με επώαση κυττάρων A549 με salubrinal (20μM) για 24h, με τη μέθοδο της RT-qPCR. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης (ACTB).



Εικόνα 33: Επίδραση του salubrinal στα επίπεδα mRNA των γονιδίων NRF2 και των γονιδίων στόχων του NQO1 και TXNRD1 σε κυττάρων A549. Σχετική έκφραση του NRF2 και των γονιδίων στόχων του NQO1 και TXNRD1 με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σύμφωνα με τη συνθήκη αναφοράς (συνθήκη Control). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το γονίδιο της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 2 πειραμάτων που αναλύθηκαν εις διπλούν.

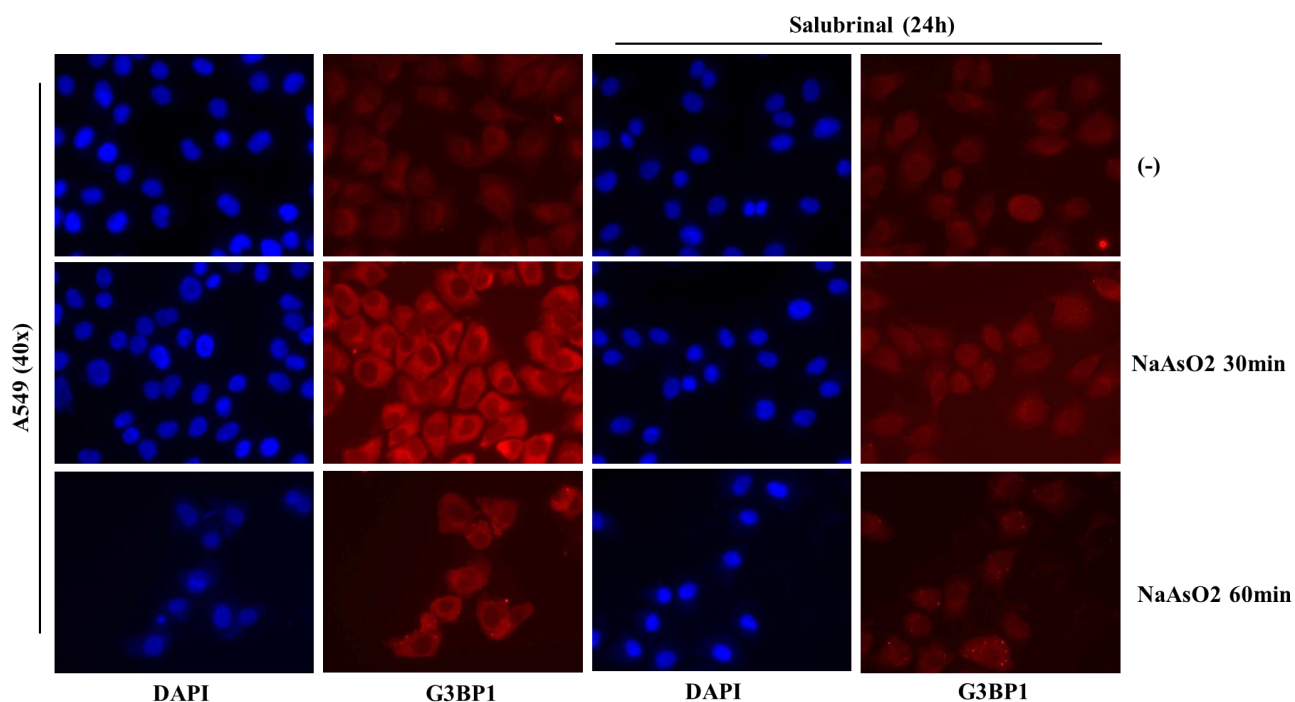
Στην *Εικόνα 33* φαίνεται πως τα κύτταρα που επωάστηκαν με salubrinal για 24h δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή των mRNA του παράγοντα NRF2 και των γονιδίων NQO1 και TXNRD1, σε σχέση με τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς (control).

Για τη μελέτη του σχηματισμού κοκκίων του στρες και τη μέτρηση του αριθμού και του μεγέθους των κοκκίων τα κύτταρα επωάστηκαν με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Για την παρατήρηση του σχηματισμού κοκκίων του στρες χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη G3BP1. Στην *Εικόνα 34* δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κοκκίων του στρες στα κύτταρα στην συνθήκη αναφοράς (απουσία NaAsO₂) και στα κύτταρα με επίδραση NaAsO₂ για 30 λεπτά. Ωστόσο, εντοπίστηκε σχηματισμός κοκκίων στα κύτταρα που επωάστηκαν με NaAsO₂ (60 λεπτά).



Εικόνα 34: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα A549 που επωάστηκαν με NaAsO₂. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse και anti-mouse IgG. Τα κύτταρα επωάστηκαν με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά. Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση 40X και 100X.

Το πείραμα επαναλήφθηκε και κύτταρα A549 επωάστηκαν απουσία ή παρουσία salubrinal (20μM) για 24h και NaAsO₂ (0,5mM) για 0,30 και 60 λεπτά και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (Εικόνα 35). Οι εικόνες από το μικροσκόπιο έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων που εμφάνισαν κοκκία του στρες και βρέθηκε ότι στα κύτταρα A549 που επωάστηκαν με NaAsO₂ για 0 και 30 λεπτά και salubrinal (24h) απουσία NaAsO₂ δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κοκκίων του στρες. Κοκκία του στρες σχηματίστηκαν σε κύτταρα που επωάστηκαν με NaAsO₂ για 60 λεπτά παρουσία και απουσία salubrinal. Από την άλλη, κοκκία του στρες σχηματίστηκαν και στα κύτταρα που επωάστηκαν με salubrinal (24h) και NaAsO₂ για 30 λεπτά (Πίνακας 5).



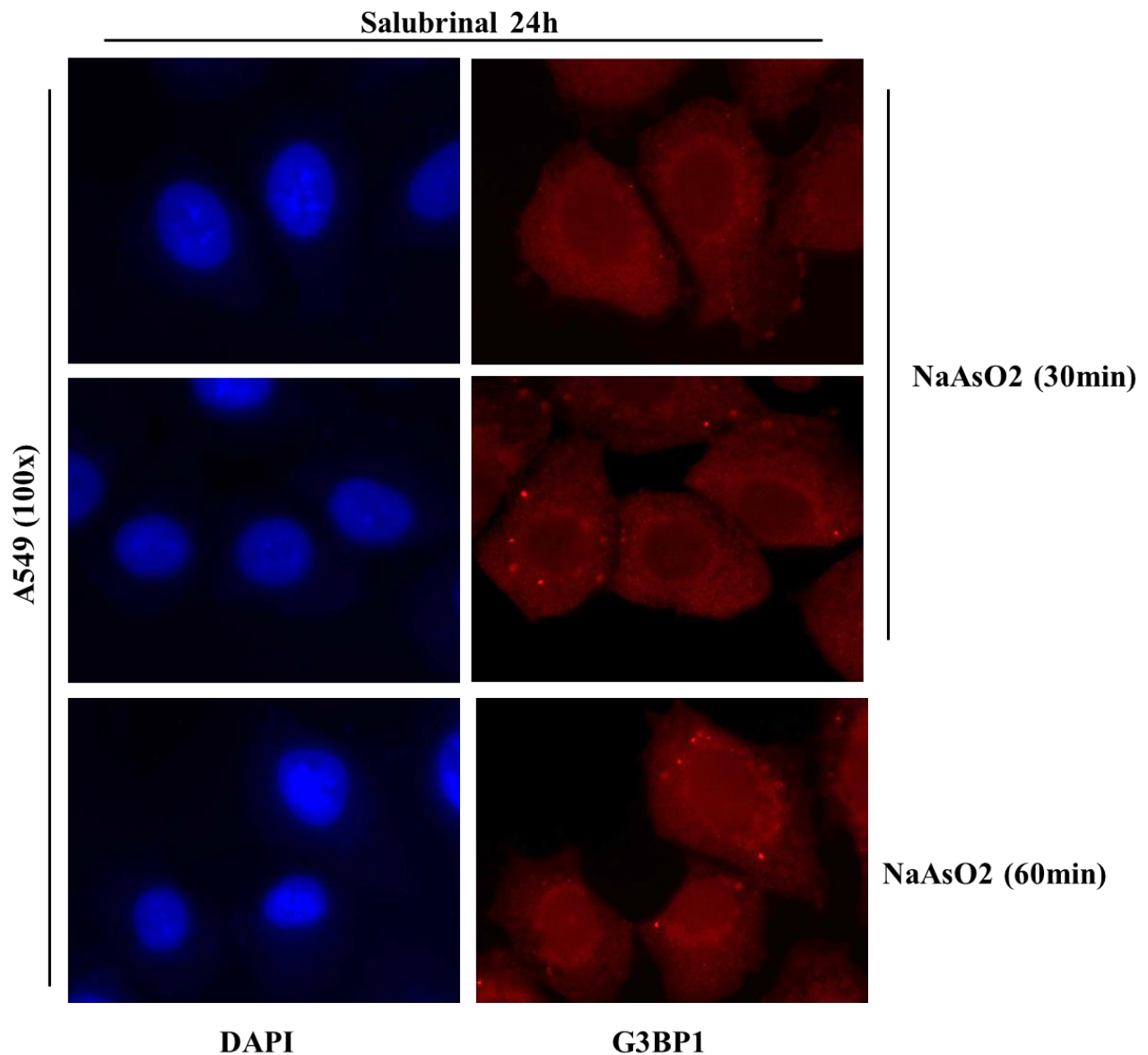
Εικόνα 35: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα A549 που επωάστηκαν με NaAsO₂. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse και anti-mouse IgG. Τα κύτταρα επωάστηκαν με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά. Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI. Τα κύτταρα φαίνονται σε μεγέθυνση 40X.

Συνθήκη	A549	Κύτταρα με SGs	% Κυττάρων με SGs
Control	291	0	0
30min NaAsO ₂	320	0	0
60min NaAsO ₂	78	51	65,38461538
Salubrinal (24h)	173	0	0
Salubrinal (24h) - 30min NaAsO ₂	227	32	14,0969163
Salubrinal (24h) - 60min NaAsO ₂	103	39	37,86407767

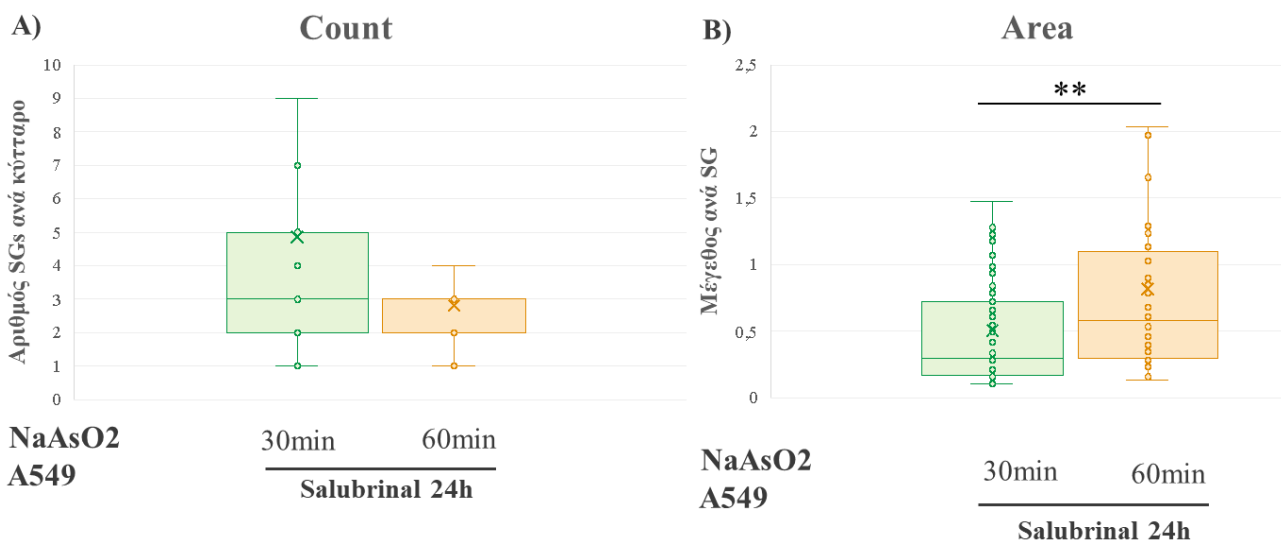
Πίνακας 5: Ποσοστό κυττάρων που εμφάνισαν κοκκία του στρες όταν επωάστηκαν με NaAsO₂ (0,5mM) για 0, 30 και 60 λεπτά.

Για την ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες στα κύτταρα A549, πραγματοποιήθηκε επώαση με salubrinal (20μM) για 24h και την επόμενη μέρα με NaAsO₂ (0,5mM) για 30 και 60 λεπτά. Τα

κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 100X και μετρήθηκε ο αριθμός και το μέγεθος των κοκκίων που σχηματίστηκαν.



Εικόνα 36: Σχηματισμός κοκκίων του στρες σε κύτταρα A549 που επωάστηκαν με Salubrinal (20μM) και NaAsO₂ (0,5mM) για 30 και 60 λεπτά. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse. Η χρώση των πυρήνων έγινε με χρωστική DAPI.



Εικόνα 37: Επίδραση του salubrinal στο σχηματισμό κοκκίων του στρες. Κύτταρα επωάστηκαν με salubrinal και NaAsO₂ (0,5mM) για 30 και 60 λεπτά. Ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες με το πρόγραμμα ImageJ.. A) Αριθμός SGs στα κύτταρα που επωάστηκαν με salubrinal και NaAsO₂ για 30 και 60 λεπτά. B) Περιοχή που καλύπτεται ανά κοκκίο (**P < 0.01).

Τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με salubrinal (24h) και NaAsO₂ (60 λεπτά) παρουσίασαν μειωμένο αριθμό σχηματισμού κοκκίων του στρες σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με salubrinal (24h) και NaAsO₂ (30 λεπτά), αλλά η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Από την άλλη, τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με salubrinal (24h) και NaAsO₂ (60 λεπτά) παρουσίασαν σημαντική αύξηση στο μέγεθος σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με salubrinal (24h) και NaAsO₂ (30 λεπτά).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την αντιμετώπιση διαφόρων συνθηκών στρες που αντιμετωπίζουν, με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης και την επιβίωσή τους. Αυτό συμβαίνει με την ενεργοποίηση του ISR, το οποίο οδηγεί σε γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης των mRNA των κυττάρων μέσω της φωσφορυλίωσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης *peIF2α* και το σχηματισμό κοκκίων του στρες. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ενεργοποιείται το μονοπάτι NRF2/KEAP1, όπου ο παράγοντας NRF2 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων για την επιβίωση των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι τα παραπάνω μονοπάτια παίζουν σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον των καρκινικών όγκων όπου συμμετέχουν πολλές φορές στην ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση διαφόρων τύπων καρκίνου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του μονοπατιού NRF2/KEAP1 με το μονοπάτι ISR και η επίδρασή τους στο σχηματισμό κοκκίων του στρες σε καρκινικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa και A549 επώαστηκαν με NaAsO₂, salubrinal και sulforaphane και μελετήθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού ISR και του παράγοντα NRF2 και ο σχηματισμός κοκκίων του στρες. Παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα HeLa επάγεται η ενεργοποίηση του NRF2 όταν επωαστούν με salubrinal για 24h, καθώς παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα mRNA των γονιδίων NRF2, NQO1 και TXNRD1. Από την άλλη, το salubrinal δεν επηρέασε το μονοπάτι NRF2/KEAP1 σε κύτταρα A549 όταν επώαστηκαν για 24 ώρες. Όταν κύτταρα HeLa επώαστηκαν με sulforaphane (24h) δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των mRNA των γονιδίων NRF2 και NQO1, ενώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου TXNRD1. Τέλος, η ποσοτικοποίηση των κοκκίων του στρες, παρουσίασε μειωμένο αριθμό κοκκίων σε κύτταρα HeLa που επώαστηκαν με NaAsO₂ για 60 λεπτά, σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί στο μισό χρόνο. Όταν κύτταρα HeLa επώαστηκαν με NaAsO₂ (30 λεπτά) παρουσία salubrinal (20μM) για 24h και παρουσίασαν μειωμένο αριθμό κοκκίων σε σχέση με κύτταρα που είχαν επωαστεί με NaAsO₂ (30 λεπτά) απουσία salubrinal, συμπεραίνοντας ότι το salubrinal επηρεάζει το σχηματισμό των κοκκίων του στρες σε κύτταρα HeLa. Πιο συγκεκριμένα, το ISR βρέθηκε ότι αλληλοεπιδρά με το σύστημα NRF2/KEAP1 και επηρεάζουν το σχηματισμό κοκκίων του στρες. Επιπλέον, κύτταρα A549 που είχαν επωαστεί με salubrinal (24h) και NaAsO₂ (60 λεπτά), παρουσίασαν μικρότερο αριθμό κοκκίων του στρες σε σχέση με κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με NaAsO₂ (60 λεπτά). Αντιθέτως, κύτταρα A549 που επώαστηκαν με salubrinal (24h) και NaAsO₂ (30 λεπτά) παρατηρήθηκε ότι σχημάτισαν

κοκκία του στρες, ενώ κύτταρα A549 με NaAsO₂ (30 λεπτά), χωρίς επίδραση salubrinal δεν εμφάνισαν σχηματισμό κοκκίων του στρες, συμπεραίνοντας ότι το salubrinal επηρεάζει το σχηματισμό κοκκίων του στρες σε κύτταρα A549. Επομένως, σε κύτταρα HeLa, όπου το μονοπάτι του NRF2 έχει ενεργοποιηθεί μέσω της επώασης των κυττάρων με salubrinal και έχει επαχθεί ο σχηματισμός κοκκίων του στρες με επώαση των κυττάρων με NaAsO₂, παρατηρήθηκε σχηματισμός μικρότερου αριθμού κοκκίων του στρες σε σχέση με τα ίδια κύτταρα που επώαστηκαν με NaAsO₂ απουσία salubrinal. Ωστόσο, σε κύτταρα A549, όταν επώαστηκαν με NaAsO₂ για 30 λεπτά δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κοκκίων του στρες, σε αντίθεση με τα κύτταρα που επώαστηκαν πρώτα με salubrinal για 24h και έπειτα με NaAsO₂ για 30 λεπτά, στα οποία παρατηρήθηκαν κοκκία του στρες στο μικροσκόπιο. Από την άλλη, έγινε προσπάθεια μελέτης της επίδρασης του μονοπατιού NRF2/KEAP1 στο σχηματισμό κοκκίων του στρες μέσω της επώασης κυττάρων HeLa με sulforaphane (24h), το οποίο αποτελεί ενεργοποιητή του παράγοντα NRF2. Τα κύτταρα που επώαστηκαν με sulforaphane (24h) και NaAsO₂ (30 λεπτά) παρουσίασαν αυξημένο αριθμό κοκκίων του στρες σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με NaAsO₂ (30 λεπτά), απουσία sulforaphane. Κατά συνέπεια, σε κύτταρα HeLa, η δράση του sulforaphane φάνηκε να αυξάνει το σχηματισμό κοκκίων του στρες. Μολονότι, η επώαση των δύο κυτταρικών σειρών στις διάφορες συνθήκες που μελετήθηκαν στην εργασία έδειξε να επηρεάζει τον αριθμό των κοκκίων που σχηματίστηκαν ανά συνθήκη, τα πειράματα δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές στο μέγεθος των κοκκίων. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε διαφορετική αλληλεπίδραση του ISR με το μονοπάτι NRF2/KEAP1 και το σχηματισμό κοκκίων του στρες στα κύτταρα A549 από ότι στα HeLa, πιθανώς γιατί στα A549 το μονοπάτι NRF2 είναι συνεχώς ενεργοποιημένο.

Όπως γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία, η ενεργοποίηση του ISR και του μονοπατιού NRF2/KEAP1 είναι δύο αποκρίσεις των κυττάρων σημαντικές για την διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και την επιβίωσή τους σε συνθήκες στρες. Ο σχηματισμός, λοιπόν, των κοκκίων του στρες είναι σημαντικός για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, συνεπώς η εύρεση παραγόντων ή συνθηκών οι οποίες επηρεάζουν το σχηματισμό τους μπορούν να βοηθήσουν στην ανακάλυψη πιθανών θεραπειών για διάφορους τύπους καρκίνων. Σε έρευνες που έγιναν στο παρελθόν παρατηρήθηκε σύνδεση μεταξύ του ISR και του μονοπατιού NRF2/KEAP1, καθώς η επώαση κυττάρων με salubrinal έδειξε αύξηση των επιπέδων των mRNA γονιδίων στόχων του NRF2 και του ATF4 παράλληλα, όπως και εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης του NRF2 και του ATF4.^[12] Επίσης, η ενεργοποίηση του μονοπατιού NRF2/KAEP1 μέσω της επίδρασης του salubrinal,

βρέθηκε ότι μειώνει τον αριθμό των κοκκίων του στρες που σχηματίζονται, πιθανώς μειώνοντας την κυτταροπροστατευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, όπως έχει βρεθεί και σε παρόμοιες έρευνες, όπου η επίδραση του salubrinal σε καρκινικά κύτταρα αύξησε την ευαισθησία τους σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.^[59]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Peker, N, Gozuacik, D, Autophagy as a Cellular Stress Response Mechanism in the Nervous System, *JMB*, (2020), v.432(8), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.017>.
2. Fulda, S, Gorman, A M, et all, Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death, *International Journal of Cell Biology*, (2010), v.2010(1), doi: <https://doi.org/10.1155/2010/214074>.
3. Kultz, D, Molecular and Evolutionary basis of the cellular stress RESPONSE, *Annual Review of Physiology*, (2005) v.67, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>.
4. Kroemer, G, et all, Autophagy and the Integrated Stress Response, *Mol. Cell*, (2010) v.40(2), doi: <https://doi.org/10.1016%2Fj.molcel.2010.09.023>.
5. Ryoo, H. D, The integrated stress response in metabolic adaptation, *J. Biol. Chem*, (2024), v.300(4), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107151>.
6. Costa-Mattioli, et all, The integrated stress response: From mechanism to disease, *Science*, (2020), v.368(6489), doi: <https://doi.org/10.1126/science.aat5314>.
7. Kalinin, A, et all, Integrated Stress Response (ISR) Pathway: Unraveling Its Role in Cellular Senescence, *Int J Mol Sci*, (2023), v.24(24), doi: <https://doi.org/10.3390%2Fijms242417423>.
8. Pavitt, G D, Regulation of translation initiation factor eIF2B at the hub of the integrated stress response, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, (2018), v.9(6), doi: <https://doi.org/10.1002/wrna.1491>.
9. Pakos-Zebrucka, K et all, The integrated stress response, *EMBO Reports*, (2016), v.17(10), doi: 10.15252/embr.201642195.
10. Ghaddar, N, et all, The integrated stress response is tumorigenic and constitutes a therapeutic liability in KRAS-driven lung cancer, *Nat Commun*, (2021), v.12(1), doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24661-0>.
11. Lines, C L, et all, The integrated stress response in cancer progression: a force for plasticity and resistance, *Front Oncol*, (2023), v.13, doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1206561>.

12. Kreß, J K C, Jessen, C, et al, The integrated stress response effector ATF4 is an obligatory metabolic activator of NRF2, *Cell Reports*, (2023), v.42, doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112724>.
13. Merrick, W. C., Pavitt, G. D., Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells, *Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells*, v.10(12), doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033092>.
14. Gray, N. K., Wickens, M, Control of translation initiation in animals, *Annu Rev Cell Dev Biol*, (1998), v.14, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.399>.
15. Van der Knaap, S M, et al, Therapy Trial Design in Vanishing White Matter: An Expert Consortium Opinion, *Neurol. Genet*, (2022), v.8(2), doi: <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000657>.
16. Tian, X, Zhang, S, Zhou, L, et al, Targeting the Integrated Stress Response in Cancer Therapy, *Front Pharmacol*, (2021) v.12, doi: <https://doi.org/10.3389%2Ffphar.2021.747837>.
17. Licari, E, et al, The two faces of the Integrated Stress Response in cancer progression and therapeutic strategies, *Int J Biochem Cell Biol.*, (2021), v.139, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106059>.
18. Song, M. Grabocka, E, Stress Granules in Cancer, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, (2024), v.185, doi: https://doi.org/10.1007/112_2020_37.
19. Gao, X, et al, Stress granule: A promising target for cancer treatment, *Br J Pharmacol*, (2019), v.176(23), doi: <https://doi.org/10.1111%2Fbph.14790>.
20. Wang, L et al, Response to stress in biological disorders: Implications of stress granule assembly and function, *Cell Prolif*, (2021), v.54(8), doi: <https://doi.org/10.1111/cpr.13086>.
21. Riggs, C L, et al, Mammalian stress granules and P bodies at a glance, *J Cell Sci*, (2020), v.133(16), doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.242487>.
22. Marcelo, A., et al, Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation?, *Cell Death Dis*, (2021), v.12(592), doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03873-8>.
23. Tolay, N, Buchberger, A, Role of the Ubiquitin System in Stress Granule MetaboWsm, *Int J Mol Sci*, (2022), v.23(7), doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23073624>.

24. Youn, J, et all, (Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes, *Mol Cell*, (2019), v.76(2), doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.014>.
25. Reza Asadi, M, et all, Stress Granules Involved in Formation, Progression and Metastasis of Cancer: A Scoping Review, *Front Cell Dev Biol.*, (2021), v.9, doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.745394>.
26. Cao, X. Jin, X. Liu, B. (2020), The involvement of stress granules in aging and aging-associated diseases, *Aging Cell*, v.19, doi: <https://doi.org/10.1111/accel.13136>.
27. Hofmann, S, et all, Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, (2021), v.1868(1), doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118876>.
28. Protter, DS W, et all, Principles and Properties of Stress granules, *Trends Cell Biol*, (2017), v.26(9), doi: <https://doi.org/10.1016%2Fj.tcb.2016.05.004>.
29. Campos-Melo, et all, The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function, *Fron Cell Dev Biol*, (2021) v.9, doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.621779>.
30. Buchan, JR, et all, Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation, *Mol Cell*, (2009), v.36(6), doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.020>.
31. Baird, L, et all, The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway, *Mol Cell Biol*, (2020), v.40(13), doi: <https://doi.org/10.1128%2FMCB.00099-20>.
32. Kansanen, E, et all, The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer, *Redox Biol*, (2013), v.1(1), doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>.
33. Dinkova-Kostova, A T, et all, KEAP1/NRF2 as a druggable target, *Arh. Farm*, (2018), v.73, doi: <https://doi.org/10.5937/arhfarm73-43475>.
34. Li, R et all, Regulation of NRF2 Signaling, *React Oxyg Species*, (2019), v.8(24)
35. Cuadrado, A, Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3 β -TrCP, *Free Radical Biology and Medicine*, (2015) v.88, doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029>.
36. Yu, C et all, The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging, *Oxid. Med. Cel. Longev.*, (2021) doi: <https://doi.org/10.1155/2021/6635460>.

37. Crisman, E, et al, KEAP1-NRF2 protein-protein interaction inhibitors: Design, pharmacological properties and therapeutic potential, *Med Res Rev*, (2023), v.43(1), doi: <https://doi.org/10.1002/med.21925>.
38. Kitamura, H, Motohashi, H, NRF2 addiction in cancer cells, *Cancer Sci*, (2018), v.109(4), doi: <https://doi.org/10.1111/cas.13537>.
39. Rojo de la Vega, M et al, NRF2 and the Hallmarks of Cancer, *Cancer Cell*, (2018), v.34(1), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>.
40. Dodson, M, et al, CHML is an NRF2 target gene that regulates mTOR function, *Mol Oncol*, (2022), v.16(8), doi: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13194>.
41. Suzuki, T et al, Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway, *Trends Pharmacol Sci*, (2013), v.34(6), doi: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.04.005>.
42. Soghli, N, et al, NRF2 signaling pathway: A comprehensive prognostic and gene expression profile analysis in breast cancer, *Pathol Res Pract*, (2023), v.243, doi: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154341>.
43. Ross, D. Siegel, D, The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control, *Redox Biol*, (2021), v.41, doi: <https://doi.org/10.1016%2Fj.redox.2021.101950>.
44. Arner, E. Chapter Five - Targeting the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 for Anticancer Therapy, *Advances in Cancer Research*, (2017), v.136, doi: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.07.005>.
45. Nadeem, A, et al, Dysregulated Nrf2 signaling in response to di(2-ethylhexyl) phthalate in neutrophils of children with autism, *Int. Immun.*, (2022), v.106, doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108619>.
46. Quinti L, et al, KEAP1 modifying small molecule reveals muted NRF2 signaling responses in neural stem cells from Huntington's disease patients, *Proc Natl Acad Sci USA*, (2017), v.114(23), doi: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.1614943114>.
47. Paupe V, et al, Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in Friedreich ataxia, *PloS One*, (2009), v.4(1), doi: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0004253>.
48. Shin, J, et al, Genetic risk score combining six genetic variants associated with the cellular NRF2 expression levels correlates with Type 2 diabetes in the human population, *Genes Genomics*, (2019), v.41(5), doi: <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00791-0>.

49. Ji, G, et al, Functional Polymorphism in the NFE2L2 Gene Associated with Tuberculosis Susceptibility, *Front Immunol*, (2021), v.12, <https://doi.org/10.3389%2Ffimmu.2021.660384>.
50. Von Otter, et al, Association of Nrf2 encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease, *BMC Med Genet*, (2010), v. 11(36), doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-36>.
51. Shin, J, et al, Genetic risk score combining six genetic variants associated with the cellular NRF2 expression levels correlates with Type 2 diabetes in the human population, *Genes Genomics*, (2019), v.41(5), doi: <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00791-0>.
52. Chen, Y, et al, Genetic analysis of NFE2L2 promoter variation in Taiwanese Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat Disord*, (2013), v.19(2), doi: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.10.018>.
53. Gui, Y, et al, NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease, *Oncotarget*., (2016), v.7(10), doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7353>.
54. Yamamoto, M, et al, The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis, *Physiol Rev*, (2018), v.98(3), doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017>.
55. Adinolfi, S, et al, The KEAP1-NRF2 pathway: Targets for therapy and role in cancer, *Redox Biol*, (2023), v.63, doi: <https://doi.org/10.1016%2Fj.redox.2023.102726>.
56. Malhotra, JD, Kaufman, RJ, Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?, *Antioxidants Redox KoSignal*, (2007), v.9(12), doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>.
57. DeNicola, GM, et al, NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer, *Nat. Genet.*, (2015), v.47(12), doi: <https://doi.org/10.1038/ng.3421>.
58. Jessen, C, et al, Oncogenic KRAS Regulates Amino Acid Homeostasis and Asparagine Biosynthesis via ATF4 and Alters Sensitivity to L-Asparaginase, *Cancer Cell*, (2018), v.33(1), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.12.003>.
59. Jia, Y. Jia, R. et al, (2024), Stress granules in cancer: Adaptive dynamics and therapeutic implications, *iScience*, v.27(8), doi: <https://doi.org/10.1016%2Fj.isci.2024.110359>.

60. Dinkova-Kostova, A. et al., KEAP1 and NRF2: Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane, *Trends in Food Science & Technology*, (2017), v.69 (part B), doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.002>.