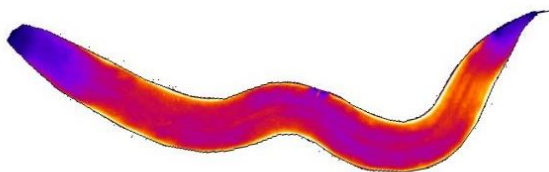




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

Διερεύνηση των πρωτεολυτικών μηχανισμών διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης στη φυσιολογία και γήρανση του νηματώδους



Ειρήνη Χ. Ταουκτσή

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Καλλιόπη Συντυχάκη, Ερευνήτρια Γ' ΙΙΒΕΑΑ

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ



Αθήνα
2023

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Διερεύνηση των πρωτεολυτικών μηχανισμών διατήρησης
της κυτταρικής ομοιόστασης στη φυσιολογία και γήρανση του νηματώδους

“Investigation of the proteolytic mechanisms maintaining cellular homeostasis
in the physiology and aging of the nematode”

Ειρήνη Χ. Ταουκτσή

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σταμάτης Ρήγας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Καλλιόπη Συντυχάκη, Ερευνήτρια Γ' ΙΙΒΕΑΑ

Γεράσιμος Δάρας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Μανώλης Φλεμετάκης, Καθηγητής ΓΠΑ

Χρήστος Ζέρβας, Ερευνητής Β' ΙΙΒΕΑΑ

Γεράσιμος Βουτσινάς, Ερευνητής Α' ΙΒΕ «Δημόκριτος»

Διερεύνηση των πρωτεολυτικών μηχανισμών διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης στη φυσιολογία και γήρανση του νηματώδους

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Περίληψη

Η μιτοχονδριακή πρωτεάση LONP-1/LONP1 ανήκει στην οικογένεια των εξελικτικά συντηρημένων ATP-εξαρτώμενων πρωτεϊνών (πρωτεάσες AAA⁺) και έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του μιτοχονδριακού πρωτεώματος και λειτουργίας των μιτοχονδρίων, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε στρεσογόνες συνθήκες. Σε αυτή τη μελέτη διερευνώνται οι επιπτώσεις που έχει η έλλειψη του γονιδίου *lonp-1* στη φυσιολογία, γήρανση, βιωσιμότητα σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλά και στη δράση κύριων μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου του οργανισμού, χρησιμοποιώντας ως οργανισμό μοντέλο το νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Η έλλειψη του *lonp-1* προκαλεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στον νηματώδη, με αποτέλεσμα την καθυστερημένη ανάπτυξη και μειωμένη διάρκεια ζωής. Επιπλέον, λόγω απώλειας της LONP-1 ενεργοποιούνται σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες και κυτταρικοί μηχανισμοί απόκρισης στο μιτοχονδριακό στρες, όπως η αντιοξειδωτική απόκριση (AR), η απόκριση στο θερμικό στρες (HSR/UPR^{cyt}) και τα μιτοχονδριακά μονοπάτια UPR (UPR^{mt}) και PMK-3/p38 MAPK (MAPK^{mt}). Ως συνέπεια αυτών, οι μεταλλαγμένοι, για τη LONP-1, νηματώδεις (μεταλλάγματα *lonp-1*) είναι ανθεκτικοί σε πολλά είδη οξειδωτικού στρες, στο οσμωτικό και το θερμικό στρες, συγκριτικά με τους νηματώδεις αγρίου τύπου. Η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* σε κάθε είδος στρες εξαρτάται από την ενεργοποίηση διαφορετικών, αλλά αλληλένδετων, μηχανισμών απόκρισης που πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία. Σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των *lonp-1* στο οξειδωτικό στρες έχει ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1/ATF5, που είναι ο κύριος ενεργοποιητής του UPR^{mt} και ρυθμίζει την ενεργότητα άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο SKN-1/NRF και ο DAF-16/FOXO. Αντίθετα, η θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* είναι ανεξάρτητη της δράσης του ATFS-1, και εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα HSF-1/HSF1 που ρυθμίζει την HSR. Επίσης, η ανθεκτικότητα των *lonp-1* και στο οξειδωτικό και θερμικό στρες, φάνηκε να απαιτεί την κίνηση PMK-3/p38. Μέχρι σήμερα, ο ρόλος της ισομορφής PMK-3, που διαφέρει από την ισομορφή PMK-1 του κανονικού μονοπατιού p38/MAPK, στην διασφάλιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας ήταν άγνωστος. Παρότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της PMK-3 ενεργοποιείται στα μεταλλάγματα *lonp-1*, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του ATFS-1 δρα κατασταλτικά στην πλήρη ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK^{mt}. Ωστόσο και τα δύο μονοπάτια απαιτούνται για τη φυσιολογική ανάπτυξη, διάρκεια ζωής και απόκριση στο οξειδωτικό στρες των ατόμων *lonp-1*, υποδηλώνοντας πως η συντονισμένη δράση των δύο μονοπατιών είναι απαραίτητη σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες. Ακόμη, η σηματοδότηση του MAPK^{mt} απαιτείται για τη δράση του bZip μεταγραφικού παράγοντα ZIP-2, που είναι γνωστός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής ομοιόστασης κατά τη γήρανση, τόσο σε αγρίου τύπου όσο και *lonp-1* άτομα. Επομένως, η μελέτη αυτή αποκαλύπτει έναν νέο ρόλο του μονοπατιού MAPK^{mt} στην απόκριση στο οξειδωτικό και θερμικό στρες, και αναδεικνύει την αλληλεπίδραση των ρυθμιστικών μηχανισμών που ενορχηστρώνουν την απόκριση στο μιτοχονδριακό στρες από την απώλεια της LONP-1, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την πολύπλοκη βιολογία της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της προσαρμογής στο στρες και της γήρανσης.

Επιστημονική Περιοχή: Μοριακή Γενετική της Γήρανσης

Λέξεις-κλειδιά: Γήρανση, Μιτοχονδριακό στρες, Πρωτεάση LONP-1, Νηματώδης *C. elegans*

Investigation of the proteolytic mechanisms maintaining cellular homeostasis in the physiology and aging of the nematode

Department of Biotechnology
Laboratory of Molecular Biology

Abstract

The mitochondrial LONP-1/LONP1 protease belongs to the family of evolutionarily conserved ATP-dependent proteases (AAA⁺ proteases) and has an important role in the maintenance of the mitochondrial proteome and mitochondrial function, both under normal and stress conditions. In this study, we investigate the effects of *lonp-1* gene deficiency on physiology, aging, viability under adverse environmental conditions, and the activity of major quality control mechanisms in the organism, using the nematode *Caenorhabditis elegans* as model system. Deletion of *lonp-1* causes mitochondrial dysfunction and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the nematode, resulting in delayed growth and reduced lifespan. In addition, loss of LONP-1 activates important transcription factors and cellular response mechanisms to mitochondrial stress, such as the antioxidant response (AR), the heat stress response (HSR/UPR^{cyt}), the mitochondrial UPR (UPR^{mt}) and the PMK-3/p38 MAPK (MAPK^{mt}) pathways. As a consequence, LONP-1 mutant nematodes (*lonp-1* mutants) are resistant to many types of oxidative stress, to osmotic stress and heat shock, compared to wild-type nematodes. The resistance of *lonp-1* mutants to each type of stress depends on the activation of different, but interconnected, response mechanisms that act in balance. The transcription factor ATFS-1/ATF5, which is the main activator of UPR^{mt}, has an important role in *lonp-1* resistance to oxidative stress and regulates the activity of other transcription factors, such as SKN-1/NRF and DAF-16/FOXO. In contrast, the thermotolerance of *lonp-1* mutants is independent of ATFS-1 activation, but depends on the transcription factor HSF-1/HSF1, which regulates the HSR. Furthermore, the resistance of *lonp-1* to both oxidative and heat shock stress appears to require the PMK-3/p38 kinase. To date, the role of the PMK-3 isoform, which differs from the PMK-1 isoform of the canonical p38/MAPK pathway, in ensuring mitochondrial function was unknown. Although the PMK-3 signaling pathway is activated in *lonp-1* mutants, the simultaneous activation of ATFS-1 acts to suppress the full activation of the MAPK^{mt} pathway. However, both pathways are required for normal growth, lifespan and response to oxidative stress in *lonp-1* mutants, suggesting that the coordinated action of both pathways is essential under conditions of mitochondrial stress. Moreover, MAPK^{mt} signaling is required for the activity of the bZip transcription factor ZIP-2, a known regulator of mitochondrial homeostasis during aging, in both wild-type and *lonp-1* worms. Therefore, this study reveals a novel role for the MAPK^{mt} pathway in the oxidative and heat stress responses, and highlights the interplay of the regulatory mechanisms that orchestrate the response to mitochondrial stress by the loss of LONP-1, providing valuable insights into the complex biology of mitochondrial function, stress adaptation and aging.

Scientific area: Molecular Genetics of Aging

Keywords: Aging, Mitochondrial stress, LONP-1 protease, Nematode *C. elegans*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω....

την Δρ. Πόπη Συντυχάκη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διδακτορική διατριβή μου στο εργαστήριο της, για την καθημερινή επίβλεψη και συνεισφορά της στην εκπαίδευσή μου...

την ευχαριστώ θερμά που πίστεψε σε μένα και με υποστήριξε μέχρι το τέλος αυτής της διατριβής,

τον Δρ. Σταμάτη Ρήγα για την πολύτιμη καθοδήγησή του στην παρούσα διατριβή, αλλά και την υποστήριξή του σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου μέχρι και σήμερα,

τον Δρ. Γεράσιμο Δάρα για την ενθάρρυνση που μου παρείχε να συνεχίσω την επιστημονική μου καριέρα και την συμμετοχή του στην συμβουλευτική επιτροπή της διατριβής μου,

τον Δρ. Γεράσιμο Βουτσινά για την άψογη συνεργασία του, που ήταν καθοριστική για την υλοποίηση αυτής της διατριβής,

τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Δρ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο, Δρ. Μανώλη Φλεμετάκη και Δρ. Χρήστο Ζέρβα για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση και διόρθωση της διατριβής μου,

τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Φοίβο Μπορμπόλη που με εκπαίδευσε στις εργαστηριακές τεχνικές και μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις του από την πολυετή του εμπειρία στο C. Elegans,

τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Ελένη Κυριακού για την υποστήριξή της εντός και εκτός του εργαστηρίου και τη συνεργασία της για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής,

την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Ράντη που ξεκινήσαμε μαζί αυτό το όμορφο ταξίδι στον κόσμο της έρευνας, για την ψυχολογική υποστήριξη και τη φιλία της,

παλιά και νέα μέλη των εργαστηρίων Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης (IIBEAA) και Μοριακής Καρκινογένεσης & Γενετικής Σπανίων Παθήσεων (Δημόκριτος) για τη συνεισφορά τους σε αυτό το ερευνητικό έργο και που διευκόλυναν την καθημερινότητα στο εργαστήριο,

τη Μαρία Κοντοπάνου για την απεριόριστη κατανόηση και την υποστήριξη που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της ζωής μου, ενθαρρύνοντας κάθε μου προσπάθεια,

τον Χρήστο Καμάρα που είναι καθημερινά δίπλα μου και με κινητοποιεί, για την ακλόνητη πίστη του σε μένα και που η παρουσία του μου έδωσε δύναμη για την συγγραφή αυτής της διατριβής,

τους φίλους μου που ανέχονταν τα διαστήματα σιωπής σε περιόδους υψηλού φόρτου και η παρουσία και στήριξή τους είχε καθοριστικό ρόλο στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της διατριβής,

του γονείς μου Χρήστο Ταουκσή και Αμαλία Μακρή που με ενθάρρυναν σε όλη μου τη ζωή να κυνηγήσω τα όνειρά μου, άκουγαν τα παράπονά μου και συνεισέφεραν με τον τρόπο τους στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής,

την αδερφή μου Αργυρώ, που είναι το πρότυπό μου και είναι πάντα δίπλα μου να με στηρίζει και να με παροτρύνει να εξελιχθώ.

.....στη μνήμη του παππού μου Δημήτρη Μακρή

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), υπό την καθημερινή επίβλεψη της Δρ. Πόπης Συντυχάκη, την καθοδήγηση του Δρ. Σταμάτη Ρήγα και τις συμβουλές του Δρ. Γεράσιμου Δάρα. Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ), στο πλαίσιο της Δράσης: «1^η Προκήρυξη Ερευνητικών Έργων ΕΛΙΔΕΚ για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού», με τίτλο έργου «Η πρωτεάση LON στη γήρανση και τον καρκίνο».

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
A. Εισαγωγή.....	11
A.1. Η Γήρανση.....	11
A.1.1. Τα χαρακτηριστικά της γήρανσης.....	11
A.1.1.1. Πρωτογενή χαρακτηριστικά.....	12
A.1.1.2. Ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά.....	14
A.1.1.3. Ολιστικά χαρακτηριστικά.....	16
A.1.2. Τα μιτοχόνδρια στη γήρανση.....	17
A.1.2.1. Χαρακτηριστικά και λειτουργία.....	18
A.1.2.2. Οξειδωτική βλάβη και γήρανση.....	20
A.1.2.3. Επικοινωνία με πυρήνα.....	21
A.2. Οι Μηχανισμοί Ποιοτικού Ελέγχου.....	24
A.2.1. Οι μιτοχονδριακές πρωτεάσες.....	24
A.2.1.1. Η μιτοχονδριακή πρωτεάση LONP1.....	25
A.2.2. Ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με το σύστημα ουβικουιλίνης-πρωτεασώματος (UPS).....	29
A.2.2.1. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι αποικοδόμησης (MAD).....	30
A.2.3. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι απόκρισης στις κακώς ή μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPR ^{mt}).....	31
A.2.4. Τα μονοπάτια ενεργοποίησης από μιτογόνα p38 MAPK.....	35
A.2.4.1. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποίησης από μιτογόνα p38 MAPK (MAPK ^{mt})... ..	35
A.2.5. Η μιτοφαγία.....	36
A.3. Ο <i>Caenorhabditis elegans</i> ως οργανισμός μοντέλο.....	37
A.3.1. Ο κύκλος ζωής.....	37
A.3.2. Η ανατομία.....	38
A.3.3. Η μελέτη της γήρανσης στον νηματώδη.....	39
A.4. Σκοπός της μελέτης.....	40
B. Μέθοδοι και Υλικά.....	42
B.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.....	42
B.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA.....	42
B.1.2. Απομόνωση ολικού RNA.....	42
B.2.1. Πολυμεράσες και εκκινητές.....	43
B.2.2. Σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-PCR.....	45

B.2.3. PCR σε ολόκληρους νηματώδεις	46
B.3. Ανάλυση Western Blot.....	46
B.4. Καλλιέργεια και αποθήκευση βακτηριακών στελεχών	48
B.5. Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	49
B.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	49
B.7. Φορείς κλωνοποίησης	49
B.8. Χειρισμοί στελεχών <i>C. elegans</i>	49
B.8.1. Καλλιέργεια, αποθήκευση και ψύξη στελεχών <i>C. elegans</i>	49
B.8.2. Παραγωγή αρσενικών ατόμων	52
B.8.3. Διασταύρωση στελεχών <i>C. elegans</i>	52
B.8.4. Στελέχη <i>C. elegans</i>	52
B.9. Αποσιώπηση γονιδίων με RNAi μέσω σίτισης.....	55
B.10. Φαινοτυπική ανάλυση.....	56
B.11. Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής	56
B.12. Δοκιμασίες επιβίωσης σε στρες	57
B.13. Μικροσκοπική ανάλυση	58
B.13.1. Μέτρηση επιπέδων ROS.....	58
B.13.2. Χρώση με MitoTracker	59
B.14. Στατιστική ανάλυση	59
Γ. Αποτελέσματα	60
Γ.1. Χαρακτηρισμός της πρωτεάσης LON και του στελέχους απώλειας της λειτουργίας της στο <i>C. elegans</i>	60
Γ.1.1. Το στέλεχος <i>lonp-1</i> χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη ανάπτυξη, υπογονιμότητα και μειωμένη διάρκεια ζωής.....	61
Γ.1.2. Το στέλεχος <i>lonp-1</i> εμφανίζει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και αυξημένη παραγωγή ROS	63
Γ.2. Μελέτη της ενεργοποίησης μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i>	66
Γ.2.1. Ενεργοποίηση του UPR ^{mt} μέσω του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1 στα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i>	67
Γ.2.2. Ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i>	71
Γ.2.3. Ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό στρες στα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i> ..	74
Γ.2.4. Η έλλειψη της LONP-1 επηρεάζει την επιβίωση του νηματώδους σε διάφορα είδη περιβαλλοντικού στρες.....	76
Γ.2.4.1. Η απόκριση των μεταλλαγμάτων <i>lonp-1</i> στο οξειδωτικό στρες	76
Γ.2.4.2. Τα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i> είναι ανθεκτικά στο οσμωτικό στρες.....	78
Γ.2.4.3. Η έλλειψη της LONP-1 προσδίδει ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες	79

Γ.2.4.4. Η ανοσολογική απόκριση στα μεταλλάγματα <i>lonp-1</i> δεν βοηθά στην επιβίωσή τους σε παθογόνο	82
Γ.2.4.5. Η φαρμακολογική αναστολή της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της πρωτεάσης LONP-1 επάγει μιτοχονδριακούς και κυτταροπλασματικούς μηχανισμούς διατήρησης της πρωτεόστασης	83
Γ.2.5. Ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού p38/ MAPK μέσω του σηματοδοτικού καταρράκτη κινασών DLK-1/SEK-3/PMK-3.....	86
Γ.2.5.1. Η ενεργοποίηση του ATF5-1 αναστέλλει το μονοπάτι MAPK ^{mt}	87
Γ.2.5.2. Ο ATF5-1 αναστέλλει την επαγωγή του <i>cbp-3</i> στο στέλεχος <i>lonp-1</i>	88
Γ.2.5.3. Το μονοπάτι MAD δεν απαιτείται για την επαγωγή του MAPK ^{mt} στο στέλεχος <i>lonp-1</i>	90
Γ.2.5.4. Η κινάση PMK-3 απαιτείται για την επαγωγή των γονιδίων ανοσίας στο στέλεχος <i>lonp-1</i>	91
Γ.2.5.5. Το μονοπατιού MAPK ^{mt} απαιτείται για τη διάρκεια ζωής και την απόκριση στο στρες των μεταλλαγμάτων <i>lonp-1</i>	92
Δ. Συζήτηση	98
Ε. Βιβλιογραφία	106
Παράρτημα	130

A. Εισαγωγή

A.1. Η Γήρανση

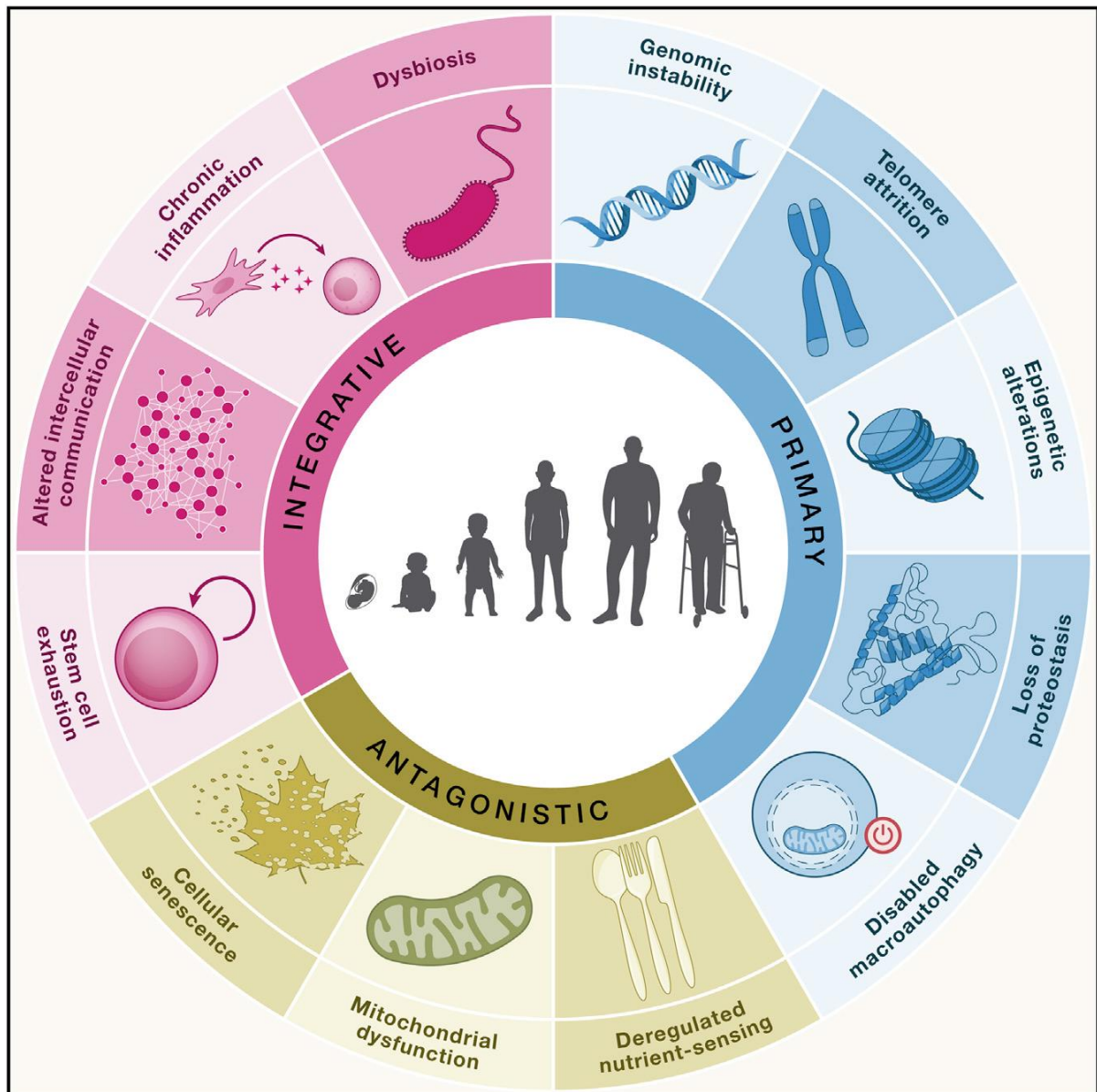
Η διαδικασία της γήρανσης είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο με τεράστιο υγειονομικό και κοινωνικό αντίκτυπο στον άνθρωπο, που έχει απασχολήσει από επιστήμονες και ιατρούς έως φιλοσόφους από αρχαιοτάτων χρόνων. Η γήρανση είναι μια πολύπλευρη διαδικασία που περιλαμβάνει όλες τις αλλαγές που μπορεί να συμβούν στη διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Αναλόγως την προσέγγιση με την οποία την εξετάζει κανείς, η διαδικασία της γήρανσης μπορεί να περιλαμβάνει τόσο το πέρασμα του χρόνου και τις επιπτώσεις της στην υγεία, όσο και τις μοριακές και κυτταρικές αλλαγές που προκύπτουν από αυτή. Η μειωμένη γονιμότητα και η αύξηση του προσδόκιμου ζωής στις ανεπτυγμένες χώρες οδηγούν σε έναν ολοένα αυξανόμενο γηράσκοντα πληθυσμό, απαιτώντας στρατηγικές για την βελτίωση της ποιότητας ζωής αυτών των ατόμων και κάνοντας επιτακτική την κατανόηση αυτής της πολύπλοκης διαδικασίας.

Η βιολογική γήρανση είναι το αποτέλεσμα της συσσώρευσης κυτταρικής βλάβης λόγω της σταδιακής παρακμής των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην επιδείνωση της κυτταρικής λειτουργίας. Η γονιδιωματική αστάθεια, η μείωση των τελομερών και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι μεταξύ των χαρακτηριστικών της βιολογικής γήρανσης και συνδέονται στενά με την ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ο καρκίνος. Η ανάπτυξη παρεμβάσεων για την προώθηση της υγιούς γήρανσης, λαμβάνοντας υπόψη ερευνητικές μελέτες σε οργανισμούς μοντέλα, οδήγησαν στον προσδιορισμό και την κατηγοριοποίηση των βασικών χαρακτηριστικών της γήρανσης, τα οποία θα αναφερθούν στη συνέχεια.

A.1.1. Τα χαρακτηριστικά της γήρανσης

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα της γήρανσης των τελευταίων χρόνων και η πολυπλοκότητα της διαδικασίας της γήρανσης, έκανε επιτακτική την κατηγοριοποίηση των κυτταρικών και μοριακών χαρακτηριστικών της γήρανσης. Για την κατανόηση της γήρανσης των θηλαστικών, λαμβάνοντας υπ' όψη και μελέτες που έχουν συμβεί σε κατώτερους οργανισμούς μοντέλα (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), προέκυψαν εννέα χαρακτηριστικά της γήρανσης (López-Otín et al., 2013) τα οποία προσφάτως επεκτάθηκαν σε δώδεκα αλληλεξαρτώμενα χαρακτηριστικά (Εικόνα A1-1) (López-Otín, Blasco, et al., 2023). Τα χαρακτηριστικά αυτά πληρούν τρία βασικά κριτήρια: (1) εκδηλώνονται κατά τη φυσιολογική γήρανση, (2) η πειραματική εξασθένησή τους επιταχύνει τη γήρανση, (3) παρεμβάσεις που τα βελτιώνουν επιβραδύνουν ή σταματούν τη διαδικασία της γήρανσης.

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της γήρανσης έχουν ταξινομηθεί σε τρεις κατηγορίες (López-Otín et al., 2013): (1) τα πρωτογενή (primary) που έχουν καθαρά αρνητικό χαρακτήρα και αποτελούν τα αρχικά αίτια της γήρανσης, (2) τα ανταγωνιστικά (antagonistic) που μπορεί να είναι είτε ευεργετικά είτε προοδευτικά επιβλαβή ανάλογα με την έντασή τους και ο αρνητικός τους χαρακτήρας προωθείται και επιταχύνεται από τα πρωτογενή και (3) τα ολιστικά (integrative) χαρακτηριστικά που εμφανίζονται όταν η συσσώρευση των βλαβών από τις δύο προηγούμενες κατηγορίες δεν αντισταθμίζεται από τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς και συντελεί στην εμφάνιση των φαινοτύπων της γήρανσης.



Εικόνα Α.1-1. Τα καθοριστικά χαρακτηριστικά της διαδικασίας της γήρανσης (López-Otín, Blasco, et al., 2023).

Α.1.1.1. Πρωτογενή χαρακτηριστικά

Α.1.1.1(i) Γονιδιωματική αστάθεια (Genomic instability)

Εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες προκαλούν συσσώρευση βλαβών στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA που απειλούν την ακεραιότητα και τη σταθερότητα του γονιδιώματος, ένα φαινόμενο που έχει συσχετιστεί με τη φυσιολογική αλλά και παθολογική γήρανση (Forsberg et al., 2012; Moskalev et al., 2013; Park & Larsson, 2011; Vijg & Dong, 2020). Οι γενετικές βλάβες που προκαλούνται περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, διαγραφές, μετατοπίσεις, ανευπλοειδίες, φθορά τελομερών, ελαττώματα στην αρχιτεκτονική δομή του πυρήνα, γονιδιακές διαταραχές που προκαλούνται από την ενσωμάτωση ιών ή τρανσποζόνια και παρατηρούνται σε γερασμένα άτομα (Dechat et al., 2008; Hoeijmakers, 2009; Ragnauth et al., 2010). Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA που έχουν αναπτυχθεί στον οργανισμό χάνουν την αποτελεσματικότητά τους με την ηλικία εντείνοντας τη γονιδιωματική βλάβη και η μείωση της αποτελεσματικότητάς τους έχει συνδεθεί με πολλά σύνδρομα προγηρίας στον άνθρωπο (Burtner & Kennedy, 2010; Miller et al., 2021).

A.1.1.1(ii) Φθορά τελομερών (Telomere attrition)

Η φθορά των τελομερών αποτελεί μια υποκατηγορία βλαβών του DNA που συμβάλλει στη γήρανση και στις ασθένειες που συνδέονται με την ηλικία (Blackburn et al., 2015) και θεωρείται ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης που είναι διαχωρίσιμο από τη γονιδιωματική αστάθεια (López-Otín, Pietrocola, et al., 2023). Οι DNA πολυμεράσες αδυνατούν να ολοκληρώσουν την αντιγραφή γραμμικών μορίων DNA, οπότε η αντιγραφή των τελομερικών περιοχών του ευκαρυωτικού DNA επιτελείται από μια ειδική πολυμεράση, την τελομεράση. Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα δεν εκφράζουν την τελομεράση, οπότε σε κάθε κύκλο αντιγραφής το μήκος των τελομερών υφίσταται σταδιακή μείωση (Ολονίκων, 1996). Επομένως τα τελομερή φθείρονται σταδιακά κατά την πάροδο της ηλικίας, καθώς δεν είναι προσβάσιμα στους βασικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Αυτό συμβαίνει λόγω ενός προστατευτικού συμπλόκου πρωτεϊνών, τις σελετρίνες, που προστατεύουν τα τελομερή από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και τα χρωμοσώματα από την ένωση των άκρων τους (Palm & de Lange, 2008). Τα μακρύτερα τελομερή έχουν συνδεθεί με αυξημένη διάρκεια ζωής, ενώ τα κοντύτερα με μειωμένη, που μπορεί όμως να αντιστραφεί με την ενεργοποίηση της τελομεράσης (Armanios et al., 2009; Jaskelioff et al., 2011; Tomás-Loba et al., 2008). Επομένως το μήκος των τελομερών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής (Whittemore et al., 2019).

A.1.1.1(iii) Επιγενετικές τροποποιήσεις (Epigenetic alterations)

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβάλλουν στη γήρανση είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, αναδιοργάνωση της χρωματίνης και απορρυθμισμένη λειτουργία των μη κωδικών RNAs (ncRNAs) (Talens et al., 2012). Αυτές οι ρυθμιστικές και συχνά αναστρέψιμες αλλαγές επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και άλλες κυτταρικές διεργασίες, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη και την εξέλιξη διαφόρων ανθρώπινων παθολογιών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως ο καρκίνος, ο νευροεκφυλισμός, μεταβολικά νοσήματα και ασθένειες των οστών. Ένα ευρύ φάσμα ενζυμικών συστημάτων εμπλέκεται στη δημιουργία και διατήρηση των επιγενετικών προτύπων. Τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνουν DNA μεθυλοτρανσφεράσες, ακετυλάσες ιστονών, αποακετυλάσες, μεθυλάσες, και απομεθυλάσες, καθώς και πρωτεϊνικά σύμπλοκα που επηρεάζουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ή τη σύνθεση και ωρίμανση των ncRNA που σχετίζονται με τη γήρανση και τη διάρκεια ζωής στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, τη μύγα *Drosophila melanogaster* και ποντίκια (Fraga & Esteller, 2007; Greer et al., 2010; Han & Brunet, 2012; Kanfi et al., 2012; Mostoslavsky et al., 2006; Siebold et al., 2010).

A.1.1.1(iv) Απώλεια πρωτεόστασης (Loss of proteostasis)

Η γήρανση και διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, και ο καταρράκτης, συνδέονται με της διατάραξη της πρωτεϊνικής της ομοιόστασης ή πρωτεόστασης, που οδηγούν στη συσσώρευση κακώς ή μη διπλωμένων, οξειδωμένων, γλυκοποιημένων ή ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών που συχνά σχηματίζουν συσσωματώματα. Για τη διατήρηση της σταθερότητας και λειτουργικότητας του πρωτεώματος, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου που είτε επιστρατεύουν μοριακούς συνοδούς και πρωτεάσες για την επιδιόρθωση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είτε τις μεταφέρουν προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα και το λυσόσωμα (Hartl et al., 2011; Koga et al., 2011; Powers et al., 2009). Η δράση των μοριακών συνοδών μειώνεται σημαντικά κατά το γήρας (Calderwood et al., 2009) και συνήθως η υπερέκφραση ή η έλλειψή τους οδηγεί σε αυξημένη ή μειωμένη διάρκεια ζωής αντίστοιχα (Min et al., 2008; Morrow et al., 2004; Walker & Lithgow, 2003). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της γήρανσης, διαταράσσεται η αυτοφαγία και η

ενεργότητα του πρωτεασώματος, που είναι τα βασικά συστήματα πρωτεόλυσης του κυττάρου (Rubinsztein et al., 2011; Tomaru et al., 2012). Οι διαταραχές στην πρωτεόσταση μπορούν να επιταχύνουν τη γήρανση και οι παρεμβάσεις στους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς μπορούν να βελτιώσουν την πρωτεόσταση και ενδεχομένως να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα (Chondrogianni et al., 2014; Madeo et al., 2015).

A.1.1.1(v) Δυσλειτουργική μακροαυτοφαγία (Disabled macroautophagy)

Η μακροαυτοφαγία ή αυτοφαγία περιλαμβάνει τον εγκλωβισμό κυτταροπλασματικού υλικού ή οργανιδίων σε κυστίδια διπλής μεμβράνης και δημιουργούν το αυτοφαγόσωμα που συντήκεται με το λυσόσωμα για την αποικοδόμησή τους (Klionsky & Emr, 2000; Levine & Kroemer, 2019). Οπότε εκτός από την πρωτεόσταση, η αυτοφαγία επηρεάζει και μη πρωτεϊνικά μόρια, οργανίδια και παθογόνα-εισβολείς (Levine & Kroemer, 2019). Η αυτοφαγία είναι ένα νέο χαρακτηριστικό της γήρανσης λόγω της εξαρτώμενης από την ηλικία μείωσής της και του σημαντικού ρόλου της στον κύκλο εργασιών των υποκυτταρικών συστατικών και των κατεστραμμένων οργανιδίων. (López-Otín, Blasco, et al., 2023)

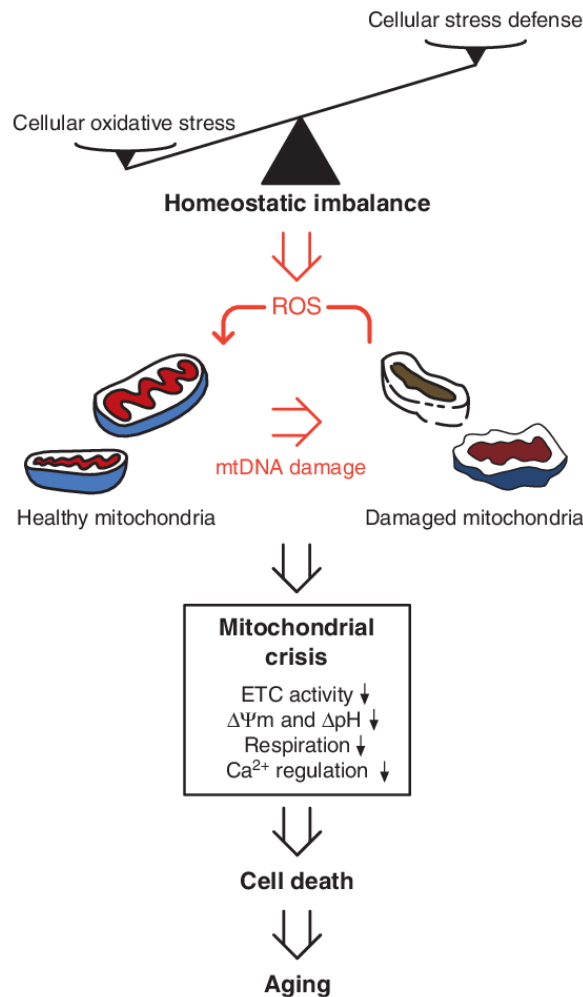
A.1.1.2. Ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά

A.1.1.2(i) Απορρυθμισμένη αντίληψη θρεπτικών (Deregulated nutrient-sensing)

Το δίκτυο ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών έχει διατηρηθεί σε υψηλό βαθμό συντήρησης κατά την εξέλιξη με τους οργανισμούς να αναπτύσσουν ποικίλα συστήματα για την ανίχνευση των επιπέδων πρόσληψης βασικών θρεπτικών συστατικών. Το ενδοκυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και του αυξητικού παράγοντα ομοιάζοντα στην ινσουλίνη-1 (Insulin/IGF-1 signaling – IIS) είναι το πιο συντηρημένο μονοπάτι που έχει συνδεθεί με τη μακροζωία και μεταξύ των πολλαπλών στόχων του είναι η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων FOXO και τα συμπλέγματα mTOR, τα οποία επίσης εμπλέκονται στη γήρανση και είναι συντηρημένα (Barzilai et al., 2012; Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010). Από την μελέτη της διατάραξης αυτών των μονοπατιών, φαίνεται πως η διάρκεια ζωής μπορεί να αυξηθεί από τη μειωμένη ανίχνευση των διαθέσιμων θρεπτικών, με τρόπο αντίστοιχο του διαιτητικού περιορισμού (Colman et al., 2009), ενώ η προώθηση αυτών των διεργασιών την επιταχύνει (Fontana et al., 2010). Με το τρόπο αυτό, η χρήση φαρμακολογικών παραγόντων, όπως η ραπαμυκίνη, που είναι μιμητικοί της μειωμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών αυξάνει τη διάρκεια ζωής ποντικών (Harrison et al., 2009).

A.1.1.2(ii) Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Mitochondrial dysfunction)

Κατά τη διαδικασία της γήρανσης αυξάνονται οι διαρροές ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα του μιτοχονδρίου δημιουργώντας δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και μειώνεται αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή της ενέργειας, που καθορίζεται από την παραγωγή μορίων ATP (Green et al., 2011). Αυτό καταλήγει στην περαιτέρω επιδείνωση της γήρανσης δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο (Εικόνα A1-2) (Hekimi et al., 2011). Υπάρχουν όμως δεδομένα που υποστηρίζουν πως όταν η αυξημένη παραγωγή ROS παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, δρα ευεργετικά στον οργανισμό επεκτείνοντας τη διάρκεια ζωής ενεργοποιώντας σηματοδοτικούς μηχανισμούς επιβίωσης στο στρες (Van Raamsdonk & Hekimi, 2009; Yang & Hekimi, 2010a; Yee et al., 2014). Αν και έχουν βρεθεί μεταλλαγές που οδηγούν σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μειώνουν τη διάρκεια ζωής χωρίς υπερπαραγωγή ROS (Edgar et al., 2009; Hekimi et al., 2011; Vermulst et al., 2008), μικρού βαθμού μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ενεργοποιεί αποκρίσεις που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής και ίσως συνδέεται με το φαινόμενο της όρμησης (*hormesis*) (Haigis & Yankner, 2010).



Εικόνα Α.1-2. Το προτεινόμενο μοντέλο της μιτοχονδριακής δυσλειτουργία κατά τη διαδικασία της γήρανσης. Οι ROS που παράγονται κατά τη φυσιολογική δραστηριότητα του κυττάρου, βλάπτουν τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς και τα αντιοξειδωτικά συστήματα του κυττάρου που προστατεύουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται στα μιτοχόνδρια με την πάροδο της ηλικίας διαταράσσει τα συστήματα ποιοτικού ελέγχου, με αποτέλεσμα τη συσσωρευμένη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και γήρανση (Seo et al., 2010).

A.1.1.2(iii) Κυτταρική γήρανση (Cellular senescence)

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να οριστεί ως η αμετάκλητη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που συνοδεύεται από χαρακτηριστικές φαινοτυπικές αλλαγές (Kuilman et al., 2010) και προκαλείται από οξεία ή χρόνια βλάβη (Gorgoulis et al., 2019). Τα γερασμένα κύτταρα ηλικιωμένων ανθρώπων συσσωρεύονται σε πολλούς ιστούς με έως 20πλάσιο ρυθμό από τα γερασμένα κύτταρα νεαρών ατόμων (Tuttle et al., 2020). Η κυτταρική γήρανση είναι το αποτέλεσμα των αλλαγών που προκύπτουν κατά τη φυσιολογική γήρανση του οργανισμού και προκαλείται κυρίως από βλάβες στο DNA, φθορά των τελομερών, διάφορα είδη κυτταρικού στρες και την καταστολή του γενετικού τόπου *INK4/ARF* (Blasco, 2005; Bodnar et al., 1998; Collado et al., 2007). Η κυτταρική γήρανση είναι ο τρόπος του οργανισμού να απομακρύνει κύτταρα με βλάβες ώστε να μην πολλαπλασιαστούν, γεγονός που ενισχύεται από το ότι η συνεχής γενετική ή φαρμακολογική εξάλειψη των γερασμένων κυττάρων παρατείνει τη διάρκεια ζωής φυσικά γερασμένων ποντικών (Xu et al., 2018). Η εξάλειψη αυτή σε ποντίκια έχει βρεθεί πως είναι θεραπευτική και για ένα εύρος ασθενειών (Robbins et al., 2021) και υποστηρίζεται πως η προοδευτική επιδείνωση της γήρανσης πιθανώς οφείλεται στην μειωμένη

ικανότητα του οργανισμού να απομακρύνει ή να αντικαταστήσει τα γερασμένα κύτταρα (Rodier & Campisi, 2011).

A.1.1.3. Ολιστικά χαρακτηριστικά

A.1.1.3(i) Εξάντληση των βλαστοκυττάρων (Stem cell exhaustion)

Ένα από τα πιο εμφανή χαρακτηριστικά της γήρανσης είναι η μείωση του αναγεννητικού δυναμικού των ιστών. (Conboy & Rando, 2012). Η εξάντληση των βλαστοκυττάρων μειώνεται κατά τη γήρανση σε διάφορους ιστούς όπως ο εγκέφαλος (Molofsky et al., 2006), τα οστά (Gruber et al., 2006) και οι σκελετικοί μύες (Conboy & Rando, 2012). Η εξάντληση των βλαστοκυττάρων μπορεί να αποβεί καταστροφική για τον οργανισμό, αλλά το ίδιο και ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός τους καθώς μπορεί να επιταχύνει την εξάντλησή τους (Rera et al., 2011). Επομένως είναι σημαντική η διατήρηση της αδράνειας (quiescence) των βλαστοκυττάρων για τη διατήρηση της μακροπρόθεσμης λειτουργικότητάς τους. Η μείωση των βλαστοκυττάρων αναδεικνύεται ως συνέπεια πολλαπλών τύπων βλάβης όπως η μειωμένη δραστηριότητα του κυτταρικού κύκλου των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων που σχετίζεται με τη συσσώρευση βλαβών στο DNA (Rossi et al., 2007) και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Janzen et al., 2006). Η συντόμευση των τελομερών αποτελεί επίσης σημαντική αιτία μείωσης των βλαστοκυττάρων με τη γήρανση σε πολλούς ιστούς (Flores & Blasco, 2010; Sharpless & DePinho, 2007). Οι θεραπείες με βλαστοκύτταρα έχουν ευρείες προοπτικές εφαρμογής στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής λόγω των εγγενών βιολογικών χαρακτηριστικών τους, όπως η πλαστικότητα, η αυτοανανέωση και η δυνατότητα διαφοροποίησής τους προς πολλές κατευθύνσεις και θα μπορούσαν να έχουν την προοπτική να καθυστερήσουν ή ακόμη και να αντιστρέψουν τη γήρανση (Chang et al., 2022).

A.1.1.3(ii) Τροποποιημένη διακυτταρική επικοινωνία (Altered intercellular communication)

Κατά τη διαδικασία της γήρανσης συμβαίνουν προοδευτικές μεταβολές στο επίπεδο της διακυτταρικής επικοινωνίας που περιλαμβάνει προβλήματα στη νευρική, νευροενδοκρινική ή ορμονική σηματοδότηση που θέτουν σε κίνδυνο την ρύθμιση της ομοιόστασης (Amorim et al., 2022; Miller et al., 2020). Με την απορρύθμιση της νευροορμονικής σηματοδότησης αυξάνεται η φλεγμονή, μειώνεται η ανοσοεπιτήρηση και αλλάζει το περι- και εξω- κυτταρικό περιβάλλον (Russell & Kahn, 2007; Zhang et al., 2013). Επιπλέον, έχειδειχθεί πως τα γερασμένα κύτταρα μπορούν να εξαπλώσουν την κυτταρική γήρανση στα γειτονικά τους κύτταρα (Nelson et al., 2012) ενώ γενετικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένους ιστούς οργανισμών μοντέλων μπορούν να αυξάνουν ή να μειώνουν τη διάρκεια ζωής του οργανισμού αναλόγως τον ιστό στον οποίο αποσιωπώνται (Durieux et al., 2011; Lavasani et al., 2012; Tomás-Loba et al., 2008; Wolkow et al., 2000). Αν και οι πρωταρχικές αιτίες αυτών των μεταβολών είναι ενδοκυτταρικές, οι διαταραχές στη διακυτταρική επικοινωνία συντελούν το χαρακτηριστικό της γήρανσης που γεφυρώνει τα ενδοκυτταρικά χαρακτηριστικά με τα εξωκυτταρικά χαρακτηριστικά όπως (1) τη σταδιακή αύξηση της φλεγμονής συνδυαστικά με τη μείωση της ανοσοεπιτήρησης κατά των παθογόνων και των προ-κακοηθών κυττάρων και (2) τη μεταβολή της αμφίδρομης επικοινωνίας του ανθρώπινου γονιδιώματος και του μικροβιώματος, που τελικά οδηγεί στη δυσβίωση (López-Otín, Blasco, et al., 2023).

A.1.1.3(iii) Χρόνια φλεγμονή (Chronic inflammation)

Η φλεγμονή κατά τη διαδικασία της γήρανσης ("inflammaging") αυξάνεται με συστηματικές εκδηλώσεις και εμφανίζεται ως το αποτέλεσμα πολλαπλών διαταραχών που προέρχονται από όλα τα άλλα χαρακτηριστικά. Οι συγκεντρώσεις φλεγμονωδών βιοδεικτών (π.χ. CRP) επίσης αυξάνονται με την ηλικία. Οι παθολογικοί φαινότυποι της χρόνιας φλεγμονής περιλαμβάνουν αρτηριοσκλήρυνση, νευροφλεγμονή, οστεοαρθρίτιδα και εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου. Ταυτόχρονα με την

αύξηση της φλεγμονής, μειώνεται η ανοσολογική απόκριση (Mogilenko et al., 2021) με αποτέλεσμα να υπάρχει μειωμένη ανοσοεπιτήρηση για την εξάλειψη των μολυσμένων από ιούς, κακοήθων ή γερασμένων κυττάρων και αύξηση των αυτοάνοσων νοσημάτων που σχετίζονται με την ηλικία με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συστηματική φλεγμονή (Carrasco et al., 2022). Η συστηματική φλεγμονή αποτελεί από μόνη της χαρακτηριστικό γνώρισμα, καθώς συγκεκριμένοι χειρισμοί του φλεγμονώδους και ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να επιταχύνουν ή να επιβραδύνουν τη διαδικασία γήρανσης σε διάφορα συστήματα οργάνων (López-Otín, Blasco, et al., 2023). Για παράδειγμα, έχει δειχθεί πως η δυσλειτουργία του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A της μεταγραφής (mitochondrial transcription factor A, TFAM) που απαιτείται για τη συντήρηση και λειτουργία των ρυθμιστικών T κυττάρων οδηγεί σε επιταχυνόμενη γήρανση (Fu et al., 2019) και πως μεσολαβητές της φλεγμονής προκαλούν κυτταρική και πρόωρη γήρανση και πρόωρη γήρανση (Desdín-Micó et al., 2020), υποστηρίζοντας την ιδέα ότι η γήρανση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει στη γήρανση του οργανισμού.

A.1.1.3(iv) Δυσβίωση (Dysbiosis)

Το μικροβίωμα του εντέρου έχει αναδειχθεί ως βασικός παράγοντας σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, η προστασία από παθογόνα και η παραγωγή απαραίτητων μεταβολιτών αλλά στη σηματοδότηση στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα και σε άλλα απομακρυσμένα όργανα επηρεάζοντας έντονα τη συνολική διατήρηση της υγείας του ξενιστή (López-Otín et al., 2013). Η διαταραχή της επικοινωνίας του ανθρώπινου γονιδιώματος και του μικροβιώματος οδηγεί σε δυσβίωση και συμβάλλει σε μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, η ελκώδης κολίτιδα, οι νευρολογικές διαταραχές, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος και η γήρανση (Amorim et al., 2022; Ragonnaud & Biragyn, 2021). Μελέτες σε μοντέλα προγηρίας ποντικών αλλά και ανθρώπους με προγηρία, έχουν αποκαλύψει πως παρουσιάζουν εντερική δυσβίωση με συγκεκριμένο μοτίβο αύξησης και μείωσης συγκεκριμένων εντερικών βακτηρίων, ενώ μακρόβιοι άνθρωποι παρουσιάζουν το αντίστροφο μοτίβο (Bárcena et al., 2019). Παρά το γεγονός πως το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα έχει μεγάλη ετερογένεια άρα οι μεταβολές του κατά τη γήρανση είναι πολλές, η διόρθωση της σχετιζόμενης με την επιτάχυνση της γήρανσης εντερικής δυσβίωσης είναι ευεργετική, υποδηλώνοντας την ύπαρξη σχέσης μεταξύ γήρανσης και εντερικού μικροβιόκοσμου (Bárcena et al., 2019).

A.1.2. Τα μιτοχόνδρια στη γήρανση

Τα μιτοχόνδρια προέρχονται εξελικτικά από ένα άλφα-πρωτεοβακτήριο, που εγκολπώθηκε στα πρόδρομα ευκαρυωτικά κύτταρα (Sagan, 1967). Το άλφα-πρωτεοβακτήριο μπορούσε να απελευθερώνει ενέργεια από την τροφή και αντί να αποικοδομηθεί, έζησε μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα ενσωματώνοντας τα περισσότερα γονίδια του στον πυρήνα τους. Με αυτή τη μορφή ενδοσυμβίωσης, το βακτήριο έγινε το μιτοχόνδριο του κυττάρου και διατήρησε το γονιδίωμά του για να μεταφράζει τα υπόλοιπα γονίδια του DNA του που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, ωστόσο, κωδικοποιούνται στον πυρήνα και η διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας στο διαρκώς μεταβαλλόμενο κυτταρικό περιβάλλον, απαιτεί τον συντονισμό των δύο γονιδιωμάτων για τη σωστή εισαγωγή και επεξεργασία των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια (Quirós et al., 2016; Ryan & Hoogenraad, 2007).

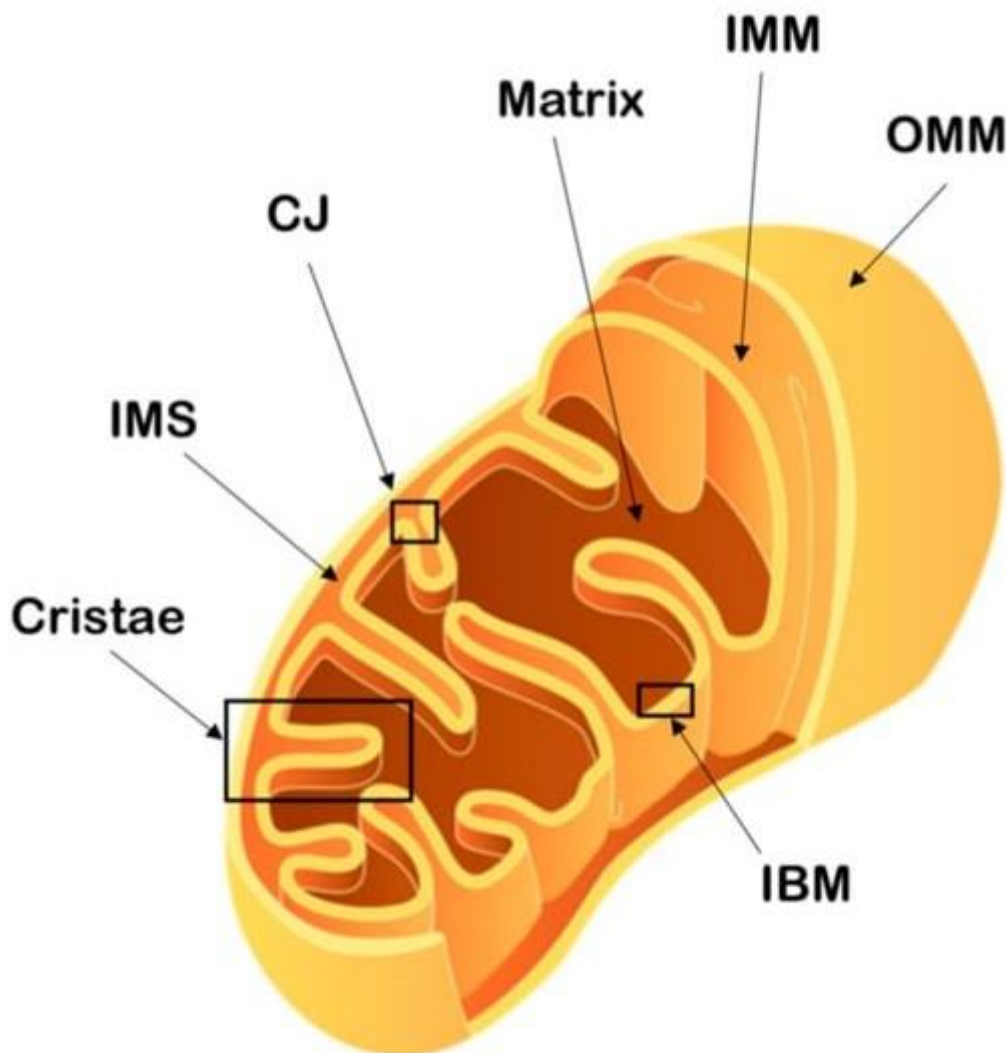
Με την πάροδο της ηλικίας η επικοινωνία πυρήνα-μιτοχονδρίου διαταράσσεται, επηρεάζοντας την κυτταρική ομοιόσταση και τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων συμβάλλει στη βιολογική γήρανση μέσω της μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας και της αυξημένης οξειδωτικής βλάβης. Η συσσώρευση οξειδωτικής βλάβης στα βιομόρια λόγω

υπερβολικής παραγωγής των τοξικών δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που παράγονται ως υποπροϊόντα μεταβολισμού από τα μιτοχόνδρια, θεωρείται πως καθορίζει το ρυθμό γήρανσης του οργανισμού και αποτελεί τη μιτοχονδριακή θεωρία της γήρανσης (Harman, 1972).

A.1.2.1. Χαρακτηριστικά και λειτουργία

A.1.2.1(i) Δομικά χαρακτηριστικά

Η πολύπλοκη δομή ενός μιτοχονδρίου είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία του οργανιδίου. Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο φωσφολιπιδικές μεμβράνες που οργανώνονται η μία γύρω από την άλλη και επιτελούν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του. Αυτές είναι η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Outer Mitochondrial Membrane, OMM) και η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Inner Mitochondrial Membrane, IMM) και διαμερισματοποιούν το οργανίδιο σε δύο χώρους, τη μήτρα και τον διαμεμβρανικό χώρο (Intermembrane Space, IMS), που διακόπτεται από σημεία συνδέσμου (cristae junctions) στα οποία η εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη έρχονται σε επαφή (Εικ. A.1-3) (Kühlbrandt, 2015; Logan, 2006).



Εικόνα A.1-3. Σχηματική αναπαράσταση της μιτοχονδριακής αρχιτεκτονικής. Υποδεικνύονται η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (OMM), η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IMM), η εσωτερική οριακή μεμβράνη (Inner boundary membrane, IBM), οι συνδέσεις των cristae (CJ), ο διαμεμβρανικός χώρος (IMS), τα cristae και η μιτοχονδριακή μήτρα (Protasoni & Zeviani, 2021).

Οι δύο μεμβράνες παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη λιπιδική σύνθεση και τα χαρακτηριστικά, αποτέλεσμα της ενδοσυμβιωτικής προέλευσης του οργανιδίου. Στην OMM υπάρχουν οι πορίνες, που σχηματίζουν πολλούς διαύλους για την διέλευση μικρών μορίων, και φωσφολιπίδια, ένζυμα που σχετίζονται με τον καταβολισμό των λιπιδίων και των αμινοξέων, και είναι πλούσια σε χοληστερόλη. Αντιθέτως η IMM στερείται χοληστερόλης, είναι λιγότερο διαπερατή, περιέχει φωσφολιπίδια σε μικρότερο ποσοστό από την OMM και σε αυτήν εντοπίζονται όλα τα ενζυμικά συστήματα της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ακόμη, παρουσιάζει πολλές πτυχώσεις προς το εσωτερικό του μιτοχονδρίου ώστε να υπάρχει αυξημένη διαθέσιμη επιφάνεια για την παραγωγή ενέργειας, σχηματίζοντας τις μιτοχονδριακές ακρολοφίες (mitochondrial *cristae*) που προβάλλουν στη μιτοχονδριακή μήτρα (Ernster & Schatz, 1981). Ο IMS περιέχει διαλυτά ένζυμα και το κυτόχρωμα C, που συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο III στο VI της αναπνευστικής αλυσίδας, και έχει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό των μιτοχονδριακών δραστηριοτήτων με άλλες κυτταρικές διεργασίες (Herrmann & Riemer, 2010). Η μιτοχονδριακή μήτρα καταλαμβάνει το 75-80% του μιτοχονδρίου και περιλαμβάνει τα ένζυμα που απαιτούνται για τον κύκλο του κιτρικού οξέος, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και ένζυμα που απαιτούνται για την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων (Scorrano et al., 2002). Το mtDNA πλέον περιέχει μόνο 37 γονίδια: 11 αγγελιοφόρα ριβονουκλεϊκά οξέα mRNAs, που μεταφράζονται σε 13 πρωτεΐνες, 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs, 12S και 16S) και 22 μεταφορικά RNAs (tRNAs) καθώς τα περισσότερα έχουν χαθεί ή μεταφερθεί στο πυρηνικό DNA (Gustafsson et al., 2016).

A.1.2.1(ii) Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα μιτοχόνδρια παρουσιάζονται ως επιμήκη, σφαιρικά ή ωοειδή οργανίδια με διάμετρο από 0,5 έως 1 μικρόμετρα (μm) και ο αριθμός τους στο κύτταρο εκτιμάται πως μπορεί να είναι από μηδέν έως χιλιάδες οργανίδια, ανάλογα με τη μεταβολική του δραστηριότητα. Η παρατήρησή τους μέσω τεχνικών μικροσκοπίας έχει δείξει πως είναι ευέλικτα, έχουν μεγάλη δοκιμή πλαστικότητα αλλάζοντας γρήγορα το σχήμα τους, απαρτίζοντας ένα δυναμικό δίκτυο, το μιτοχονδριακό δίκτυο.

Το μιτοχονδριακό δίκτυο εξαπλώνεται και μικραίνει μέσω των διαδικασιών σχάσης (συγχώνευση της εξωτερικής και στην συνέχεια εσωτερικής μεμβράνης δύο μιτοχονδρίων, fission) και σύντηξης (διάσπαση ενός μιτοχονδρίου σε δύο μικρότερα, fusion) των μιτοχονδρίων οι οποίες καθορίζουν τη συνολική συνδεσιμότητα και τη μορφολογία του δικτύου στο κύτταρο (Chen & Chan, 2004; Zamponi et al., 2018). Η μιτοχονδριακή σχάση είναι απαραίτητη για την αναδιάταξη και σωστή μεταφορά των μιτοχονδρίων στα θυγατρικά κύτταρα κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνεισφέρει στον διαχωρισμό των κατεστραμμένων τμημάτων μιτοχονδρίων ώστε να οδηγηθούν σε αποικοδόμηση μέσω αυτοφαγίας. Η σύντηξη μπορεί να βοηθήσει ένα μερικώς κατεστραμμένο μιτοχόνδριο να ενωθεί με ένα υγιές που θα λειτουργήσει συμπληρωματικά του άλλου και την ένωση των μιτοχονδρίων με άλλα οργανίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο. (Youle & van der Bliek, 2012) Η διαταραχή της ισορροπίας αυτών των διαδικασιών σχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του δυναμικού του μιτοχονδριακού δικτύου ή τη μείωση της βιογένεσης (Amartunshin et al., 2020). Η κίνηση των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα ακολουθεί τις δομές των μικροσωληνίσκων που καθορίζουν τον προσανατολισμό και τη διανομή τους στο κύτταρο σε συνεργασία με κινητήριες πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο, το μιτοχονδριακό δίκτυο είτε οργανώνεται σε μορφή μακρών ινών ή αλυσίδων είτε παραμένει σχετικά σταθερό στα κύτταρα με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις (πχ. μυϊκά και νευρικά κύτταρα) (Collins et al., 2002).

A.1.2.1(iii) Λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια συνδέονται στενά με τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και συναντώνται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα καταλαμβάνοντας το 18-20% του

κυτταροπλασματικού όγκου τους. Θεωρούνται το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας του κυττάρου παράγοντας μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της διεργασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από τον καταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπαρών οξέων (Kuznetsov et al., 2009). Για τη δημιουργία μορίων ATP, τα μιτοχόνδρια εκμεταλλεύονται τα παράγωγα του κύκλου του κιτρικού οξέος (citric acid cycle) NADH και FADH ως δότες ηλεκτρονίων, και το ένζυμο ATP συνθάση που χρησιμοποιεί την ηλεκτροχημική διαβάθμιση φορτίου στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, ως αποτέλεσμα της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας (Electron Transport Chain, ETC) (Yellen, 2018). Τα μόρια ATP τροφοδοτούν τις μεταβολικές δραστηριότητες του κυττάρου, διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση πολύπλοκων οργανισμών όπως ο άνθρωπος. Οι μεταβολικές δραστηριότητες που ρυθμίζουν μεταξύ άλλων είναι η παραγωγή ROS, η σύνθεση λιπαρών οξέων, ομάδων αίμης και σιδήρου-θείου, η ομοιόσταση του ασβεστίου, και συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση και την απόπτωση. Εκτός κυττάρου, ρυθμίζουν την επικοινωνία κυττάρων και ιστών (Chinnery & Schon, 2003; Nunnari & Suomalainen, 2012; Rizzuto et al., 2012; Wang & Youle, 2009). Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες έχουν βρεθεί σε ασθένειες που ονομάζονται μιτοχονδριοπάθειες και περιλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα.

A.1.2.2. Οξειδωτική βλάβη και γήρανση

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στους αερόβιους οργανισμούς. Οι ROS παράγονται από την αναπόφευκτη διαρροή ηλεκτρονίων κατά την αναγωγή του οξυγόνου στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Dan Dunn et al., 2015), με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-) που μετατρέπεται γρήγορα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) (Cadenas & Davies, 2000; Chance et al., 1979). Οι μιτοχονδριακές ROS παράγονται κυρίως από τα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας και συμβάλλουν σημαντικά στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες (Murphy, 2009). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται σε αφθονία και έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση αλλά όταν παράγεται σε περίσσεια, έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη ασθενειών (Bretón-Romero & Lamas, 2014; Mostoslavsky et al., 2006; Pravda, 2020).

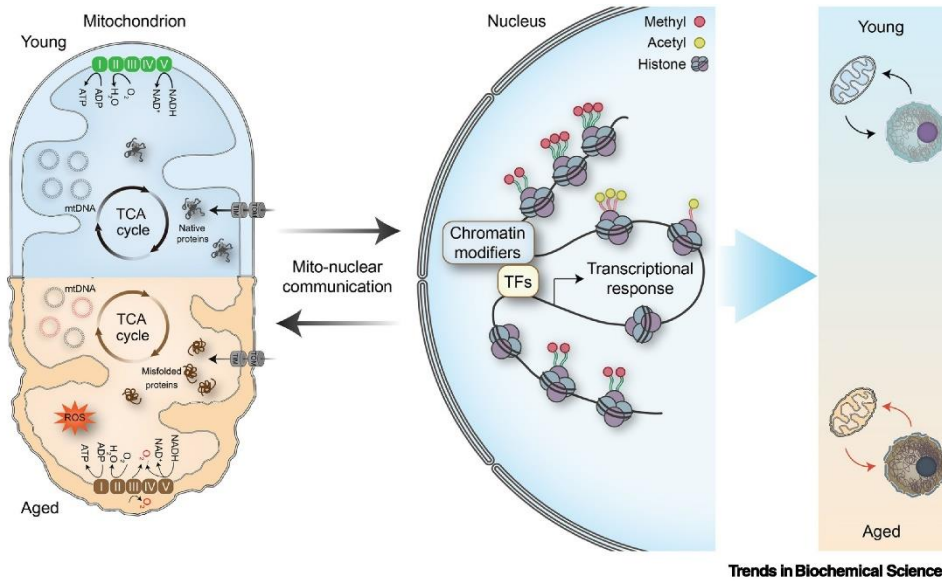
Η παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια ρυθμίζεται αυστηρά για την πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης των κυτταρικών διεργασιών, καθώς μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA αλλά και σε πολλά μακρομόρια όπως στα λιπίδια των μεμβρανών (Devasagayam et al., 2003) και στις πρωτεΐνες (Halliwell, 1999). Επιπλέον, η συσσώρευση των ROS μπορεί να προκαλέσει μειωμένη λειτουργία του συστήματος πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) και του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσώματος (Autophagy-Lysosomal Pathway, ALP), με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου (Szweda et al., 2002), διαταράσσοντας την πρωτεϊνική ομοιόσταση (πρωτεόσταση). Οι κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται στα μιτοχόνδρια από τις ROS συσσωρεύονται με την αύξηση της ηλικίας, καθιστούν τα μιτοχόνδρια δυσλειτουργικά, και έχουν συσχετιστεί με ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση.

Η ρύθμιση των επιπέδων ROS μπορεί να επιτευχθεί με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που δεσμεύουν και αδρανοποιούν την περίσσεια ROS, προστατεύοντας από το οξειδωτικό στρες. Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες μετατρέπουν τις ρίζες υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και νερό, ενώ η καταλάση, οι περοξυρεδοξίνες και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης μετατρέπουν τελικά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό. Μεταλλάξεις στη δραστηριότητα μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες και έχει δειχθεί πως ποντίκια με υπερέκφραση ή έλλειψη της Mn υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσιάζουν αυξημένη ή μειωμένη διάρκεια ζωής, αντίστοιχα (Schriener et al., 2005; Sun et al., 2002).

Οι ROS εκτός από σημαντικοί μεσολαβητές στην ηλικιο-εξαρτώμενη κυτταρική βλάβη, λειτουργούν και ως μόρια σηματοδότησης (Yang & Hekimi, 2010a) σε μονοπάτια απόκρισης σε διάφορα είδη στρες όπως η υποξία (Guzy & Schumacker, 2006), η φλεγμονή (Zhou et al., 2011), η αυτοφαγία (Lee et al., 2012) και η ανοσοαπόκριση (West et al., 2011). Στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* έχει δειχθεί πως χαμηλά επίπεδα ROS που προκαλούν ήπιο μιτοχονδριακό στρες, μπορούν να προάγουν τη μακροζωία του, ενώ τα υψηλά επίπεδα να μειώσουν τη διάρκεια ζωής του (S. J. Lee et al., 2010). Αυτή η αύξηση της διάρκειας παρατηρήθηκε σε στελέχη με μεταλλαγές σε γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας που έχουν αυξημένα επίπεδα ROS. Συμπληρωματικά, οι ROS αποδείχθηκε ότι ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα επαγόμενο από την υποξία 1 (hypoxia-inducible transcription factor, HIF-1), έναν παράγοντα μεταγραφής που σχετίζεται με την αυξημένη διάρκεια ζωής (S. J. Lee et al., 2010). Σαρώσεις RNAi μεγάλη κλίμακας στο νηματώδη αποκάλυψαν πως η διάρκεια ζωής ρυθμίζεται κυρίως από γονίδια που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακές πρωτεΐνες και στην πλειοψηφία τους επηρεάζουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Hamilton et al., 2005). Για παράδειγμα, η αποσιώπηση του γονιδίου *cco-1* στο *C. elegans* προκαλεί δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας στο σύμπλοκο IV, που αυξάνει τη διάρκεια ζωής των σκουληκιών μέσω της ενεργοποίησης του UPR^{mt} (Durieux et al., 2011). Η ήπια αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής αποδείχθηκε ότι παρατείνει τη διάρκεια ζωής σε πολλά είδη, όπως ο *C. elegans*, η *Drosophila* και τα ποντίκια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αύξηση της μακροζωίας μέσω της μέτριας καταστολής της μιτοχονδριακής αναπνοής, διατηρείται εξελικτικά (Chistiakov et al., 2014).

A.1.2.3. Επικοινωνία με πυρήνα

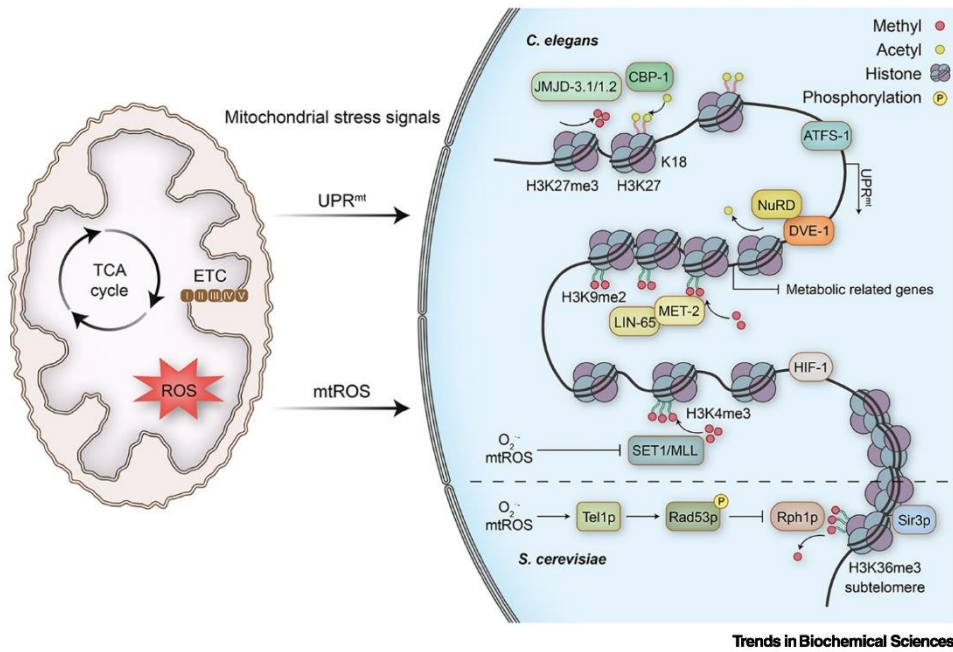
Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία δεν προκαλείται μόνο από μεταλλαγές του μιτοχονδριακού αλλά και του πυρηνικού γονιδιώματος, καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Επομένως, απαιτείται συνεχής επικοινωνία μιτοχονδρίου-πυρήνα για το συντονισμό της έκφρασης, της μετάφρασης και της συναρμολόγησης των μιτοχονδριακών συμπλόκων που κωδικοποιούνται κι από τα δύο γονιδιώματα, ώστε να εξασφαλίζεται η βέλτιστη μιτοχονδριακή λειτουργία (Isaac et al., 2018). Η εξαρτώμενη από τη γήρανση κατάρρευση της πρωτεόστασης και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να διαταράξει την επικοινωνία μεταξύ των μιτοχονδρίων και του πυρήνα, με αποτέλεσμα αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (Εικ. A.1-4).



Trends in Biochemical Sciences

Εικόνα A.1-4. Η αμφίδρομη επικοινωνία πυρήνα-μιτοχόνδριου. Η σηματοδότηση από πυρήνα σε μιτοχόνδριο μεσολαβεί στην έκφραση γονιδίων του mtDNA για την διατήρηση ή αποκατάσταση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η ανάδρομη σηματοδότηση από μιτοχόνδριο σε πυρήνα μεσολαβεί στην ανταπόκριση του πυρήνα σε διάφορες συνθήκες στρες και την επαγωγή πυρηνικών γονιδίων για μεταβολικές προσαρμογές στο μιτοχόνδριο. Η σηματοδότηση αυτή επάγει μεταγραφικούς παράγοντες απόκρισης στο στρες αλλά και τροποποιητές της χρωματίνης που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων για την προσαρμογή στο στρες. Η επικοινωνία μιτοχονδρίου-πυρήνα είναι κρίσιμη για την κυτταρική ομοιόσταση και η διαταραχή της συμβάλλει στη γήρανση και στις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία (Zhu et al., 2022).

Η ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας εξαρτάται κυρίως από μεταγραφικούς παράγοντες που κωδικοποιούνται στον πυρήνα, όπως οι PCG1α, NRF1, και επάγουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούνται στο mtDNA ώστε να βελτιώσουν τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Quirós et al., 2016). Αντιστρόφως, μιτοχονδριακές διαταραχές όπως το πρωτεοστατικό στρες και η αυξημένη παραγωγή ROS πυροδοτούν σηματοδοτήσεις από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα ώστε να γίνουν οι απαραίτητες μεταβολικές προσαρμογές (Andréasson et al., 2019; English et al., 2020; Smiraglia et al., 2008). Οι μόνιμοι ρυθμιστές αυτές της επικοινωνίας υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες που έχουν μελετηθεί λεπτομερώς είναι οι SIRT1, AMPK και ATF3-1 (Quirós et al., 2016). Νέες μελέτες δείχνουν πως η έκφραση μεταβολικών γονιδίων απαραίτητων για την κυτταρική ομοιόσταση και τη ρύθμιση της γήρανσης, μπορεί να μεσολαβηθεί από μιτοχονδριακούς μεταβολίτες και άλλα σιγνάλα στρες που ρυθμίζουν επιγενετικά το πυρηνικό γονιδίωμα (Εικ. A.1-5) (Korinski et al., 2019; Martínez-Reyes & Chandel, 2020). Έτσι μέσω της επικοινωνίας μιτοχονδρίου πυρήνα τα κύτταρα καταφέρνουν να ανταποκριθούν σε μεταβαλλόμενες μεταβολικές συνθήκες ή στρες που σχετίζεται με τη γήρανση (English et al., 2020; Martínez-Reyes & Chandel, 2020).



Trends in Biochemical Sciences

Εικόνα A.1-5. Η σηματοδότηση μιτοχονδρίου-πυρήνα ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Το μιτοχondριακό στρες οδηγεί σε αναδιοργάνωση της χρωματίνης και σε καθολική γονιδιακή αποσιώπηση. Κατά το μιτοχondριακό στρες, το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης νουκλεοσώματος και αποακετυλάσης της ιστόνης (NuRD) και του μεταγραφικού παράγοντα homeobox (TF) DVE-1 συσσωρεύεται στον πυρήνα και μειώνει την ακετυλίωση των ιστονών και την αναδιοργανώνει τη δομή της χρωματίνης. Η μεθυλο-τρανσφεράση της ιστόνης H3K9 MET-2 και ο συμπαραγοντάς της LIN-65 προωθούν επίσης τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την αποσιώπηση γονιδίων κατά τη διάρκεια μιτοχondριακού στρες. Παράλληλα, οι δύο απομεθυλάσες λυσίνης ιστονών JMJD-1.2 και JMJD-3. 1, και η ακετυλοτρανσφεράση CBP-1 προάγουν μια σχετικά ανοικτή κατάσταση χρωματίνης αφαιρώντας μεθυλομάδες από την ιστόνη H3K27me3 και προσθέτοντας ακετυλομάδες στις ιστόνες στους τόπους των γονιδίων που προσδέεται ο ATFS-1 για την επαγωγή του UPR^{mt}. Οι ROS που παράγονται από τα μιτοχόνδρια δρουν ως σηματοδοτικά μόρια για τη διαμόρφωση επιγενετικών σημάτων, όπως η απομεθυλίωση της ιστόνης H3K36 από τη Rph1p, η μεσολάβηση της μεθυλίωσης H3K4me3 από τη SET1. Οι επιγενετικές μεταβολές που μεσολαβούνται από τις ROS μεταβάλλουν με τη σειρά τους την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον μιτοχondριακό μεταβολισμό και τελικά, τη γήρανση και τη μακροζωία. Συντομογραφίες: TCA, τρικαρβοξυλικό οξύ (Zhu et al., 2022).

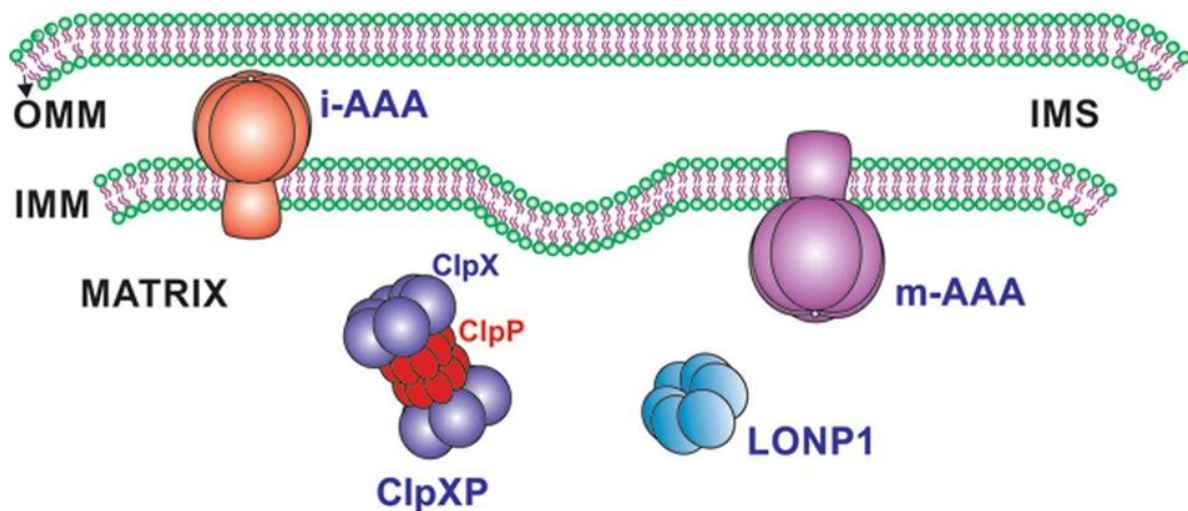
Η διαταραχή αυτών των ελεγχόμενων διαδικασιών επικοινωνίας πυρήνα μιτοχondρίου, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την κυτταρική ομοιόσταση. Για να αντιμετωπίσουν αυτό το μειονέκτημα της ενδοσυμβίωσης, τα μιτοχόνδρια έχουν αναπτύξει πολλαπλά μονοπάτια αντίδρασης στο στρες. Το μιτοχondριακό δίκτυο απόκρισης στο στρες (mitochondrial stress-response, MSR) συμβάλλει στην αποκατάσταση της κυτταρικής ομοιόστασης αποτρέποντας τη μιτοχondριακή πρωτεοτοξικότητα και αναδιανέμοντας και απομακρύνοντας μη αναστρέψιμα κατεστραμμένα στοιχεία των μιτοχondρίων (Ng et al., 2021). Το πιο γνωστό μονοπάτι απόκρισης στο στρες είναι το μιτοχondριακό μονοπάτι απόκρισης στις μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (mitochondrial Unfolded Protein Response, UPR^{mt}) που είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα της συνεργασίας μιτοχondρίου-πυρήνα. Πλέον είναι γνωστό πως υπάρχουν και άλλα μιτοχondριακά απόκρισης στο στρες όπως το σχετιζόμενο με την αποικοδόμηση μιτοχondριακών πρωτεϊνών (Mitochondria-associated degradation, MAD) μονοπάτι και το μιτοχondριακό μονοπάτι πρωτεϊνικών κινάσων ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (mitochondrial mitogen-activated protein kinase pathway, MAPK^{mt}) που θα αναφερθούν λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.

A.2. Οι Μηχανισμοί Ποιοτικού Ελέγχου

Τα μιτοχόνδρια έχουν τεράστια συνεισφορά στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και η δυσλειτουργία τους συνδέεται με πολλούς τύπους ασθενειών (Chan, 2006; Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017) κάνοντας κρίσιμο τον ποιοτικό έλεγχό τους μέσω ενδο- και διακυτταρικών μηχανισμών. Ευτυχώς, τα μιτοχόνδρια έχουν αναπτύξει πολλούς αλληλεπικαλυπτόμενους και αλληλοσυνδεόμενους προστατευτικούς για την αντιμετώπιση της μιτοχονδριακής βλάβης που μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα εξωτερικών προσβολών, όπως η στέρηση θρεπτικών συστατικών και διάφορα είδη στρες ή ως αποτέλεσμα της διατάραξης της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης. Στον ποιοτικό έλεγχο του εσωτερικού των μιτοχονδρίων, σημαντικό ρόλο έχουν οι μιτοχονδριακές πρωτεάσες (μιτοπρωτεάσες) που ρυθμίζουν την ποιότητα και τη λειτουργία των εισαγόμενων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το mtDNA. Ακόμη, υπάρχουν μονοπάτια ποιοτικού ελέγχου που δρουν πριν από την εισαγωγή μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, όπως η αποικοδόμηση που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια (MAD) και άλλες διεργασίες που συνδέονται με το σύστημα ουβικουιλίνης (Ub)-πρωτεασώματος (UPS), αλλά και σινιάλα που ενεργοποιούν σηματοδοτικές αποκρίσεις από τον πυρήνα για να επαναφέρουν τη μιτοχονδριακή πρωτεόσταση, όπως το UPR^{mt}, όταν τα προηγούμενα συστήματα ελέγχου κατακλυστούν. Τέλος, υπάρχουν οργανδιακοί μηχανισμοί ποιοτικού ελέγχου όπως η σχάση και η σύντηξη που ενεργοποιούνται από τη συσσώρευση βλαβών στο μιτοχόνδριο και διατηρούν τη μιτοχονδριακή μορφολογία, και η μιτοφαγία κατά την οποία τα κύτταρα αφαιρούν τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια.

A.2.1. Οι μιτοχονδριακές πρωτεάσες

Οι πρωτεΐνες στα υποδιαμερίσματα του μιτοχονδρίου παραμένουν υπό την επιτήρηση μοριακών συνοδών και πρωτεασών που φροντίζουν για τη σωστή αναδίπλωσή τους ή την αποικοδόμησή τους, αντίστοιχα. Οι μιτοχονδριακές πρωτεάσες είναι η πρώτη γραμμή άμυνας στον έλεγχο ποιότητας των μιτοχονδρίων (Leonhard et al., 2000) και ρυθμίζουν την πρωτεόλυση υποστρωμάτων που εμπλέκονται στο δυναμικό του μιτοχονδρίου, στην εισαγωγή πρωτεϊνών, στη βιοσύνθεση λιπιδίων και άλλων βασικών διεργασιών του μιτοχονδρίου, και αποτυγχάνουν να ωριμάσουν ή να αναδιπλωθούν σωστά, ή οξειδώνονται (Deshwal et al., 2020). Η δυσλειτουργία των πρωτεασών μπορεί να σηματοδοτήσει την ενεργοποίηση άλλων μιτοχονδριακών και κυτταρικών αποκρίσεων ελέγχου ποιότητας (Shpilka & Haynes, 2018). Οι πιο καλά μελετημένες μιτοχονδριακές πρωτεάσες είναι αυτές που ανήκουν στην οικογένεια των ATP-εξαρτώμενων πρωτεασών (ATPase Associated with diverse cellular Activities, AAA⁺) που χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP μέσω των AAA⁺ περιοχών τους για να εκτελέσουν τόσο τον έλεγχο ποιότητας όσο και τη ρυθμιστική πρωτεόλυση (Εικ. A.2-1). Οι πιο γνωστές AAA⁺ πρωτεάσες είναι οι LONP1, η CLPX, η πρωτεάση m-AAA και η πρωτεάση i-AAA, οι οποίες σχηματίζουν ομο- ή ετερο-ολιγομερείς δομές που μοιάζουν με δακτυλίους, με εσωτερικό ATP-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό θάλαμο (Deshwal et al., 2020).



Εικόνα A.2-1. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεασών εξαρτώμενων από ATP. Στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών υπάρχουν τέσσερις πρωτεάσες της οικογένειας AAA⁺ για τη ρύθμιση του ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών. Την πρωτεάση LONP1 και το σύμπλοκο ClpXP στη μιτοχονδριακή μήτρα και τις πρωτεάσες i-AAA και m-AAA στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IMM) (Nouri et al., 2020).

A.2.1.1. Η μιτοχονδριακή πρωτεάση LONP1

Η ανθρώπινη μιτοχονδριακή πρωτεάση LON είναι υψηλά συντηρημένη στα περισσότερα βακτηριακά είδη, στα αρχαία, στα ευκαρυωτικά κύτταρα και εντοπίζεται στα περισσότερα ευκαρυωτικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και τα υπεροξεισώματα (Rigas et al., 2012). Το ανθρώπινο ομόλογό της (LONP1) είναι μια πρωτεΐνη περίπου 100 kDa και κωδικοποιείται από πυρηνικό γονίδιο (Wang et al., 1993). Το βακτηριακό ομόλογό της είναι η πρωτεάση La και στη ζύμη η πρωτεάση PIM1/Lon. Η πρωτεάση LONP1 έχει σημαντικό ρόλο στον μιτοχονδριακό ποιοτικό έλεγχο και μεταβολές στη λειτουργία της έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις στους ανθρώπους, όπως η γήρανση, ο καρκίνος και ο νευροεκφυλισμός (Ngo et al., 2013).

A.2.1.1(i) Δομή

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη LONP1 αποτελείται από 959 αμινοξέα και έχει 105 kDa μοριακό βάρος (Wang et al., 1993). Κωδικοποιείται από ένα μοναδικό πυρηνικό γονίδιο που εδράζεται στο 19^ο χρωμόσωμα, μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα, και η πρόδρομη πρωτεΐνη που φέρει στο αμινοτελικό άκρο της την μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης (mitochondrial targeting sequence, MTS), οδηγείται στα μιτοχόνδρια. Μετά την εισαγωγή της στα μιτοχόνδρια και την αποκοπή του MTS στη μιτοχονδριακή μήτρα, δημιουργείται η ενεργή μορφή της πρωτεΐνης που αποτελείται από (1) την αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain, N-domain) για την αναγνώριση και τη δέσμευση του υποστρώματος, (2) την περιοχή ATPάσης (ATPase domain ή AAA⁺ module) στην οποία εντοπίζονται και δύο Walker A και B μοτίβα δέσμευσης ATP που εμπλέκονται στη πρόσδεση στο mtDNA και στην υδρόλυση των μορίων ATP (Neuwald et al., 1999), (3) την περιοχή πρωτεάσης (protease domain, P-domain) στο καρβοξυτελικό άκρο που σχηματίζεται από τα αμινοξέα σερίνη-λυσίνη (Ser855 - Lys898) και έχει τη μεγαλύτερη εξελικτική συντήρηση (Venkatesh et al., 2012), και (4) την περιοχή διαφοροποίησης αισθητήρα και υποστρώματος (Sensor and Substrate Discrimination domain, SSD) που εμπλέκεται στην αναγνώριση των υποστρωμάτων της πρωτεάσης. Η δομή της πρωτεΐνης σχηματίζει ένα εξαμερές υδατοδιαλυτό σύμπλοκο (Gibellini et al., 2020; Shin et al., 2021) που μοιάζει με κύλινδρο στον οποίο μεταφέρονται τα υποστρώματα για τη σωστή αναδίπλωση ή αποικοδόμησή τους (Cha et al., 2010). Η πρωτεάση LONP1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και περισσότερο σε

όσους έχουν υψηλή ενεργειακή ζήτηση, όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, ο εγκέφαλος και το ήπαρ (Wang et al., 1993).

Το φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει μία μικρή οικογένεια πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν για τέσσερις ισομορφές της LON (LON1-LON4), εκ των οποίων οι δύο στοχεύονται στα μιτοχόνδρια (LON1, LON4). Η LON1 έχει χαρακτηριστεί ευρέως στα φυτά, έχει παρόμοια λειτουργία με τη LON στα ζωικά κύτταρα (Li et al., 2017) και κωδικοποιεί δύο πολυπεπτίδια που το ένα στοχεύεται στα μιτοχόνδρια και το άλλο στους χλωροπλάστες (Daras et al., 2014). Η απώλεια λειτουργίας της LON1 οδηγεί σε καθυστερημένη ανάπτυξη, ανώμαλη μιτοχονδριακή μορφολογία και μειωμένη λειτουργία αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Daras et al., 2014; Rigas, Daras, Laxa, et al., 2009; Solheim et al., 2012). Έχει μεγάλη ομοιότητα ταυτότητας αμινοξικής αλληλουχίας και δομικών περιοχών με τη LON4 (Rigas, Daras, Sweetlove, et al., 2009) και το γονίδιο *lon4* κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο που στοχεύεται στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες (Ostersetzer et al., 2007; Sakamoto, 2006). Η λειτουργία της LON4 δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί και έχει σχετικά χαμηλότερη έκφραση σε σύγκριση με τη LON1 (Tsitsekian et al., 2019). Η LON1 όμως, φαίνεται να έχει ρόλο μοριακού συνοδού και πρωτεάσης, υποδεικνύοντας το σημαντικό της ρόλο στη διατήρηση της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης (Li et al., 2017). Μελέτες στη ζύμη δείχνουν πως η έλλειψη της Lon/PIM1 προκαλεί δυσλειτουργική αναπνευστική αλυσίδα, συσσώρευση κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μήτρα και επιτάχυνση της γήρανσης (Erjavac et al., 2013). Αντιθέτως, η έλλειψή της στη μύγα και στα ποντίκια δείχνουν πως η πρωτεάση LONP1 είναι απαραίτητη για τον οργανισμό καθώς η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα μη βιώσιμα άτομα (P. M. Quirós et al., 2014).

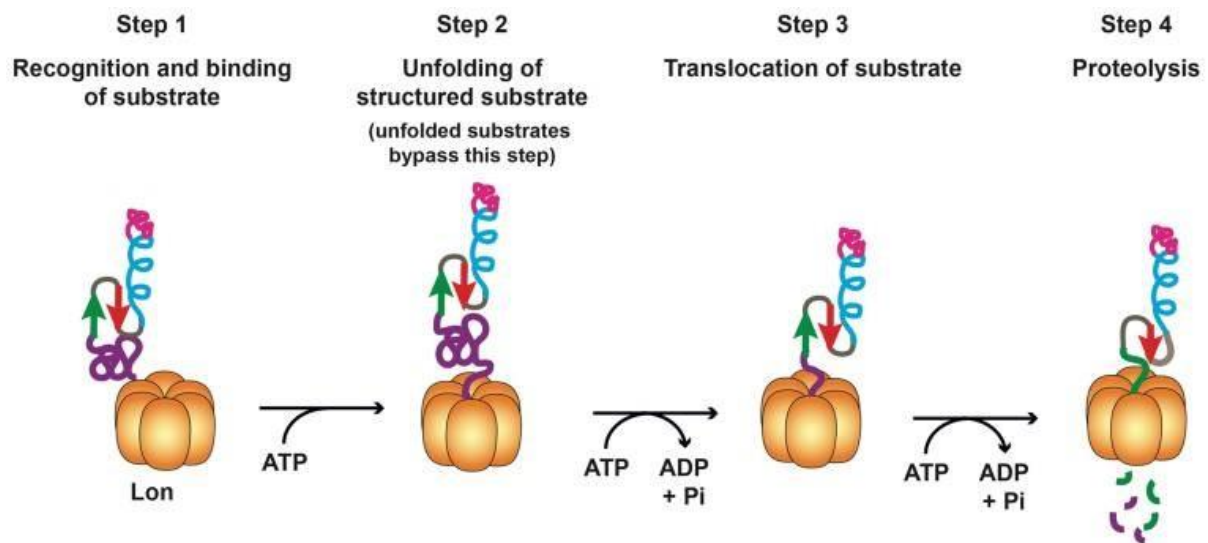
A.2.1.1(ii) Οι λειτουργίες της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LONP1

Πρωτεολυτική δραστηριότητα

Όλες οι ATP εξαρτώμενες πρωτεάσες, όπως η LONP1, αρχικά δεσμεύουν το υποστρώμα τους, στη συνέχεια το ξεδιπλώνουν με τρόπο εξαρτώμενο από το ATP χρησιμοποιώντας την επικράτεια της ATPάσης και, τέλος, το αποικοδομούν από το N- ή C-τελικό άκρο (Gottesman, 2003). Η LONP1 λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο, διασπώντας πρώτα τα υποστρώματά της από μια εσωτερική θέση χωρίς να χρειάζεται κάποιο μοτίβο αναγνώρισης υποστρώματος. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα της LONP1 βασίζεται στην υδρόλυση του ATP, που είναι ζωτικής σημασίας για το ξεδίπλωμα των υποστρωμάτων. Η δραστηριότητα της ATPάσης φαίνεται να ρυθμίζεται από την N-περιοχή, καθώς η διαγραφή τμημάτων της επηρεάζει τόσο τη δραστηριότητα ATPάσης όσο και πρωτεάσης (Cheng et al., 2012). Για την αναγνώριση υποστρώματος, η LONP1 έχει προτίμηση στις οξειδωμένες πρωτεΐνες και απαιτεί ένα εκτεθειμένο, μεγάλο, μη δομημένο αμινοτελικό τμήμα πρωτεΐνης με μια περιορισμένη ικανότητα αναδίπλωσης (von Janowsky et al., 2005). Ωστόσο, έχει βρεθεί πως ορισμένα υποστρώματά της πρέπει να βρίσκονται στην αναδιπλωμένη λειτουργική τους κατάσταση για να αναγνωριστούν, καθώς η LONP1 αναγνωρίζει επιφάνειες που χαρακτηρίζονται από ένα υδρόφοβο κατάλοιπο που περιβάλλεται από φορτισμένα, ενώ τα ίδια υποστρώματα δεν αποικοδομούνται αν είναι μη αναδιπλωμένα (Ondrovicová et al., 2005). Τελικά, η LONP1 αναγνωρίζει αλληλουχίες πλούσιες σε αρωματικά κατάλοιπα που είναι προσβάσιμες στα μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια, αλλά μπορεί και να αναγνωρίσει θέσεις αναγνώρισης σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και να τις αποικοδομήσει (Gur & Sauer, 2008).

Η αναγνώριση των υποστρωμάτων της LONP1 γίνεται από την αμινοτελική και την AAA⁺ περιοχή της δεσμεύοντας τις συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης του πρωτεϊνικού υποστρώματος, χωρίς την συμμετοχή του ATP. Στη συνέχεια, όταν τα υποστρώματα δεν είναι ξεδιπλωμένα, η πρωτεΐνη αλλάζει διαμόρφωση με τη δέσμευση και υδρόλυση μορίων ATP, που οδηγεί την ξεδίπλωση και μεταφορά του πεπτιδικού υποστρώματος στον πρωτεολυτικό θάλαμο για τη βέλτιστη

επεξεργασία των υδρόφοβων μεμβρανικών υποστρωμάτων. Τέλος, μόλις το ξεδιπλωμένο πλέον υπόστρωμα γίνει προσβάσιμο στα ενεργά πρωτεολυτικά κέντρα της LONP1, ακολουθεί η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού (Εικ. Α.2-2) (Venkatesh et al., 2012).



Εικόνα Α.2-2. Η αναγνώριση και η αποικοδόμηση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από την πρωτεάση Lon. Βήμα 1: Αναγνώριση και δέσμευση ενός πρωτεϊνικού υποστρώματος. Βήμα 2: Η AAA⁺ περιοχή ξεδιπλώνει όσα πεπτίδια είναι αναδιπλωμένα, διαδικασία που απαιτεί τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP. Βήμα 3: Μεταφορά των ξεδιπλωμένων πεπτιδίων στον πρωτεολυτικό θάλαμο με τη δέσμευση και υδρόλυση ATP. Βήμα 4: Σπάσιμο του πεπτιδικού δεσμού και παραγωγή μικρών πεπτιδίων. Για την πλήρη αποικοδόμηση των υποστρωμάτων απαιτούνται επαναληπτικοί γύροι (Venkatesh et al., 2012).

Ένα από τα πιο γνωστά υποστρώματα της πρωτεάσης LONP1 είναι η μιτοχονδριακή ακονιτάση, ένα ένζυμο που καταλύει την αναστρέψιμη μετατροπή του κιτρικού οξέος σε ισοκιτρικό στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Quiros, 2018). Η ακονιτάση είναι πολύ ευαίσθητη στην οξειδωση και μπορεί να συσσωρευτεί και να σχηματίσει συσσωματώματα (aggregates) στη μιτοχονδριακή μήτρα προκαλώντας μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η πρωτεάση LONP1 αποικοδομεί την οξειδωμένη ακονιτάση διατηρώντας τη μιτοχονδριακή ομοιότητα (Quiros, 2018). Σημαντικό υπόστρωμα της LONP1 είναι και ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) που είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή του mtDNA και για την αναδίπλωση και σταθεροποίηση του mtDNA (Asin-Cayuela & Gustafsson, 2007; Ekstrand et al., 2004; Kaufman et al., 2007; Kukat et al., 2011; Larsson et al., 1998). Η πρωτεάση LONP1 ρυθμίζει τον αριθμό μορίων mtDNA και τη μιτοχονδριακή μεταγραφή σταθεροποιώντας την αναλογία του μιτοχονδριακού TFAM και mtDNA μέσω της επιλεκτικής αποικοδόμησης του TFAM (Matsushima et al., 2010). Η απώλεια ή αποσιώπηση της LONP1 μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική αναδίπλωση του mtDNA από τον TFAM, οδηγώντας στην αναστολή της φυσιολογικής αντιγραφής και μεταγραφής του mtDNA (Matsushima et al., 2010). Ο TFAM υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση από την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση στα μιτοχόνδρια, που τον φωσφορυλιώνει και μειώνει την ικανότητα του να δεσμεύει το mtDNA, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του. Η πρωτεάση LONP1 έχει την ικανότητα να αποικοδομήσει μόνο αυτή την ελεύθερη φωσφορυλιωμένη μορφή του (Lu et al., 2013). Τέλος, η LONP1 εμπλέκεται στην πρωτεόλυση της πρωτεϊνικής κινάσης επαγόμενης από PTEN (PTEN-induced kinase 1, PINK1) που ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή αυτοφαγία (μιτοφαγία). Σε συνθήκες στρες, η αποσιώπηση ή η απώλεια λειτουργίας της LONP1 μπορεί να προκαλέσει τη συσσώρευση της PINK1, με αποτέλεσμα την αύξηση της μιτοφαγίας (Greene et al., 2012; Jin & Youle, 2013).

Δράση μοριακού συνοδού

Η πρωτεάση LONP1 εμφανίζει ιδιότητες μοριακού συνοδού που απαιτούν τη λειτουργία ATPάσης αλλά δεν εξαρτώνται από την πρωτεολυτική της λειτουργία (Rep et al., 1996). Θεωρείται πως βοηθά στην *de novo* αναδίπλωση των πρωτεϊνών ή στην επαναδίπλωση κακώς διπλωμένων πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπει τη συσσωμάτωση κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών είτε συνεισφέροντας στην επιδιόρθωσή τους είτε στην αποικοδόμησή τους (Gibellini et al., 2020). Ακόμη, πιθανώς συνεισφέρει στη σταθερότητα του συμπλόκου που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες θερμικού στρες HSP60 και μιτοχονδριακή HSP70 (mtHSP70) καθώς η αποσιώπησή της δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδά τους αλλά μειώνει τα επίπεδα των συζευγμένων HSP60-mtHSP70 (Kao et al., 2015; Sung et al., 2018). Έχει επίσης βρεθεί πως η πρωτεάση LONP1 αλληλεπιδρά *in vivo* με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, και πως για αυτή την αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη η λειτουργία ATPάσης και όχι η πρωτεολυτική (Kao et al., 2015). Αν και η δράση μοριακού συνοδού της LONP1 είναι απαραίτητη για τη σωστή συναρμολόγηση των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Besse et al., 2020; Rep et al., 1996) και απαιτείται για την επεξεργασία του MTS ενός υποσυνόλου μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Zurita Rendón & Shoubridge, 2018), χρειάζονται περισσότερες μελέτες για τη διερεύνηση της δράσης της ως μοριακός συνοδός σε βάθος.

Δέσμευση στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Η ανθρώπινη πρωτεάση LONP1 μπορεί να ρυθμίσει το μεταβολισμό του mtDNA έμμεσα ή άμεσα. Η έμμεση σύνδεσή της γίνεται μέσω της υδρόλυσης του TFAM που είναι παράγοντας-κλειδί για την έκφραση και τη σταθεροποίηση του mtDNA (Matsushima et al., 2010). Η άμεση σύνδεσή της γίνεται σε περιοχές DNA με μεγάλη αναλογία G-T και σε περιοχές RNA με μεγάλη αναλογία G-U (Chen et al., 2008; Fu & Markovitz, 1998; Liu et al., 2004). Η σύνδεση της LONP1 με υποστρώματα μπορεί να αυξήσει τη σύζευξή της με τα νουκλεϊικά οξέα (Liu et al., 2004) χωρίς να είναι γνωστό ποια λειτουργική περιοχή της απαιτείται για τη σύζευξη (Matsushima & Kaguni, 2012; Szczepanowska & Trifunovic, 2022), καθώς η απώλεια της δράσης ATPάσης ή πρωτεάσης της LONP1 δεν επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσής της στο DNA (Liu et al., 2004). Επίσης αλληλεπιδρά με μια κατηγορία πρωτεϊνικών συμπλόκων που προσδέονται στο mtDNA και προάγουν τη σταθερότητα και την έκφρασή του, όπως η mtDNA πολυμεράση γ και η mtDNA ελικάση Twinkle (Liu et al., 2004).

A.2.1.1(iii) Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεάσης LONP1

Αν και η πρωτεάση LONP1 εντοπίζεται κυρίως στη μιτοχονδριακή μήτρα, έχει δείχθει πως βρίσκεται και κοντά στην IMM, καθώς αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα TIM και πρωτεάσες της IMM (Zurita Rendón & Shoubridge, 2018). Εκτός αυτών, αλληλεπιδρά και με υπομονάδες των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων όπως το NDUF10 (σύμπλοκο I) (Wright et al., 2019), το κυτόχρωμα c1 (σύμπλοκο III) (Besse et al., 2020), τα ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5F1C, ATP5PO (σύμπλοκο V) (He et al., 2018) και μιτοχονδριακές πρωτεΐνες-μεταφορείς της IMM (Ghosh et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί προσοχή στην πιθανότητα παρουσίας εξωμιτοχονδριακών ισομορφών της LONP1. Πράγματι, η παρουσία της LONP1 εντοπίστηκε μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου (ER) που συνδέονται με τα μιτοχόνδρια (mitochondria-associated membranes, MAMs) για τη διατήρηση της ομοιότητας των μιτοχονδρίων έναντι του ER στρες (Polo et al., 2017). Μια πιο πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την παρουσία της LONP1 στον πυρήνα υπό θερμικό στρες σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου που υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (Gibellini et al., 2022), υποδηλώνει πως εμπλέκεται στην κυτταρική απόκριση στο στρες.

A.2.1.1(iv) Ρύθμιση της πρωτεάσης LONP1

Σε συμφωνία με τον σημαντικό ρόλο της πρωτεάσης LONP1 στη διατήρηση της ομοιόστασης, η έκφρασή της επάγεται από διάφορα ερεθίσματα στρες, όπως η υποξία, το θερμικό στρες, το στρες ενδοπλασματικού δικτύου, το οξειδωτικό στρες και η εξάντληση θρεπτικών συστατικών (Pinti et al., 2016). Η έκφρασή της ωστόσο μειώνεται σε χρόνιες καταστάσεις όπως η διαδικασία της γήρανσης και παρατεταμένα χρονικά διαστήματα οξειδωτικού στρες ή υποξίας, που σημαίνει ότι έχει πολυδιάστατους ρόλους στη διατήρηση της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης και έχει σημαντικό ρόλο στη γήρανση και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Bota & Davies, 2016).

Η ανάλυση του υποκινητή της ανθρώπινης πρωτεάσης LONP1, έδειξε πως έχει περιοχές πρόσδεσης αρκετών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφρασή της όπως ο πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας 2 (Nuclear Respiratory Factor 2, NRF2) που παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση στις ROS και στο συντονισμό του mtDNA (Bahat et al., 2015). Ακόμη έχει μια προβλεπόμενη θέση πρόσδεσης για τον πυρηνικό παράγοντα-ελαφράς-αλυσίδας-ενισχυτή ενεργοποιημένων Β κυττάρων (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) οποίος είναι ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από τις ROS (Pinti et al., 2011), ενισχύοντας την υπόθεση πως η LONP1 ρυθμίζεται από το στρες και συμμετέχει στην ογκογένεση.

Σε συνθήκες υποξίας, ο μεταγραφικός παράγοντας της υποξίας HIF-1α συνδέεται με τον υποκινητή του γονιδίου *Lonp1* επάγοντας τη μεταγραφή του, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της υπομονάδας COX4-1 του ολοενζύμου COX του συμπλέγματος IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Fukuda et al., 2007). Επομένως η LONP1 απαιτείται για την αντιμετώπιση της χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου. Ένας ακόμη ρυθμιστής της LONP1 είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) ένας από τους κύριους παράγοντες που εμπλέκονται στον καρκινικό μετασχηματισμό και ρυθμίζει την έκφραση της LONP μέσω δύο μονοπατιών i) της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικά μηνύματα πρωτεϊνικής κινάσης (Extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) και ii) της φωσφοϊνοσιτίδης 3-κινάσης (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K) (Zhu et al., 2002). Η LONP1 ρυθμίζεται επίσης σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Η εξαρτώμενη από το NAD⁺ μιτοχονδριακή αποακετυλάση σιρτουΐνη 3 (SIRT3) μεσολαβεί στην αποακετυλίωση της LONP1 και η αποσιώπηση της SIRT3 προκαλεί αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης, αλλά όχι του mRNA της (Gibellini et al., 2014).

A.2.2. Ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης με το σύστημα ουβικουτίνης-πρωτεασώματος (UPS)

Η ουβικουτίνωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών επιτρέπει στο οργανίδιο να ανταποκρίνεται γρήγορα στις μιτοχονδριακές και κυτταρικές προσβολές. Η ουβικουτίνη (Ub) είναι μια μικρή πρωτεΐνη 76 αμινοξέων που συνδέεται με κατάλοιπα λυσίνης (K) πρωτεϊνών-στόχων σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει ένζυμα ενεργοποίησης της Ub (E1), ένζυμα σύζευξης της Ub (E2) και λιγάσες Ub (E3), που σχηματίζουν συχνά αλυσίδες πολυ-Ub (Deol et al., 2019). Η σύζευξη της Ub με μία πρωτεΐνη μπορεί να μεταβάλει τη λειτουργία της και επιτρέπει την ταυτόχρονη πρόσδεση και άλλων πρωτεϊνών με περιοχές πρόσδεσης Ub. Όταν οι αλυσίδες πολυ-Ub συνδέονται με το κατάλληλο υπόστρωμα, η Ub δρα ως σήμα αποικοδόμησης αυτών των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με αλυσίδες πολυ-Ub στις λυσίνες K29 και K48 προορίζονται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, ενώ οι πρωτεΐνες που συνδέονται με πολυ-Ub αλυσίδες συνδεδεμένες στις λυσίνες K63 στοχεύουν για αποικοδόμηση μέσω της αυτοφαγίας, της μεταγωγής σήματος και της ενδοκυττάρωσης (Kwon & Ciechanover, 2017).

Οι πρωτεΐνες στην κυτταροπλασματική πλευρά της OMM βρίσκονται υπό τον έλεγχο του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS). Η πιο συνηθισμένη μορφή του πρωτεάσματος είναι το πρωτεάσωμα 26S, ένα μεγάλο πολυενζυμικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από το καταλυτικό σύμπλοκο 20S και ένα ή δύο ρυθμιστικά σύμπλοκα 19S προσαρτημένα στα άκρα του πυρήνα 20S (Baumeister et al., 1988). Το πρωτεάσωμα 20S έχει σχήμα κυλινδρικό και προσομοιάζεται με βαρέλι αποτελούμενο από τέσσερις δακτυλίους, εκ των οποίων οι δύο εσωτερικοί απαρτίζονται από επτά β-υπομονάδες (β1-β7) και οι δύο εξωτερικοί από επτά α-υπομονάδες (α1-α7) (Borissenko & Groll, 2007; Finley, 2009). Στις εσωτερικές β-υπομονάδες βρίσκονται τα ενεργά πρωτεολυτικά κέντρα του ολοενζύμου και οι εξωτερικές α-υπομονάδες διατηρούν ανοιχτή την «πύλη» για την είσοδο των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση (Pühler et al., 1992). Η ρυθμιστική υπομονάδα 19S αποτελείται από ένα εξαμερές σύμπλοκο AAA⁺ ATPασών που συντονίζει το ξεδίπλωμα και τη μετατόπιση του υποστρώματος στην υπομονάδα του πυρήνα και από πρωτεΐνες ικριώματος που εμπλέκονται στην αναγνώριση και από-ουβικουιτίνωση του υποστρώματος, καθώς και το άνοιγμα της πύλης (Rabl et al., 2008; Smith et al., 2007).

Όταν διαταράσσεται το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τα πρόδρομα μόρια πρωτεϊνών μπορεί να αντιμετωπίσουν πρόβλημα κατά την είσοδό τους στο μιτοχόνδριο και να συσσωρευτούν στην OMM, γεγονός που τις καθιστά προσιτές στα κυτταροπλασματικά συστήματα ποιοτικού ελέγχου (Weidberg & Amon, 2018), όπως το πρωτεάσωμα. Σε αντίθεση με τα διαλυτά υποστρώματα, οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε μεμβράνες απαιτούν ένα επιπλέον βήμα εξαγωγής από αυτές πριν οδηγηθούν στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Αυτή η λειτουργία εκτελείται κυρίως από την AAA⁺ ATPάση CDC48 στη ζύμη, ομόλογη της ανθρώπινης p97 ή πρωτεΐνη που περιέχει βαλοσίνη (valosin-containing protein, VCP) που συνδέεται με συμπράγοντες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα υποστρώματα, δεσμεύει τις ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες και τις στοχεύει στο πρωτεάσωμα 26S (Barthelme & Sauer, 2016; Franz et al., 2014). Οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες οδηγούνται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα μέσω ενός εξειδικευμένου μονοπατιού, το μιτοχονδριακό μονοπάτι αποικοδόμησης (Mitochondrial-associated degradation, MAD) (Heo et al., 2010).

A.2.2.1. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι αποικοδόμησης (MAD)

Το μονοπάτι MAD είναι ανάλογο του μονοπατιού αποικοδόμησης σχετιζόμενο με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (ER-associated degradation, ERAD) (Hwang & Qi, 2018) και μεσολαβεί την εξαγωγή ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών από την OMM και τη μεταφορά τους στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Εικ. A.2-3). Στο μονοπάτι MAD, η ATPάση CDC48/p97 υδρολύει τις ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη για να διευκολύνει την εξαγωγή τους και τη μεταφορά τους στο πρωτεάσωμα (Xu et al., 2011), υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο του μονοπατιού MAD στην ομοίωση των μιτοχονδρίων. Στη ζύμη, η CDC48/p97 δρα με τους συμπράγοντες Npl4-Ufd1 και σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών της OMM από το πρωτεάσωμα (Cohen et al., 2008; Heo et al., 2010; Matsumoto et al., 2019; Wu et al., 2016). Τα υποστρώματα του μονοπατιού περιλαμβάνουν παράγοντες που εμπλέκονται στη διατήρηση της μορφολογίας των μιτοχονδρίων (Cohen et al., 2008), στις περιοχές επαφής μιτοχονδρίων-ER (Wu et al., 2016) και στην εισαγωγή πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο (Wu et al., 2016). Μελέτες στη ζύμη έχουν δείξει πως η CDC48 στρατολογείται στα μιτοχόνδρια ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Heo et al., 2010) και ο συμπράγοντάς της Doa1 είναι απαραίτητος για τη σύνδεση του συμπλόκου CDC48 με τις οξειδωμένες ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες (Wu et al., 2016), συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και της μιτοχονδριακής μήτρας όπως η μιτοχονδριακή πρωτεάση LONP1/PIM1 (Liao et al., 2020). Αν και δεν είναι γνωστό πώς γίνεται η ουβικουιτίνωση αυτών των υποστρωμάτων στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, υποδεικνύουν πως το μονοπάτι MAD

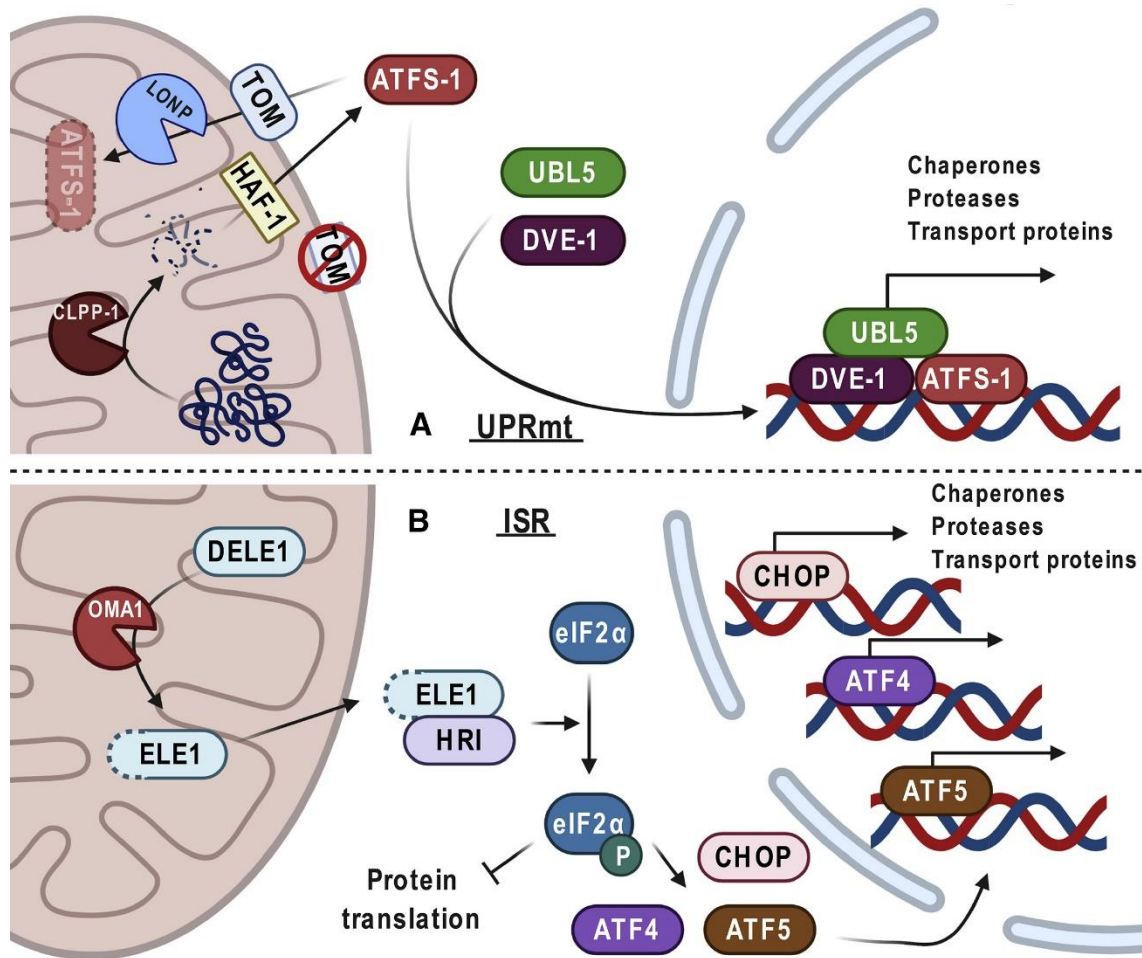
NLS) που είναι σημαντικό για την επιτήρηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας (Haynes et al., 2010) και μια μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης (mitochondrial targeting sequence, MTS) που τον κατευθύνει στη μιτοχονδριακή μήτρα και η πλειονότητα της πρωτεΐνης αποικοδομείται από την πρωτεάση LONP-1 (Nargund et al., 2012).

A.2.3.1(i) Ο μηχανισμός ενεργοποίησης

Η εισαγωγή των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο απαιτεί τους μηχανισμούς πρωτεϊνικής εισαγωγής που χρειάζονται λειτουργική αναπνευστική αλυσίδα για την παραγωγή μορίων ATP και μοριακούς συνοδούς για την αναδίπλωση και τη σωστή μετατόπιση του εισερχόμενου πεπτιδίου. Η δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας ή η διατάραξη της μιτοχονδριακής πρωτεόστασης μειώνει ή δεν επιτρέπει την εισαγωγή των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Αν ο ATFS-1 δεν μπορέσει να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια λόγω τέτοιων διαταραχών, τότε συσσωρεύεται στον πυρήνα όπου δεσμεύει συγκεκριμένα μοτίβα υποκινητών για να επάγει ή να περιορίσει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή βιογένεση, μιτοχονδριακές μοριακές συνοδούς και πρωτεάσες, συστατικά της οδού της γλυκόλυσης, αντιοξειδωτικά γονίδια, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την έμφυτη ανοσία (Nargund et al., 2015; Nargund et al., 2012). Ωστόσο, για την προστασία από το μιτοχονδριακό στρες, ο ATFS-1 πρέπει να εισέρχεται και στη μιτοχονδριακή μήτρα όπου δεσμεύει το mtDNA. Συγκεκριμένα, απαιτείται η ισορροπημένη κατανομή του ATFS-1 σε πυρήνα και μιτοχόνδριο, καθώς ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Nargund et al., 2015).

Παρόμοια με τον ATFS-1, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα DVE-1 (SABT2, η ανθρώπινη πρωτεΐνη με την αντίστοιχη λειτουργία (Shao et al., 2020)) εξαρτάται επίσης από τη μετατόπισή του στον πυρήνα μετά από μιτοχονδριακό στρες, σε μια διαδικασία που απαιτεί τη μιτοχονδριακή πρωτεάση CLPP-1 και το σχηματισμό συμπλόκου με την πρωτεΐνη τύπου ουβικουιτίνης UBL-5 (Haynes et al., 2007). Ο μεταγραφικός παράγοντας DVE-1 με την πρωτεΐνη UBL-5 αλληλεπιδρά με περιοχές της χρωματίνης που περιέχουν γονίδια απόκρισης στο μιτοχονδριακό στρες (Benedetti et al., 2006; Gao et al., 2019; Haynes et al., 2007; Tian et al., 2016), πιθανώς για να διατηρήσει τη χρωματίνη σε ανοιχτή κατάσταση ώστε να επιτρέπεται η πρόσδεση του ATFS-1 στα γονίδια στόχους. Τα πεπτιδία που παράγονται από την CLPP-1 απελευθερώνονται μέσω του εξαγωγέα πεπτιδίων της μήτρας HAF-1 για την ενεργοποίηση του ATFS-1 (Haynes et al., 2010). Η συσσώρευση των πεπτιδίων στο κυτταρόπλασμα πιθανώς προκαλεί τη μείωση της λειτουργικότητας του μηχανισμού της εισαγωγής πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο και αυξάνεται η μετατόπιση του ATFS-1 στον πυρήνα για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} (Haynes et al., 2010; Melber & Haynes, 2018; Nargund et al., 2012; Qureshi et al., 2017).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο *C. elegans* προκαλεί αμυντικούς μηχανισμούς και προσαρμοστικές αποκρίσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένη διάρκεια ζωής. Η ενεργοποίηση του UPR^{mt} έχει βρεθεί πως είναι απαραίτητη για τη μακροζωία ορισμένων μιτοχονδριακών μεταλλαγμάτων με μειωμένη δραστηριότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ανισορροπία επικοινωνίας μιτοχονδρίου πυρήνα (πχ. μειωμένη πρωτεϊνική εισαγωγή) (Durieux et al., 2011; Houtkooper et al., 2013; Sun et al., 2016; Wu et al., 2018). Ωστόσο, η αποτροπή της εισαγωγής του ATFS-1 στο μιτοχόνδριο μέσω μεταλλάξεων του MTS του, έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του UPR^{mt}, οδηγώντας σε σκουλήκια ανθεκτικά σε αρκετά είδη εξωγενούς στρες (Soo et al., 2021), αλλά με αναπτυξιακά προβλήματα και μικρή διάρκεια ζωής (Rauthan et al., 2013). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μόνιμη ενεργοποίηση του ATFS-1 στον πυρήνα δεν αρκεί για να αυξήσει τη διάρκεια ζωής αποσυνδέοντας έτσι την ενεργοποίηση του UPR^{mt} από τη μακροζωία (Bennett et al., 2014).



Εικόνα Α.2-4. Η μιτοχondριακή απόκριση στο στρες. (Α) UPR^{mt} στο *C. elegans*: Ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1 εισάγεται στα μιτοχόνδρια όπου αποικοδομείται από την πρωτεάση LONP-1. Σε συνθήκες μιτοχondριακού στρες, οι συσσωρευμένες μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στη μιτοχondριακή μήτρα αποικοδομούνται από την πρωτεάση CLPP-1. Τα πεπτιδικά θραύσματα απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα μέσω του εξαγωγέα HAF-1 και εμποδίζουν την μιτοχondριακή εισαγωγή πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να ευνοείται η μεταφορά του ATFS-1 στο πυρήνα που μαζί με τους παράγοντες DVE-1 και UBL-5 επάγει τη μεταγραφή μοριακών συνοδών, πρωτεασών και άλλων γονιδίων απόκρισης στο στρες. (Β) ISR στα θηλαστικά: Η διάσπαση της πρωτεΐνης DELE1 από OMA1 οδηγεί στην μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα όπου αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί την κινάση HRI. Η φωσφορυλίωση του eIF2α από την κινάση HRI αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση και ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες CHOP, ATF4, ATF5 για να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων της απόκρισης στο στρες (Ng et al., 2021).

A.2.3.1(ii) Απόκριση σε παθογόνα

Η μιτοχondριακή δυσλειτουργία χρησιμεύει ως δείκτης μόλυνσης από παθογόνο και μερικά από τα πρώτα ευρήματα που δείχνουν πως τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στην άμυνα από μόλυνση με παθογόνο, βρέθηκαν στο *C. elegans*. Ο νηματώδης έχει ως κύρια πηγή τροφής τα βακτήρια, αρκετά από τα οποία παράγουν τοξίνες που διαταράσσουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η αναγνώριση του παθογόνου από τον οργανισμό γίνεται παρακολουθώντας τις ενδοκυτταρικές του λειτουργίες όπως τη μιτοχondριακή λειτουργία, τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος ή αποδοτικότητα της μετάφρασης (Dunbar et al., 2012; Kirienko et al., 2013; Liu et al., 2014; McEwan et al., 2012; Melo & Runkun, 2012) και ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν ξενοβιωτικά γονίδια αποτοξίνωσης και αντιμικροβιακά γονίδια για τον περιορισμό της βακτηριακής μόλυνσης και την εξάλειψη των τοξικών ενώσεων.

Εκτός από το ρόλο του στη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, το UPR^{mt} επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία και στην αντιοξειδωτική απόκριση του οργανισμού (Liu et al., 2014; Pellegrino et al., 2014). Τα παθογόνα είδη *Pseudomonas aeruginosa* για το *C. elegans* εκκρίνουν μόρια που αναστέλλουν ή διαταράσσουν τη δράση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και ενεργοποιούν το UPR^{mt} (Deng et al., 2019; Kirienko et al., 2013; Liu et al., 2014; Pellegrino et al., 2014). Κατά τη μόλυνση από *P. aeruginosa*, η πρωτεΐνη bZIP ZIP-3 συσσωρεύεται και αναστέλλει τη δράση του ATFS-1. Η αναστολή της ZIP-3 οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα του ATFS-1 και αυξημένη επιβίωση στο παθογόνο (Deng et al., 2019). Επίσης, σκουλήκια με απώλεια του γονιδίου *atfs-1* πεθαίνουν γρηγορότερα από του αγρίου τύπου κατά την έκθεση στο *P. aeruginosa*, και η συνεχής ενεργοποίηση του UPR^{mt}, από τον μόνιμο εντοπισμό του ATFS-1 στον πυρήνα, βοηθάει στην απομάκρυνση του παθογόνου και αυξάνει την επιβίωσή τους (Deng et al., 2019). Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας αποτελεί δείκτη μόλυνσης από παθογόνο και ενεργοποιεί μια έμφυτη ανοσολογική απόκριση εξαρτώμενη από τον ATFS-1 (Haynes & Hekimi, 2022). Ένα σημαντικό εύρημα είναι πως η ανίχνευση του παθογόνου από το *C. elegans* απαιτεί την παραγωγή του μεταβολίτη φαιναζίνη, ένα μεταφορέα ηλεκτρονίων που εκκρίνεται από το *P. aeruginosa* και διαταράσσει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενεργοποιώντας το UPR^{mt} (Deng et al., 2019).

A.2.3.1(iii) Το μονοπάτι ενσωματωμένης απόκρισης στο στρες

Στα θηλαστικά, το UPR^{mt} αποτελεί τμήματος ενσωματωμένης απόκρισης στο στρες (Integrated stress response, ISR). Το ISR είναι ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην επιλεκτική αναστολή ενός συνόλου γονιδίων, ενώ ταυτόχρονα ευνοεί την έκφραση γονιδίων απόκρισης στο στρες, οδηγώντας στο συνολικό γονιδιακό, πρωτεϊνικό και μεταβολικό επαναπρογραμματισμό (Εικ. A.2-4B). Η έναρξη της σηματοδότησης του μονοπατιού ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση του ετεροτριμερή ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (Eukaryotic initiation factor 2, eIF2). Ανάλογα το είδος στρες που επικρατεί, ο eIF2 φωσφορυλιώνεται από τις τέσσερις εξειδικευμένες κινάσες PRK (protein kinase R), GCN2 (general control non-depressible 2), PEKR (PRK-like endoplasmic reticulum kinase) και HRI (heme-regulated inhibitor) (Donnelly et al., 2013). Η παραγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA) κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων ενεργοποιεί την κινάση PKR, η υπερβολική ποσότητα μη φορτισμένων μορίων tRNA κατά την έλλειψη θρεπτικών ενεργοποιεί την κινάση GCN2, η υπερσυσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ER την κινάση PERK και οξείες καταστάσεις έλλειψης αίμης ενεργοποιούν την κινάση HRI, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του eIF2 συγκεκριμένα στη σερίνη 51 (*ser51*) που εμποδίζει τη δράση του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης του eIF2 (eIF2B) και τη γενική μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Hinnebusch, 2014).

Η φωσφορυλίωση του eIF2 ενεργοποιεί επίσης τη μεταγραφή συγκεκριμένων mRNA, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activating transcription factor, ATF) (Costa-Mattioli & Walter, 2020). Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ATF αποτελείται από 8 διαφορετικά μέλη και οι ATF4 και ATF5 είναι τα λειτουργικά ομόλογα του ATFS-1 στον άνθρωπο (Fiorese et al., 2016; Quirós et al., 2017). Ο ATF5 επάγει παρόμοια μεταγραφική απόκριση σε σύγκριση με τον ATFS-1 και μπορεί να σώσει τη λειτουργία του UPR^{mt} σε στελέχη *C. elegans* με απώλεια του ATFS-1 (Fiorese et al., 2016) υποδεικνύοντας τη μεγάλη συντήρηση του UPR^{mt} μεταξύ *C. elegans* και θηλαστικών. Η διαφορά του μονοπατιού μεταξύ *C. elegans* και θηλαστικών, έγκειται στο γεγονός πως ενώ στα θηλαστικά το ISR είναι απαραίτητο για την μετέπειτα ενεργοποίηση του UPR^{mt}, στο *C. elegans* δρα μάλλον συμπληρωτικά ως προς το κανονικό μονοπάτι ενεργοποίησης του UPR^{mt} μέσω ATFS-1, καθώς η

εξαρτώμενη από την κινάση GCN-2 φωσφορυλίωση του eIF2α δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση του ATFS-1 (Baker et al., 2012).

A.2.4. Τα μονοπάτια ενεργοποίησης από μιτογόνα p38 MAPK

Ο σηματοδοτικός καταρράκτης φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinase, MAPK) p38 είναι εξελικτικά συντηρημένος και εμπλέκεται στη ρύθμιση αποκρίσεων στο στρες ή σε παθογόνα, αλλά και σε φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η καρκινογένεση και η απόπτωση (Maik-Rachline et al., 2020; Plotnikov et al., 2011). Το γονιδίωμα του *C. elegans* περιέχει τρία ομόλογα γονίδια της p38 MAPK, τα *pmk-1*, *pmk-2* και *pmk-3*, τα οποία μαζί με ένα επιπλέον γονίδιο αναρροϊκά τους, το *islo-1*, κωδικοποιούνται από ένα πολυγονιδιακό μεταγράφημα ενός οπερονίου, υπό τη δράση ενός ευρέως εκφραζόμενου υποκινητή (Andrusiak & Jin, 2016). Οι κινάσες PMK-1 και PMK-2 έχουν μεγάλη ομολογία, με 62% ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας και διαθέτουν το χαρακτηριστικό μοτίβο TGY που βρίσκεται στο βρόχο ενεργοποίησης των p38 MAPK (Berman et al., 2001). Η PMK-1 ρυθμίζει την έμφυτη ανοσία στο έντερο του *C. elegans* και ενεργοποιείται από ένα καταρράκτη σηματοδότησης MAPK που αποτελείται από την κινάση p38 MAPK SEK-1 και την MAPKKK NSY-1, ομόλογες με τις MKK3/6 και ASK1 των θηλαστικών, αντίστοιχα (Kim et al., 2002; Shivers et al., 2009). Αναρροϊκά του NSY-1 δρα η πρωτεΐνη προσαρμογέας TIR-1 (Toll-Interleukin-1 Receptor), ομόλογη της ανθρώπινης SARM, για την ενεργοποίησή του (Couillault et al., 2004; Liberati et al., 2004). Η κινάση PMK-2 εντοπίζεται κυρίως στο νευρικό σύστημα του *C. elegans* και μαζί με την κινάση PMK-1 ενεργοποιούνται από τον ίδιο σηματοδοτικό καταρράκτη και ρυθμίζουν τη ανάπτυξη των νευρώνων και τις συμπεριφορικές αποκρίσεις στα παθογόνα (Pagano et al., 2015). Αντιθέτως η κινάση PMK-3 ρυθμίζεται από τον σηματοδοτικό καταρράκτη DLK-1 (MAP3K) και MKK-4 ή MLK-1 (MAPKKs) και ρυθμίζει το σχηματισμό των συνάψεων (Nakata et al., 2005) ή την αναγέννηση των αξόνων έπειτα από τραυματισμό (Hammarlund et al., 2009; Yan et al., 2009). Η PMK-3 προάγει επίσης τη διαφοροποίηση των αισθητικών νευρώνων BAG, οι οποίοι αντιλαμβάνονται τα χημικά σήματα του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) που προέρχονται από παθογόνα στα σκουλήκια (Brandt & Ringstad, 2015; Horowitz et al., 2019).

Είναι γνωστό πως μια ήπια μιτοχονδριακή βλάβη ενεργοποιεί την έμφυτη ανοσολογική απόκριση, το μονοπάτι UPR^{mt}, αλλά μπορεί και να αυξήσει τη διάρκεια ζωής στο *C. elegans*. Η μακροζωία που παρατηρείται σε στελέχη με μιτοχονδριακή βλάβη, απαιτεί τη σηματοδότηση και του ATFS-1 και του p38/PMK-1 (Campos et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως μακρόβια σκουλήκια λόγω μειωμένης αντίληψης της πρόσληψης θρεπτικών, απαιτούν τη φυσιολογική λειτουργία της ανοσολογικής απόκρισης για την αυξημένη διάρκεια ζωής τους. Η φυσιολογική όμως λειτουργία που απαιτείται, είναι η μειορύθμιση -και όχι η αυξορύθμιση- του μονοπατιού p38 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα ATF-7 (Wu et al., 2019). Επομένως, η απόκριση της έμφυτης ανοσίας, που σηματοδοτείται από την ενεργοποίηση του καταρράκτη p38/PMK-1, απαιτείται για τη μεγάλη διάρκεια ζωής των μιτοχονδριακών μεταλλαγμάτων ανεξάρτητα από την προστασία που παρέχει σε παθογόνα (Campos et al., 2021).

A.2.4.1. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποίησης από μιτογόνα p38 MAPK (MAPK^{mt})

Αν και η δράση της κινάσης PMK-1 στην απόκριση στο στρες είναι καλά μελετημένη, ελάχιστα είναι γνωστά για τη δράση της PMK-3 σε τέτοιες αποκρίσεις. Προσφάτως, αναγνωρίστηκε ένας σηματοδοτικός καταρράκτης φωσφορυλίωσης που απαιτείται για την αυξημένη διάρκεια ζωής μιτοχονδριακών μεταλλαγμάτων με διαταραγμένη αναπνευστική αλυσίδα. Η σηματοδότηση αυτή αποτελεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι p38/MAPK (MAPK^{mt}) που δρα συμπληρωματικά του UPR^{mt} και ορίζεται από τις κινάσες DLK-1 (MAP3K), SEK-3 (MAPKK) και PMK-3 (MAPK) (Munkacsy et al., 2016).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την αποσιώπηση ή διαγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην αναπνευστική λειτουργία ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *tbb-6* που εκφράζει μια βήτα τουμπουλίνη (Munkacsy et al., 2016), ομόλογη των ανθρώπινων TUBB3 (tubulin beta 3 class III), TUBB6 (tubulin beta 6 class V) και TUBB8B (tubulin beta 8B) (WormBase version WS289). Οι βήτα τουμπουλίνες συμμετέχουν στον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και εκτελούν πολλαπλές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η δομική υποστήριξη του κυττάρου. Η επαγωγή του *tbb-6* δεν επηρεάζεται από την παρεμβολή στη σηματοδότηση των γνωστών μονοπατιών απόκρισης στο στρες που σηματοδοτούν στον πυρήνα και έχει εδραιωθεί ως το γονίδιο μάρτυρας της ενεργοποίησης του MAPK^{mt} (Munkacsy et al., 2016). Ωστόσο η ενεργοποίηση του MAPK^{mt} υπό συνθήκες διατάραξης της αναπνευστικής αλυσίδας, απαιτεί προηγουμένως την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAD (Munkacsy et al., 2016) που αναλύθηκε προηγουμένως. Ακόμη βρέθηκε πως το MAPK^{mt} ενεργοποιείται ανεξάρτητα από τον μεταγραφικό παράγοντα DAF-16/FOXO αλλά και από τους μεταγραφικούς παράγοντες SKN-1/NRF και ATFS-1/ATF5 που, αντιθέτως, η αποσιώπησή τους αυξάνει περαιτέρω την επαγωγή του *tbb-6*. Στις συνθήκες μιτοχονδριακού στρες που προκαλούνται από τη διατάραξη της αναπνευστικής αλυσίδας, η ενεργοποίηση του SKN-1 απαιτεί και την ενεργοποίηση του ATFS-1 (Munkacsy et al., 2016).

Η πρωτεΐνη TBB-6 δεν φαίνεται να έχει λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της διάρκειας ζωής των μακρόβιων μεταλλαγμάτων, αλλά είναι πιθανό να είναι στόχος των μεταγραφικών παραγόντων C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Protein) και να επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες (Munkacsy et al., 2016).

A.2.5. Η μιτοφαγία

Η μιτοχονδριακή αυτοφαγία ή μιτοφαγία είναι μια κυτταρική διαδικασία κατά την οποία τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια στοχεύονται για επιλεκτική αποικοδόμηση από το λυσοσώμα (Kissoná et al., 2004- Lemasters, 2005). Είναι δηλαδή ένας μηχανισμός ποιοτικού ελέγχου σε επίπεδο οργανιδίου, που επιτρέπει την ανακύκλωση των συστατικών των οργανιδίων ως απάντηση στις αλλαγές του κυτταρικού περιβάλλοντος. Η διατάραξη του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ή η αποπόλωση των μιτοχονδρίων αποτελούν ενδείξεις μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και ανάγκης για απομάκρυνση ή ανακύκλωση των μιτοχονδρίων. Ως αποτέλεσμα, εξασθενείται η εισαγωγή των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο και η κινάση PINK1 (PTEN induced putative kinase 1), ο κύριος διαμεσολαβητής της μιτοφαγίας, συσσωρεύεται στην OMM και επιστρατεύει την E3 λιγάση ουβικουιτίνης PARKIN (Bertolin et al., 2013). Αρχικά η PINK-1 αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται, και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες στην OMM και την PARKIN στη Ser65 (Koyano et al., 2014). Η φωσφορυλιωμένη PARKIN αρχίζει να ουβικουιτινώνει διάφορες πρωτεΐνες στην OMM, οι οποίες αποτελούν νέα υποστρώματα της φωσφορυλίωσης της PINK1, δημιουργώντας έναν θετικό βρόχο ανατροφοδότησης που τελικά επικαλύπτει τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια με μια αλυσίδα φωσφο-ουβικουιτίνης (Barazzuol et al., 2020). Η πολύ-ουβικουιτινωση των πρωτεϊνών δρα σαν σήμα μεταφοράς του οργανιδίου στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Mouton-Liger et al., 2017; Narendra et al., 2008; Pickrell & Youle, 2015). Τέλος, η οδός της μιτοφαγίας μπορεί να κατακλυστεί κατά τη διαδικασία της γήρανσης με αποτέλεσμα να συσσωρευτούν τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια στο κύτταρο. Επομένως η αύξησή της είναι συχνά προστατευτική για το κύτταρο και σχετίζεται με μειωμένη κυτταρική γήρανση στα θηλαστικά και αυξημένη διάρκεια ζωής στο *C. elegans* (Palikaras et al., 2015).

A.3. Ο *Caenorhabditis elegans* ως οργανισμός μοντέλο

Η μικρή διάρκεια ζωής του *C. elegans* τον καθιστά έναν ιδανικό οργανισμό μοντέλο για μελέτες της γήρανσης. Όταν καλλιεργείται σε πιάτα με άγαρ ή σε υγρές καλλιέργειες με μοναδική τροφή το εργαστηριακό στέλεχος OP50 του *E. Coli* στους 20° C, τότε τα ερμαφρόδιτα αγρίου τύπου (N2) στελέχη έχουν κύκλο ζωής περίπου 3 ημέρες και μέση διάρκεια ζωής 18-20 ημέρες. Στη φύση εντοπίζεται κυρίως σε περιβάλλοντα πλούσια σε βακτήρια και οργανική ύλη σε αποσύνθεση. Εδραιώθηκε σαν οργανισμός μοντέλο από τον Sydney Brenner και έκτοτε χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την έρευνα στην αναπτυξιακή βιολογία, νευροβιολογία και γήρανση. Μέχρι σήμερα, από τη μελέτη του *C. elegans* έχουν αποδοθεί τρία βραβεία Νόμπελ για την περιγραφή του μηχανισμού της απόπτωσης (2002), την ανακάλυψη του μηχανισμού RNA παρεμπόδισης (RNAi) (2006) και για την εισαγωγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε ζωντανό οργανισμό για την παρακολούθηση του κυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών (2008). Επιπλέον, ολόκληρο το γονιδίωμα του έχει αλληλουχηθεί και έχει πλήρως χαρακτηρισμένη κυτταρική γενεαλογία.

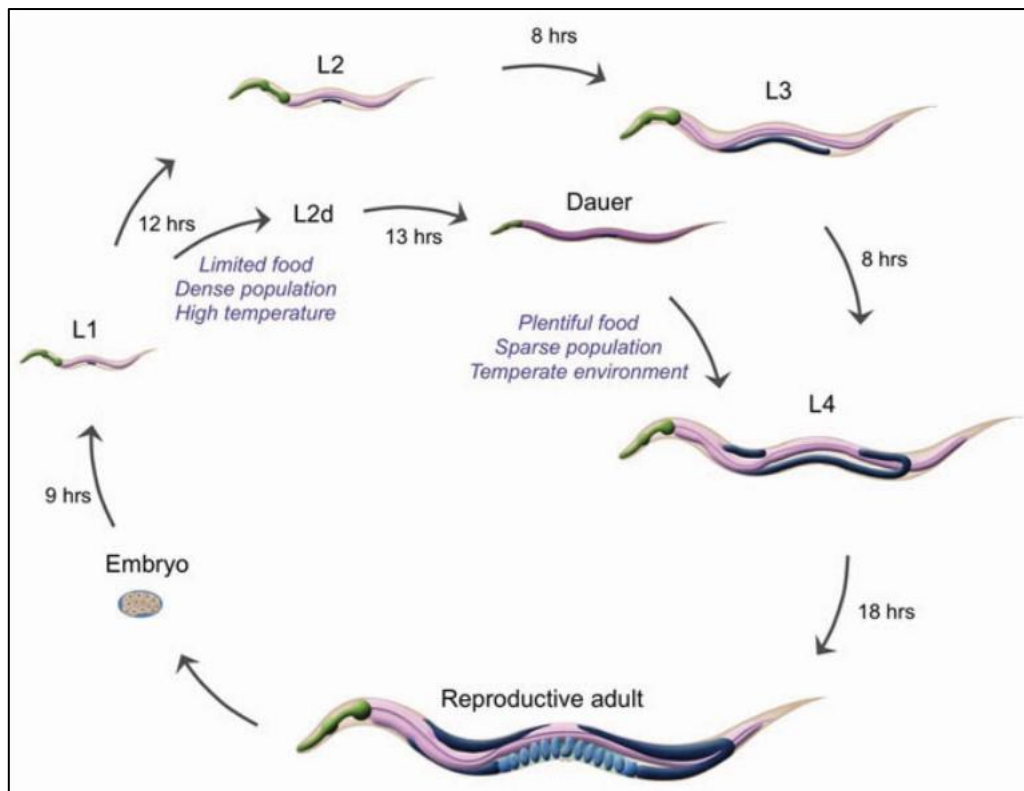
Τα ενήλικα σκουλήκια έχουν μήκος περίπου ενός χιλιοστού, κάνοντας εύκολη και φθηνή την καλλιέργεια μεγάλων πληθυσμών. Αν και στην πλειοψηφία τους οι νηματώδεις *C. elegans* είναι ερμαφρόδιτοι (XX), στη φύση εμφανίζεται και το αρσενικό φύλο (XO) σε συχνότητα 0,1% και είναι το αποτέλεσμα του μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Τα ερμαφρόδιτα σκουλήκια αυτογονιμοποιούνται και παράγουν έως και 300 απογόνους, αλλά κατά τη γονιμοποίησή τους από αρσενικά σκουλήκια μπορούν να φτάσουν τους 1000, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο αριθμός απογόνων τους περιορίζεται από την παραγωγή σπέρματος των ερμαφρόδιτων σκουληκιών. Καθώς η διασταύρωση ερμαφρόδιτων και αρσενικών σκουληκιών ακολουθεί τη Μενδελική κληρονομικότητα, γίνεται εύκολη η εργαστηριακή παραγωγή διπλά μεταλλαγμένων στελεχών μέσω γενετικών διασταυρώσεων.

Η αποσιώπηση των γονιδίων του γίνεται εύκολα μέσω RNAi με απευθείας ένεση ή εμποτισμό των ατόμων σε dsRNA είτε με την κατανάλωση βακτηρίων που παράγουν dsRNA (Ohkumo et al., 2008). Η δημιουργία νέων διαγονιδιακών στελεχών είναι επίσης γρήγορη διαδικασία, καθώς μέσω μικροενέσεων τη γονάδα μπορεί να ενσωματωθεί το επιθυμητό DNA στους υπό ανάπτυξη γαμέτες του *C. elegans*. Επιπλέον, το διάφανο σώμα τους επιτρέπει την εύκολη παρατήρηση μεμονωμένων κυττάρων σε απλό μικροσκόπιο και την υποκυτταρική κατανομή πρωτεϊνών συντηγμένων με GFP *in vivo*. Λόγω των χαρακτηριστικών του, είναι εφικτή η εύκολη εφαρμογή πρόσθιων και αναστροφών γενετικών αναλύσεων είτε με τυχαία είτε με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση όπως η μέθοδος CRISPR/Cas9 (Dickinson & Goldstein, 2016).

A.3.1. Ο κύκλος ζωής

Ο *C. elegans* αναπτύσσεται από αυγό σε ενήλικο άτομο αναπαραγωγικής ηλικίας μέσα σε 3 ημέρες περνώντας μέσα από 4 προνυμφικά στάδια (L1, L2, L3, L4) σταδιακών εκδύσεων που ακολουθούν μια περίοδο ληθάργου (Εικ. A.3-1). Στο τέλος του σταδίου L4, αναδύεται ένα πλήρως αναπαραγωγικό ενήλικο άτομο αποτελούμενο από 959 σωματικά κύτταρα τα οποία είναι μεταμιτωτικά και οι μόνες κυτταρικές διαίρεσεις που συμβαίνουν έπειτα από αυτό, γίνονται μόνο στη γαμετική σειρά κυττάρων. Αν ο *C. elegans* βρεθεί σε συνθήκες που του προκαλούν στρες, όπως ο υπερπληθυσμός, η μειωμένη παροχή τροφής ή η αλλαγή στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, οι προνύμφες του σταδίου L1 ακολουθούν ένα διαφορετικό μονοπάτι του κύκλου ζωής, μπαίνοντας σε ένα εναλλακτικό στάδιο L2, μετά το τέλος του οποίου εισέρχονται σε μια μορφή διάπαυσης που ονομάζεται «dauer» (Fielenbach & Antebi, 2008). Στο στάδιο αυτό, η επιδερμίδα καλύπτει τελείως την προνύμφη εμποδίζοντάς τη να τραφεί και να αναπτυχθεί (Riddle et al., 1981; Vowels & Thomas, 1992). Η επιδερμίδα του σταδίου *dauer*, καθιστά επίσης το ζώο ανθεκτικό σε διάφορα είδη στρες (Hu,

2007). Αυτή η μορφή είναι η κύρια με την οποία συναντάται στη φύση και μπορεί να διατηρηθεί ακόμη και 4 μήνες (Klass & Hirsh, 1976). Όταν οι συνθήκες γίνουν και πάλι ευνοϊκές τότε η προνύμφη μπορεί να αποβάλλει το κάλυμμά της και να εισέλθει σε ένα ελαφρώς παραλλαγμένο στάδιο L4 και να συνεχίσει το φυσιολογικό κύκλο ζωής του (Cassada & Russell, 1975).



Εικόνα A.3-1. Ο κύκλος ζωής του νηματώδη *C. elegans*. Τα διάφορα προνυμφικά στάδια, από την εκκόλλαψη των αυγών έως το αναπαραγωγικά ενήλικο άτομο, σε φυσιολογικές ή στρεσογόνες συνθήκες καλλιέργειας (Herndon et al., 2017).

A.3.2. Η ανατομία

Παρά την απλότητα του οργανισμού, *C. elegans* διαθέτει επιδερμίδα, μύες, νευρικό σύστημα, πεπτικό και εκκριτικό σύστημα και αναπαραγωγικό σύστημα. Το σώμα του αποτελείται από δύο ομόκεντρους σωλήνες που χωρίζονται από έναν χώρο γεμάτο με υγρό, το ψευδοκοιλίωμα και το σχήμα του διατηρείται από την εσωτερική υδροστατική πίεση (Riddle et al., 1997).

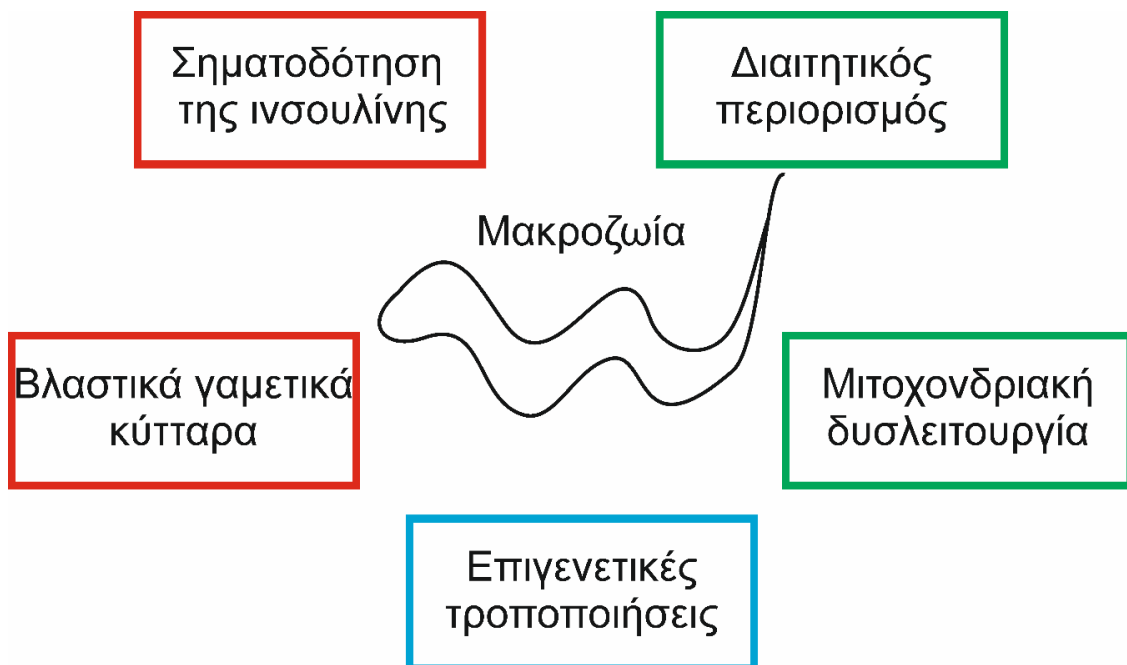
Ο εξωτερικός σωλήνας που περιβάλλει το ζώο συνιστά ένα προστατευτικό στρώμα που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο, λιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες και καθορίζει το σχήμα του οργανισμού, και σχηματίζεται από την εξωκυττάρια ουσία που εκκρίνουν τα υποκείμενα επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας. Η επιδερμίδα έχει σημαντικό ρόλο στη μηχανική υποστήριξη και στο σχήμα του οργανισμού, στην επικοινωνία με το περιβάλλον, καθώς και στην προστασία από παθογόνα. Σε κάθε ένα από τα 4 στάδια προνύμφης εκκρίνεται μια νέα επιδερμίδα, με ειδική σύνθεση ανά στάδιο, και αποβάλλεται η παλιά επιδερμίδα. Εσωτερικά της επιδερμίδας βρίσκονται τα μυϊκά κύτταρα που διατάσσονται σε τέσσερις επιμήκειες σειρές που συνδέονται με την επιδερμίδα μέσω ενός λεπτού στρώματος υποδερμίδας. Η συντονισμένη σύσπαση των δύο κοιλιακών και των δύο ραχιαίων μυϊκών σειρών δημιουργεί την ημιτονοειδή κίνηση του ζώου. Άλλα συστατικά αυτού του εξωτερικού σωλήνα είναι το νευρικό σύστημα, η γονάδα και το εκκριτικό σύστημα (Riddle et al., 1997).

Ο εσωτερικός σωλήνας αποτελείται από τον μυώδη φάρυγγα με το σχεδόν αυτόνομο νευρικό του σύστημα και το έντερο. Τα περισσότερα νευρικά κύτταρα τοποθετούνται γύρω από το φάρυγγα, κατά μήκος της κοιλιακής και ραχιαίας νευρικής χορδής και στην ουρά. Οι περισσότεροι χημικοί και μηχανικοί αισθητήριοι νευρώνες εκτείνονται από την περιοχή του νευρικού δακτυλίου προς τα αισθητήρια όργανα κοντά στην άκρη του κεφαλιού. Ο νευρικός δακτύλιος λαμβάνει και ενσωματώνει τις αισθητήριες πληροφορίες και συνδέεται με κινητικούς νευρώνες στο κεφάλι ή κατά μήκος των νευρικών χορδών. Το ερμαφρόδιτο σκουλήκι έχει 302 νευρώνες ενώ το αρσενικό 383 όπου οι περισσότεροι νευρώνες εντοπίζονται κυρίως στην ουρά. Ο φάρυγγας αποτελείται από μια νευρομυϊκή βαλβίδα που αλέθει και διοχετεύει την τροφή στο έντερο προς πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών. Στο πρόσθιο άκρο του ενώνεται με τη στοματική κοιλότητα και το οπίσθιο με το έντερο. Το έντερο συνδέεται με την ορθική βαλβίδα κοντά στην ουρά η οποία ρυθμίζει την έκκριση των περιεχομένων του εντέρου στο περιβάλλον (Riddle et al., 1997).

Το αναπαραγωγικό σύστημα του ερμαφρόδιτου βρίσκεται εσωτερικά του ψευδοκοιλώματος και αποτελείται από δύο λειτουργικά ανεξάρτητους αναδιπλωμένους βραχίονες τον πρόσθιο και τον οπίσθιο, ενώ στα αρσενικά υπάρχει μόνο ένας βραχίονας. Κάθε βραχίονας του ερμαφρόδιτου αντιστοιχεί σε μια γαμετική σειρά κυττάρων που ξεκινάνε από το ακραίο περιφερικό κύτταρο κάθε βραχίονα, περνάνε από τη σπερματοθήκη και τα γονιμοποιημένα πλέον ωοκύτταρα εισέρχονται στη μήτρα για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης και εξέρχονται από τον σπερματικό πόρο (Riddle et al., 1997).

A.3.3. Η μελέτη της γήρανσης στον νηματώδη

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μελέτης του *C. elegans* είναι η διερεύνηση της διαδικασίας της γήρανσης. Καθώς η διάρκεια ζωής είναι ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να ρυθμιστεί γενετικά, στο *C. elegans* έχουν απομονωθεί διάφορα μεταλλάγματα με αυξημένη διάρκεια ζωής, καθώς και έχουν περιγραφεί γονίδια και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μακροζωία (Εικ. A.3-2).



Εικόνα A.3-2. Επιλεγμένα ρυθμιστικά μονοπάτια της διάρκειας ζωής στο *C. elegans*. Τα μονοπάτια που αυξάνουν τη διάρκεια ζωής βρίσκονται σε πράσινο, αυτά που επιταχύνουν τη γήρανση σε κόκκινο, και το μπλε υποδηλώνει διαφορετική επίδραση στη διάρκεια ζωής ανάλογα με τους παράγοντες που στοχεύονται. Όλα αυτά τα μονοπάτια είναι συνδεδεμένα και πολλές φορές έχουν μερικώς επικαλυπτόμενους καταρροϊκούς μηχανισμούς για να ρυθμίσουν τη διάρκεια ζωής. Τροποποιημένο από (Mack et al., 2018).

Τα δύο πρώτα μεταλλάγματα που βρέθηκαν πως οδηγούν σε αύξηση της διάρκειας ζωής ήταν τα *age-1* και *daf-2*, τα οποία λειτουργούν μέσω της οδού του μονοπατιού της ινσουλίνης (Dorman et al., 1995; Kimura et al., 1997). Η ανακάλυψη του τρίτου μακρόβιου μεταλλάγματος *clk-1*, γονίδιο που κωδικοποιεί για μια μιτοχονδριακή υδροξυλάση και απαιτείται για τη βιοσύνθεση της ουβικινόνης (συνένζυμο Q10), συνέδεσε γρήγορα το μιτοχονδριακό στρες με τη μακροζωία, παρά τη διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Ewbank et al., 1997; Wong et al., 1995)]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι αρκετά είδη ήπιων μιτοχονδριακών διαταραχών μπορούν να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής, συμπεριλαμβανομένης της δυσλειτουργίας της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) (Dillin et al., 2002; Feng et al., 2001; Lee et al., 2003) και της αναστολής της μετάφρασης του μιτοχονδριακού mRNA (Houtkooper et al., 2013). Ωστόσο, ορισμένες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και η διατάραξη της λειτουργίας του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγούν στη μειωμένη διάρκεια ζωής αυτών των σκουληκιών, επομένως δεν έχουν όλες οι μιτοχονδριακές καταπονήσεις ευεργετικές επιδράσεις στη διάρκεια ζωής (Hartman et al., 2001; Ishii et al., 1998; Yang & Hekimi, 2010b).

Το μονοπάτι που επηρεάζει τη μακροζωία σε απόκριση στο μιτοχονδριακό στρες, είναι γενετικά διακριτό από τα μονοπάτια σηματοδότησης που έχουν αναγνωριστεί προηγουμένως να αυξάνουν τη διάρκεια ζωής, όπως το μονοπάτι της ινσουλίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16 της οικογένειας FOXO, ο οποίος απαιτείται για την παράταση της διάρκειας ζωής των μεταλλαγμάτων *daf-2* (Lin et al., 1997), δεν απαιτείται για την αυξημένη διάρκεια ζωής των μεταλλαγμάτων *clk-1(e2519)* (Arantes-Oliveira et al., 2002; Dillin et al., 2002). Επιπλέον, οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις των *clk-1* και *daf-2* δρουν προσθετικά στην αύξηση της διάρκειας ζωής υποδηλώνοντας πως το μιτοχονδριακό στρες και το μονοπάτι της ινσουλίνης αυξάνουν τη διάρκεια ζωής με διαφορετικό μηχανισμό. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του *C. elegans* υπάρχει συνεχής κυτταρικός επαναπρογραμματισμός καθώς η μακροζωία που παρατηρείται από το ήπιο μιτοχονδριακό στρες εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο θα γίνει το στρες (Dillin et al., 2002; Durieux et al., 2011; Naresh & Haynes, 2019). Επομένως ο *C. elegans* είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος πειραματικός οργανισμός ιδανικό για τη βασική έρευνα στη βιολογία της γήρανσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών της.

A.4. Σκοπός της μελέτης

Η γήρανση είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο με μεγάλη επίδραση στον άνθρωπο, ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που την επιτελούν. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική μείωση των φυσιολογικών διεργασιών, αύξηση της θνησιμότητας, και ύπαρξη συνοδών παθολογικών καταστάσεων. Πολλές θεωρίες υποστηρίζουν πως η γήρανση προκαλείται από τη συσσώρευση κυτταρικών βλαβών με την αύξηση της ηλικίας. Η πιο δημοφιλής από αυτές, αυτή του οξειδωτικού στρες, προτείνει πως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) που παράγονται από τον κανονικό μεταβολισμό, γίνονται επιβλαβείς όταν βρίσκονται σε περίσσεια, συμβάλλοντας έτσι στην οξειδωτική βλάβη των μακρομορίων και των οργανιδίων. Κατά τη διαδικασία της γήρανσης τα αντιοξειδωτικά συστήματα και οι μηχανισμοί ελέγχου ποιότητας χάνουν την αποδοτικότητά τους, οπότε η ομοιόσταση του κυττάρου διαταράσσεται. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει υπερπαραγωγή ROS και πτώση επιπέδων ATP -λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας- που συνεισφέρουν στη διατάραξη της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (πρωτεόστασης), έναν από τους κύριους παράγοντες της γήρανσης. Επομένως, οι μηχανισμοί διασφάλισης της μακροζωίας που αποτρέπουν τέτοιες βλάβες και διατηρούν την ακεραιότητα του πρωτεώματος, θεωρούνται ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες στα κύτταρα συνεχώς βλάπτονται από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, οι ελεύθερες ρίζες και οι τοξικές ενώσεις. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να

προκαλέσουν κακή αναδίπλωση ή συσσωματώματα πρωτεϊνών που καταλήγουν σε κυτταρική δυσλειτουργία. Όταν μη λειτουργικές πρωτεΐνες συσσωρεύονται στο κύτταρο, αποικοδομούνται επιλεκτικά από διαφορετικά πρωτεολυτικά συστήματα. Στο κυτταρόπλασμα, πυρήνα και ενδοπλασματικό δίκτυο, υπεύθυνο για την αποικοδόμησή τους είναι το πρωτεάσωμα. Στα οργανίδια όμως που δεν έχουν το πρωτεάσωμα, αυτό το ρόλο τον αναλαμβάνουν άλλες πρωτεάσες, που δεν είναι τόσο εκτενώς μελετημένες. Οι εξελικτικά συντηρημένες ATP-εξαρτώμενες πρωτεάσες LON είναι παρούσες σε όλα τα ευκαρυωτικά οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων, των χλωροπλαστών και των υπεροξεισωμάτων και αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των κακώς ή μη αναδιπλωμένων ή οξειδωμένων πρωτεϊνών στα οργανίδια, δρώντας ως μοριακοί συνοδοί και ως πρωτεάσες. Η ευκαρυωτική ισομορφή της LON στα μιτοχόνδρια έχει συσχετιστεί με τη διατήρηση της ομοιότητας των πρωτεϊνών και με την προσαρμοστικότητα του κυττάρου σε οξειδωτικό στρες. Ωστόσο ο ρόλος της σε διεργασίες που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή απόκριση στο στρες και τη γήρανση δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Για την διευκρίνιση αυτών των διαδικασιών στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans*, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο στη διερεύνηση της γήρανσης, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της έλλειψης της πρωτεάσης LONP1 (στο νηματώδη LONP-1) σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό. Ελέγχθηκε πώς η απώλειά της σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος (*lonp-1*) επηρεάζει την συμπεριφορά, την ανάπτυξη, την αντοχή σε συνθήκες στρες και τη διάρκεια ζωής του νηματώδους. Ακόμη, εξετάστηκε η αναγκαιότητα της LONP-1 για τη φυσιολογική μιτοχονδριακή μορφολογία και πρωτεόσταση των κυττάρων. Τέλος, εξετάστηκε πώς η απώλειά της επηρεάζει τη λειτουργία και την αλληλεπίδραση γνωστών μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου και σηματοδοτικών μονοπατιών απόκρισης στο στρες. Συνολικά, η παρούσα εργασία αποτελεί μία προσπάθεια αναγνώρισης των φυσιολογικών λειτουργιών για τις οποίες είναι αναγκαία η λειτουργία της LONP-1 και το πώς η απορρύθμισή της επηρεάζει τους προσαρμοστικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς, σε επίπεδο οργανισμού.

B. Μέθοδοι και Υλικά

B.1. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

B.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε με τη συλλογή των νηματώδων από τρυβλία NGM με διάλυμα M9 (Πίνακας B.8-1) και τη μεταφορά τους σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (1,5 ml), το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 2000 rpm. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα εναιωρήθηκε σε καθαρό M9 διάλυμα. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η παρουσία των βακτηρίων στο διάλυμα σταμάτησε να είναι ορατή. Μετά το τελευταίο πλύσιμο, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε μέχρι να μείνουν ~ 250 μl διαλύματος M9. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης για DNA με πρωτεΐνωση K (Πίνακας B.1-2) και το δείγμα επωάστηκε στους 65°C όλο το βράδυ, με ελαφριά ανάδυσή του τις πρώτες ώρες επώασης ώστε οι νηματώδεις να διαλυθούν πλήρως. Την επόμενη ημέρα, προστέθηκε ίσος όγκος (~500 μl) διαλύματος φαινόλης:χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1), το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 13.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση είναι εμφανής ο διαχωρισμός των δύο φάσεων και προσεκτικά μεταφέρθηκε η επάνω σε νέο σωληνάκι, όπου προστίθηκαν 1/10 του υπάρχοντα όγκου 3M CH₃COONa και 2,5 φορές ο όγκος του 100% αιθανόλη, για να κατακρημνιστεί το DNA. Εκτελέστηκε μία ακόμη φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm και στο πέρας της, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα που περιέχει το DNA αφέθηκε να στεγνώσει τελείως, με ανοιχτό καπάκι. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20-40 μl ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

B.1.2. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση RNA συλλέχθηκαν 200-300 νηματώδεις από τρυβλία NGM με διάλυμα M9, μεταφέρθηκαν σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (1,5ml), το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 2000rpm. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα εναιωρήθηκε σε καθαρό M9 διάλυμα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου η παρουσία των βακτηρίων στο διάλυμα σταμάτησε να είναι ορατή. Μετά το τελευταίο πλύσιμο, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα νηματώδων ψύχθηκε για τουλάχιστον μία ώρα στους -80° C. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πραγματοποίηση της διαδικασίας, στον ταχύτερο δυνατό χρόνο, για αποφυγή τυχόν αλλοιώσεων του προφίλ γονιδιακής έκφρασης οργανισμών. Μετά την ψύξη προστέθηκαν στο δείγμα 700 μl Tri Reagent (Sigma-Aldrich), και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση με μηχανική πίεση, μέσω εμβόλου. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 12.000 x g και στους 4° C, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα θραύσματα και τα υπολείμματα που προέκυψαν από την ομογενοποίηση. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι και παρέμεινε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός διαχωρισμού των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Κατόπιν, προστέθηκαν 150 μl χλωροφόρμιου και ακολούθησε ισχυρή ανάμιξη των δειγμάτων, τα οποία μετά αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 12.000 x g στους 4° C. Προέκυψε μία πάνω φάση όγκου περίπου 400 μl, η οποία μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι, στο οποίο προστέθηκε ίσος όγκος 2-προπανόλης και 1 μl Glycogen Blue (15mg/ml – Ambion). Επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν σε 12.000 x g για 10 λεπτά, στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα πλύθηκε δύο φορές με προσθήκη παγωμένης 75% αιθανόλης. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 12.000 x g στους 4° C. Ύστερα, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, το ίζημα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει, για 10 λεπτά και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε

σε 20 μl αποστειρωμένου ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες. Για να διευκολυνθεί η επαναδιάλυση, έγινε επώαση στους 55° C. Η συγκέντρωση των RNA έγινε με τη χρήση του nanodrop spectrophotometer.

B.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

B.2.1. Πολυμεράσες και εκκινητές

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωτική (Πίνακας B.1-1) διαλύθηκαν σε διάλυμα TE (10 mM Tris/ 1 mM EDTA, pH 8). Για την ενίσχυση τμημάτων DNA που χρησιμοποιήθηκαν για τις κατασκευές RNAi στο νηματώδη, χρησιμοποιήθηκαν πολυμεράσες υψηλής πιστότητας με ενσωματωμένη δραστηριότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης. Αυτό ελαχιστοποίησε σημαντικά τη συχνότητα σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του DNA. Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης κάθε εκκινητή βασίστηκε στον τύπο "Tm=69,3+0,41(%GC)-" 650/L (όπου L: μήκος εκκινητή και %GC: το ποσοστό βάσεων γουανίνης/κυτοσίνης του εκκινητή) και προσαρμόστηκε ανάλογα με τον πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας B.2-1. Εκκινητές PCR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για προσδιορισμό γονοτύπου

Εκκινητές	Ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (5' → 3')	Στόχος
Εκκινητές για προσδιορισμό γονοτύπου		
CD.Cas9.LON.Frw	ACGTTTTACTCGGGATCTGGT	<i>lonp-1(ko)</i> με CRISPR/Cas9
CD.Cas9.LON.Rev	ATCGACAAGCTTCAAACCGC	
Lon FRW	CGTTTTACTCGGGATCTGGTC	<i>lonp-1(ko)</i>
C34B2.5 Rev	GCTTCCACAGCAGATTCCC	
Lon Rev	GATATTACCGAATCGTCTGCAC	Αγρίου τύπου <i>lonp-1(ko)</i>
Lon Frw Agel	TTAACCGGTCCATGTCACCGATTCAAGTGCC	
haf-1 Frw	GGTGGCGGCAGATGTTAATC	<i>haf-1(ok705)</i>
haf-1 Rev	CCGACAAATTTTCTCGCCCT	
hif-1 Frw	TTACAATGGCTCGAAACAACC	<i>hif-1(ia4)</i>
hif-1 Rev	GTGTCATTCATGCAAGGTATC	
pmk-1 Frw	GTTGCCATGACCTCAGAGC	<i>pmk-1(km25)</i>
pmk-1 Rev	CAGTTTGACGTGCCAATCCA	
pmk-3 Frw	TTTTCACTGCGTCTCAATCG	<i>pmk-3(ok169)</i>
pmk-3 Rev	GCATTACATAGCCAGTTTCC	
cdc-48.2 Frw	TCTATTGATGGAGCCCTTCG	<i>cdc-48.2(tm659)</i>
cdc-48.2 Rev	CACGAGCACTTCTGTCCTGA	
atfs-1 Frw	ATGTTTTCCCGTGTGGGACGT	<i>atfs-1(gk3094)</i>
atfs-1 Rev	CGAACATTTTTCCGTGAAGATAACT	
zip-2 Frw	ACTCACCGTCCAGGATG	<i>zip-2(ok3730)</i>
zip-2 Del	TGAGGTTGGTGAATAAGGGA	
Εκκινητές για κατασκευές RNAi		
atfs-1 Frw	ATGTTTTCCCGTGTGGGACGT	<i>atfs-1(RNAi)</i>
atfs-1 Rev	CGAACATTTTTCCGTGAAGATAACT	
cbp-1i Frw	AACTGCAGCTAATTGATGGATGAACCACCATC	<i>cbp-1(RNAi)</i>
cbp-1i Rev	GCTCTAGACCCTTGATGCATCATTGGATATC	
cbp-3 Frw	GAATCAATCATGGAACAACCTGTG	<i>cbp-3(RNAi)</i>
cbp-3 Rev	CACACAAATGTTCTCAACGTGAG	
cdc-48.1 Frw	ATGGCCTCGGTTCCAACGCA	<i>cdc-48.1(RNAi)</i>

cdc-48.1 Rev	AACTGCAGCCACAAGGTTAGAACGACCC	
clpp-1 Frw	TTAAGCTTATGATAAGTGCACCAGTGTCC	<i>clpp-1(RNAi)</i>
clpp-1 Rev	CATGGATCCTTTAATCTGATGGCATTGATCC	
daf-16i Frw	CAATGAGATTTATCAATGGTTCTC	<i>daf-16α(RNAi)</i>
daf-16i Rev	CGATTGAGTTCCGGGACTG	
dlk-1i Frw	ATCTAGACGCTATCTCCGAACCTGAA	<i>dlk-1(RNAi)</i>
dlk-1i Rev	ACTCGAGAAAATGATTGCCATCTGAGC	
dve-1i Frw	ATCTAGACACTCTTTACGAAATTCCACG	<i>dve-1(RNAi)</i>
dve-1i Rev	ACTCGAGTGGGTGCAACATCAGG	
isp-1i Frw	AGCTCTGCAGGCATCAACTGGGGCAATGGC	<i>isp-1(RNAi)</i>
isp-1i Rev	CGGACTCGAGGATAGAACTCCTCCAGCTGT	
hsf-1i Frw	CCACCGGTATGCAGCCAACAGGGAATC	<i>hsf-1(RNAi)</i>
hsf-1i Rev	GGCTCGAGTTAAACCAAATTAGGATCCGATGG	
let-92i Frw	GAGAAGCTTGATAAAGCACTAATCG	<i>let-92(RNAi)</i>
let-92i Rev	ATCTAGAACGTCTCCGAGATATCC	
pmk-3i Frw	TCGAGATGTATACGTTGTCACTG	<i>pmk-3(RNAi)</i>
pmk-3i Rev	GATTAACGGTGATGAGCTGAG	
sek-3i Frw	TTCTAGAAATCGACACAATCTGGC	<i>sek-3(RNAi)</i>
sek-3i Rev	ACTCGAGCCGACATCAACAGACTGAG	
skn-1i Frw	GGGAAGCTTCCAACACTACGCCTACATTGG	<i>skn-1(RNAi)</i>
skn-1i Rev	GGGCTCGAGCTTGTCGTGACGATCCGTG	
ubl-5i Frw	TTTGAAGAAGTTGATCGCTGC	<i>ubl-5(RNAi)</i>
ubl-5i Rev	TGAATCCCTCGTGAATCTCG	
Εκκληητές για RT-qPCR		
atfs-1 PT1	ATGTTTTCCCGTGTGGGACGT	<i>atfs-1</i>
atfs-1 RT2	TCCGAAGCTGGTCGTTCTATG	
ben-1 RT1	CGTATGTCAATGAGAGAAGTCG	<i>ben-1</i>
ben-1 RT2	CGGCGGAACATTGCTGTAAT	
C17H12.8 RT1	GATTGACGTTCCAGAAGACCAAC	<i>C17H12.8</i>
C17H12.8 RT2	CACAGTTTTCCGCCACAATGC	
cbp-1 RT1	TCCTCCGAATGGACAAGTTC	<i>cbp-1</i>
cbp-1 RT2	CAATAGCCGTTGGTGGTCTT	
cbp-3 RT1	GAATCAATCATGGAACAACACTGTG	<i>cbp-3</i>
cbp-3 RT2	GGACATCAGTCAAGAACCAAC	
daf-21 RT1	TCTCGAAATCAACCCAGACC	<i>daf-21</i>
daf-21 RT2	CTCAGCTCCCTCAATCTTGG	
F44E5.4 RT1	CAGAATGGAAAGGTTGAGATCCTC	<i>hsp-70</i>
F44E5.4 RT2	CATCGAAACGTCGTCCAATCAATC	
gst-4 RT1	TGCTCAATGTGCCTTACGAG	<i>gst-4</i>
gst-4 RT2	AGTTTTTCCAGCGAGTCCAA	
gst-13 RT1	CAAATCCCAATCTATGGCAATTG	<i>gst-13</i>
gst-13 RT2	TCCAAGCAAGAATCACTGGATAATC	
hsf-1 RT1	GCATAACAATATGAATAGCATGG	<i>hsf-1</i>
hsf-1 RT2	GACGTCCTTGACAAAACACGG	
hsp-1 RT1	TGACAAGTCCACCGGAAAGC	<i>hsp-1</i>
hsp-1 RT2	TGATCTTATCCTTGAGCTTCTCG	
hsp-3 RT1	CATTGCCAACGACCAAGGAAAC	<i>hsp-3</i>
hsp-3 RT2	AATGGCCAGTGCTTGATGTCAG	
hsp-4 RT1	TGGCAAACCGTACTGTGATG	<i>hsp-4</i>
hsp-4 RT2	CGCAACGTATGATGGAGTGAT	

hsp-16.1 RT1	CTCCATCTGAATCTTCTGAGATTG	<i>hsp-16.1</i>
hsp-16.1 RT2	CTTGAATTGATAATGTATGTCCATCC	
hsp-16.2 RT2	CCTTGAACCGCTTCTTTCTTTG	<i>hsp-16.2</i>
hsp-16.2 RT3	CCATCTGAGTCTTCTGAGATTGTT	
hsp-6 RT1	GGTTCAAAGGACTTAAAGGTCG	<i>hsp-6</i>
hsp-6 RT2	GTTGTTGACGGTGGTCCC	
hsp-60 RT1	AGATCGAGAAGCGAATCGAG	<i>hsp-60</i>
hsp-60 RT2	GGTGACACGGTCCTTCTTCT	
hsp-70 RT1	TTCAATGGGAAGGACCTCAA	<i>hsp-70</i>
hsp-70 RT2	CCTCCAGCTGTTTCAATTCC	
irg-1 RT1	AATATTTTCATGTACAATAAGGCGTTG	<i>irg-1</i>
irg-1 RT2	CCTTTGATTTTTGAGACCATAATTTTC	
irg-2 RT1	CGACGAGTTTTACTTCCGAAAA	<i>irg-2</i>
irg-2 RT2	GCTCGAGACTAGATCCCAAGTG	
irg-5 RT1	GCAAATAACGATCAGGTTGCAT	<i>irg-5</i>
irg-5 RT2	AAGCGGTGTAATCAGGTCCA	
lonp-1 RT1	CATGTACCCGAAGGAGCAA	<i>lonp-1</i>
lonp-1 RT2	GCGATCACTTTTTCCCGAAT	
mtl-1 RT1	ATGGCTTGCAAGTGTGACTG	<i>mtl-1</i>
mtl-1 RT2	GCTTCTGCTCTGCACAATGA	
pmk-3 RT1	TCGAGATGTATACGTTGCTCACTG	<i>pmk-3</i>
pmk-3 RT2	GCGAGATTTCTGGTTTCAAG	
sod-3 RT1	TCGGTTCCCTGGATAACTTG	<i>sod-3</i>
sod-3 RT2	CATAGTCTGGGCGGACATTT	
tbb-1 RT1	GCATGTCCATGAGAGAGGTTG	<i>tbb-1</i>
tbb-1 RT2	AGCTCCTGGATAGCAGTGGA	
tbb-2 RT1	GACGCATGTCGATGAGAGAG	<i>tbb-2</i>
tbb-2 RT2	GGCGGAACATAGCAGTGAAC	
tbb-6 RT1	ACGTTCAAGTTGGACAATGTGG	<i>tbb-6</i>
tbb-6 RT2	GAACATACTTTTCGACCTCCATC	

B.2.2. Σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-PCR

Για να προσδιοριστεί η αφθονία της μεταγραφής mRNA με ποσοτική RT-PCR (RT-qPCR), χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι νηματώδεις, που αφέθηκαν να εναποθέτουν αυγά για 1-3 μέρες. Οι απόγονοι καλλιεργήθηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία ανάπτυξης έως ότου να φτάσουν το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης. Στην συνέχεια, απομονώθηκε ολικό RNA και έγινε σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή μέσω του συστήματος iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Η διεργασία ξεκίνησε με την απόκτηση συγχρονισμένων πληθυσμών νηματώδων μέσω της κατεργασίας ενήλικων ατόμων με αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη και συλλέχθηκαν σε διάλυμα M9 όταν έφτασαν το επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο. Φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 200rpm και το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε καθαρό διάλυμα M9. Ακολούθησε επανάληψη της διαδικασίας έως ότου σταμάτησε να είναι αντιληπτή η παρουσία βακτηρίων. Όταν ολοκληρώθηκε το τελευταίο πλύσιμο, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα αποτελούμενο από τους σκώληκες, επαναιωρήθηκε σε 5μl M9. Κατόπιν προστέθηκε στα δείγματα ίσος όγκος διαλύματος λύσης για RNA με πρωτεΐνάση K (Πίνακας B.1-2) και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 65° C και μετά για 5 λεπτά στους 85° C. Το διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για απευθείας σύνθεση cDNA με χρήση του συστήματος Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific). Κατασκευάστηκαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις κάθε δείγματος από ανεξάρτητους πληθυσμούς. Η

ποσοτική RT-PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα SsoFast™ EvaGreen Supermic (Bio-Rad) σε μηχάνημα MiniOpticon MJ (Bio-Rad). Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε γονίδιο αναφοράς, το *ama-1*, που κωδικοποιεί για μια υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας παραμένουν σταθερά σε όλη τη διάρκεια ζωής του σκώληκα. Οι σχετικές ποσότητες του mRNA προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο συγκριτικών Ct (Comperative Ct method) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν συγκριτικά με το στέλεχος μάρτυρα. Η απεικόνιση και η στατιστική επεξεργασία (ασύζευκτη ανάλυση *t-test*) των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism (version 8.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

B.2.3. PCR σε ολόκληρους νηματώδεις

Για ταχεία ταυτοποίηση γονοτύπων που έχουν προκύψει από διασταύρωση στελεχών, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε ολόκληρους σκώληκες, χωρίς την απομόνωση DNA. Συλλέχθηκαν μερικοί νηματώδεις (1-15) μέσα σε 2,5-5 μl διαλύματος TE και ψύχθηκαν στους -80° C για τουλάχιστον 30 λεπτά, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί θραύση των ιστών με μεγαλύτερη ευκολία. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης με πρωτεΐνάση K (Πίνακας B.1-2) και έγινε επώαση στους 65° C για 90 λεπτά και μετά στους 98° C για 30 λεπτά, με στόχο την απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης. Το τελικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν σαν μήτρα για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης..

Πίνακας B.2-2. Σύσταση διαλύματος λύσης (2X) για DNA

Συστατικό	Συγκέντρωση
KCl	50mM
Tris-HCl pH 8,3	10mM
MgCl ₂	2,5mM
Triton X-100	0,45%
Tween 20	0,45%
Πριν τη χρήση προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml	

B.3. Ανάλυση Western Blot

Για την κατασκευή των πηκτωμάτων ακρυλαμίδης (*gel*): τοποθετούμε τα 2 τζαμάκια το ένα πάνω στο άλλο δημιουργώντας μια εσοχή ανάμεσα τους (1,5mm). Ελέγχουμε αν υπάρχουν διαρροές βάζοντας νερό και προσθέτουμε το separating gel με μια πιπέτα ανάμεσα στα δύο τζαμάκια. Από πάνω προσθέτουμε 1-2ml ισοπροπανόλη και περιμένουμε 20-60 λεπτά έως ότου πολυμερισθεί το gel. Έπειτα, αφαιρούμε την ισοπροπανόλη, βάζουμε από πάνω το stacking gel και τέλος το χτενάκι ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα.

Πίνακας B.3-1. Σύσταση Gel.

Συστατικά	12% Separating Gel	5% Stacking Gel
dH ₂ O	3,2 ml	2,8ml
1,5M Tris-HCL pH 8,8	2,6ml	-
1,5M Tris-HCL pH 6,8	-	0,5ml
29:1 Acrylamide:Bis (30%)	4ml	0,66ml
10% SDS	100μl	40μl

10% APS	100μl	40μl
TEMED	10μl	4μl

Για το φόρτωμα των δειγμάτων και την ηλεκτροφόρηση: Αφού βγάλουμε τα δείγματα από τους -80°C, τα τοποθετούμε σε νερό που βράζει για 5 λεπτά, κάνουμε vortex και spin down. Στο πρώτο πηγαδάκι βάζουμε τον marker (5μl Page Ruler Prest). Ηλεκτροφορούμε τα δείγματα σε running buffer, στα 80-100V όσο βρίσκονται στο stacking gel και στην συνέχεια στα 150-160V μέχρι να γίνει ο επιθυμητός διαχωρισμός των ζωνών.

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη: όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, αφαιρούμε το gel από τα τζαμάκια, μετράμε το μέγεθος του και κόβουμε στις ίδιες διαστάσεις 4 φύλλα wattman και την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τοποθετούμε ένα σφουγγαράκι, από πάνω του 2 φύλλα wattman, στη συνέχεια το gel και από πάνω του την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετούμε άλλα 2 φύλλα wattman και τέλος άλλο ένα σφουγγαράκι. Βάζουμε αυτό το «σάντουιτς» στην συσκευή όπου θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά και το καλύπτουμε με transfer buffer. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται στα 300mA για 1 ώρα (υπό ανάδευση).

Για την δέσμευση μη ειδικών θέσεων και τον ανοσοφθορισμός: ύστερα από την μεταφορά των πρωτεϊνών, εμβαπτίζουμε την μεμβράνη σε γάλα 5% διαλυμένο σε TBS-T για 1 ώρα, ώστε να δεσμεύσουμε τις μη ειδικές θέσεις που μπορεί να αναγνωρίσουν τα αντισώματα. Στη συνέχεια, ξεπλύνουμε την μεμβράνη 2 φορές με διάλυμα TBS-T για 15-5 λεπτά και την επωάζουμε υπό ανάδευση με το πρωτογενές αντίσωμα overnight στους 4°C. Την επόμενη ημέρα ξεπλύνουμε 4 φορές την μεμβράνη με TBS-T για 30-5 λεπτά και επωάζουμε υπό ανάδευση την μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι διαλυμένο σε 1% γάλα. Τέλος, ξεπλύνουμε ξανά την μεμβράνη με TBS-T 3 φορές από 30-5 λεπτά και μια φορά με TBS για 5 λεπτά.

Για την εμφάνιση: Η εμφάνιση του σήματος βασίζεται στο σύστημα ανίχνευσης ECL (Enhanced Chemi-Luminescence) και στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Πιο αναλυτικά, η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο υπόστρωμα της υπεροξειδάσης όπου πραγματοποιείται διέγερση, και στην συνέχεια αποδιέγερση, της λουμινόλης λόγω οξειδωσης από την υπεροξειδάση, παρουσία H₂O₂ και εκπέμπεται φως το οποίο αποτυπώνεται σε φωτοευαίσθητα φιλμ. Αφού η υπεροξειδάση βρίσκεται σε σύμπλοκο με τα δύο αντισώματα και την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, η ποσότητα και η θέση του φωτός που καταγράφεται συνδέεται με την ποσότητα και την θέση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη.

Πίνακας Β.3-2. Διαλύματα για την ανάλυση Western blot.

Running Buffer	Transfer Buffer	10x TBS	TBS-T
100ml 10X Tris-glycine	100ml 10X Tris-glycine	24,22g Tris	100ml 10X TBS
10ml 10% SDS	10ml 10% SDS	87,66g NaCl	15ml 20% Tween 20
890ml dH ₂ O	200ml Methanol		885ml dH ₂ O
	690ml dH ₂ O		

Για την ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων των πρωτεϊνών: Σε κάθε δείγμα, πέρα από την πρωτεΐνη που θέλουμε να μελετήσουμε και να δούμε την ποσότητά της, εξετάζουμε και μια

πρωτεΐνη αναφοράς (πχ β-ακτίνη, α-τουμπουλίνη). Επομένως, σε κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πρωτογενή αντισώματα, ένα για την πρωτεΐνη που μελετάμε και ένα για την πρωτεΐνη αναφοράς. Οι πρωτεΐνες αναφοράς είναι δομικές συνήθως πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται το ίδιο σε όλα τα κύτταρα και στο σύνολο των στελεχών με παρόμοιο τρόπο και λειτουργούν ως μάρτυρες φορτώματος. Η ύπαρξη αυτών των μαρτύρων μας δίνει την ικανότητα να καταλάβουμε αν έχει φορτωθεί ίδια ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε πηγαδάκι κατά την ηλεκτροφόρηση, αν έχει γίνει ανοσομεταφορά και μας επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Οι πρωτεΐνες δεν θα πρέπει να έχουν το ίδιο μοριακό βάρος με την πρωτεΐνη στόχο. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών που εμφανίζονται στο φίλμ γίνεται με το πρόγραμμα Image J. Πιο συγκεκριμένα, μετράτε το μέγεθος της ζώνης της υπό μελέτη πρωτεΐνης, που είναι ανάλογο της ποσότητας της και στη συνέχεια κανονικοποιούμε με βάση την αντίστοιχη ζώνη της πρωτεΐνης-αναφοράς στελέχους αγρίου τύπου.

B.4. Καλλιέργεια και αποθήκευση βακτηριακών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Luria Bertani, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (Πίνακες B.4-1 και B.4-2), που προστέθηκε μετά την αποστείρωση του υλικού. Το στερεό θρεπτικό LB μετά την αποστείρωση και την προσθήκη αντιβιοτικού, διαμοιράστηκε σε τρυβλία διαμέτρου 94 mm ανά 25 ml. Για την αποθήκευση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη για δημιουργία στοκ με προσθήκη 1 όγκου γλυκερόλης 100% σε 2 όγκους καλλιέργειας βακτηρίων. Ακολούθως, αναδεύτηκαν ισχυρά και αποθηκεύτηκαν στους -80° C. Η χρήση τους πραγματοποιείται εφόσον έχουν αποθηκευτεί, με εμβολιασμό μικρής ποσότητας σε θρεπτικό υλικό.

Πίνακας B.4-1. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων βακτηρίων

LB		SOC	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)	Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
NaCl	10	Τρυπτόνη	20
Εκχύλισμα ζύμης	5	Εκχύλισμα ζύμης	5
Τρυπτόνη	10	NaCl	0,6
Άγαρ*	15	KCl	0,2
*Προστίθεται μόνο για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υποστρώματος		MgCl ₂	1
		MgSO ₄	2,4
		Γλυκόζη	3,6

Πίνακας B.4-2. Διαλύματα αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος (mg/ml)	Συγκέντρωση τελικού διαλύματος (mg/ml)
Αμπικιλίνη	dH ₂ O	200mg/ml	100μg/ml
Τετρακυκλίνη	Αιθανόλη	10mg/ml	10μg/ml
Στρεπτομυκίνη	dH ₂ O	200μg/ml	200ng/ml

B.5. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Προστέθηκαν 100-500ng DNA (ή 8-10μl από αντίδραση λιγάσης) μέσα σε 100 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά μέσα σε πάγο και ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42° C για 45 δευτερόλεπτα. Επωάστηκαν σε πάγο για 2 λεπτά και προστέθηκε διάλυμα SOC (Πίνακας B.4-1). Ακολούθησε επώαση για 45 λεπτά στους 37° C υπό ανάδευση. Στην συνέχεια, απλώθηκαν 100 μl σε τρυβλίο με LB άγαρ που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό. Το υπόλοιπο φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 4000 rpm, επαναδιαλύθηκε το ίζημα σε 100 μl υπερκείμενου και επιστρώθηκε σε νέο τρυβλίο. Τα τρυβλία επωάστηκα για 16 ώρες στους 37° C και κατόπιν ελέγχθηκαν για παρουσία βακτηριακών αποικιών.

B.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε, είτε για την διεξαγωγή διαγνωστικών πέψων, είτε για χρήση προς μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος βρασμού (Boiling-preps). Βακτηριακή αποικία εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό LB που περιείχε κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάστηκε για 16 ώρες στους 37° C, υπό ανάδευση (220 rpm). Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρήθηκε περίπου 1,5 ml της καλλιέργειας στις 12.000 rpm για 30-60 δευτερόλεπτα. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl διαλύματος STET (8% σακχαρόζης/ 5% Triton X-100/ 50 mM EDTA pH 8/ 5 mM Tris-HCl pH 8). Στην συνέχεια, προστέθηκαν 5 μl λυσοζύμης (20 mg/ml) και πραγματοποιήθηκε βρασμός για 1 λεπτό. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά, στις 13.000 rpm και το ίζημα αφαιρέθηκε. Προστέθηκε στο υπερκείμενο ίσος όγκος (~450 μl) 2-προπανόλης και αναδεύτηκε. Μετά, ψύχθηκε για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -20° C και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει πλήρως. Στην συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο και απαλλαγμένο από νουκλεάσες ddH₂O (40-50 μl).

B.7. Φορείς κλωνοποίησης

Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το pPD129.36 στην τροποποιημένη μορφή T444T (Tibor Vellai Lab, Addgene plasmid #113081; <http://n2t.net/addgene:113081>; RRID:Addgene_113081). Είναι ένας ενισχυμένος φορέας κλωνοποίησης RNAi, κατάλληλος για τον *C. elegans*. Περιέχει δύο υποκινητές της T7 RNA πολυμεράσης και δύο επιπρόσθετες τερματικές αλληλουχίες της πολυμεράσης δίπλα τους, οι οποίες περιβάλλουν μια αλληλουχία πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (multicloning site, MCS). Η T7 RNA πολυμεράση αναγνωρίζει του δύο αντίθετης κατεύθυνσης υποκινητές και μεταγράφει και τις δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες, ώστε να παραχθεί το δίκλωνο RNA εντός των βακτηρίων. Οι νηματώδεις σιτίζονται με τα βακτηριακά κύτταρα και με αυτόν τον τρόπο προκαλείται συστημική αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου μέσω του RNAi. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη και είναι κατάλληλος για μετασχηματισμό στελεχών DH5α και HT115 (επιπρόσθετη ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη).

B.8. Χειρισμοί στελεχών *C. elegans*

B.8.1. Καλλιέργεια, αποθήκευση και ψύξη στελεχών *C. elegans*

Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας νηματωδών παρασκευάζονται τα παρακάτω αρχικά διαλύματα:

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα καλίου (K·PO₄) 1M, pH 6,0: 108,3 g KH₂PO₄ και 35,6 g K₂HPO₄ διαλύονται σε 1 L ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται πριν τη χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Χοληστερόλη 5mg/ml: Διάλυση σε απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4°C.

MgSO₄ 1M: Διάλυση σε ddH₂O. Αποστειρώνεται πριν τη χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

CaCl₂ 1M: Διάλυση σε ddH₂O. Αποστειρώνεται πριν τη χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Αμπικιλίνη 100mg/ml: Διάλυση σε αποστειρωμένο ddH₂O. Διατηρείται στους -20°C.

Νυστατίνη 100mg/ml: Διάλυση σε 70% αιθανόλη. Το ελαιώδες που προκύπτει πρέπει να ανακινείται σχολαστικά πριν τη χρήση. Διατηρείται στους 4°C.

Πίνακας Β.8-1. Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος NGM

Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο	Τελική Συγκέντρωση
Α': Προστίθενται πριν από την αποστείρωση		
NaCl	3g	50mM
Πεπτόνη	2,5g	0,25% (w/v)
Άγαρ	17g	1,7% (w/v)
Στρεπτομυκίνη ¹	0,2g	200μg/ml
Β': Προστίθενται μετά από την αποστείρωση		
K·PO ₄ pH 6	25ml	25mM
Χοληστερόλη	1ml	5μg/ml
MgSO ₄	1ml	1mM
CaCl ₂	1ml	1mM
Αμπικιλίνη ²	500-1000μl	50-100μg/ml
Νυστατίνη ³	1ml	100μg/ml
¹ Αντιβιοτικό. Προστίθεται σε θρεπτικό που προορίζεται για επίστρωση του βακτηριακού στελέχους <i>E. coli</i> OP50 ² Αντιβιοτικό. Προστίθεται σε θρεπτικό που προορίζεται για επίστρωση του βακτηριακού στελέχους <i>E. coli</i> HT115 ³ Μυκητοστατικό. Προστίθεται σε συνδυασμό με την στρεπτομυκίνη σε θρεπτικό που προορίζεται για τρυβλία στοκ		

Η διαδικασία σύνθεσης του θρεπτικού παρουσιάζεται στον Πίνακα Β.8-1. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, προστίθενται τα συστατικά του Α' μέρους σε κάθε λίτρο θρεπτικού. Στη συνέχεια, μετά την αποστείρωση και υπό την προϋπόθεση ότι η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 55°C, προστίθενται τα υλικά του Β' μέρους. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1 L με αποστειρωμένο ddH₂O. Πριν τη στερεοποίηση, το θρεπτικό διανέμεται σε τρυβλία, χρησιμοποιώντας περισταλτική αντλία, σε διαστάσεις 6 cm ανά 12 ml ή 3 cm ανά 3 ml. Στη συνέχεια, οι τρυβλίες επικαλύπτονται με βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli*, η οποία αποτελεί τον τροφοδότη του νηματώδους.

Ανάλογα με την εκάστοτε κατάσταση, επιλέγεται το στέλεχος που χρησιμοποιείται για τη σίτιση. Για την καθημερινή διατήρηση και ανάπτυξη των σκουληκιών, επιλέγεται το βακτηριακό στέλεχος OP50. Το OP50 είναι αυξότροφο σε ουρακίλη, αποτρέποντας υπερβολική ανάπτυξη λόγω της έλλειψης ουρακίλης στο θρεπτικό NGM. Επιπλέον, είναι ανθεκτικό στη στρεπτομυκίνη, η οποία

προστίθεται στο θρεπτικό για την πρόληψη μολύνσεων. Το OP50 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα αυτής της διατριβής, εκτός από αυτά που περιλαμβάνουν αποσιώπηση γονιδίων με χρήση RNAi.

Ως εναλλακτική επιλογή στο στέλεχος OP50, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το στέλεχος HB101, το οποίο παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά. Για την εκτέλεση πειραμάτων που απαιτούν αποσιώπηση γονιδίων μέσω RNAi, επιλέγεται το στέλεχος HT115 (DE3). Το HT115 (DE3) διακρίνεται για την έλλειψη RNάσης III (*rnc-*), καθιστώντας το κατάλληλο για τη δημιουργία δίκλωνου RNA. Επιπλέον, φέρει το γονίδιο T7 RNA πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *lacZ*. Το διαγονίδιο ενσωματώνεται σε ένα τροποποιημένο προφάγο λDH3, ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, και περιλαμβάνει γονίδιο ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη. Μετά από ενεργοποίηση με IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), η T7 RNA πολυμεράση μπορεί να μεταγράψει οποιοδήποτε γονίδιο υπό τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή. Για την παραγωγή δίκλωνου RNA, χρησιμοποιείται ο φορέας κλωνοποίησης pPD129.36 (pL4440) για τον μετασχηματισμό του στελέχους HT115, ενώ η ανάπτυξη του στελέχους γίνεται συνήθως υπό παρουσία αμπικιλίνης για τη διατήρηση του πλασμιδίου και παραγωγή του δίκλωνου RNA. Προκειμένου να αποφευχθούν μολύνσεις, η ανάπτυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης υπό παρουσία τετρακυκλίνης.

Η ανάπτυξη του νηματώδους πραγματοποιείται στις θερμοκρασίες 15°C, 20°C ή 25°C. Η προσωρινή αποθήκευση των στελεχών γίνεται με εμβολιασμό τρυβλίων στοκ και φύλαξή τους στους 15°C, όπου διατηρούνται για περίπου 70 ημέρες. Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση των στελεχών *C. elegans* επιτυγχάνεται υπό τη μορφή παγωμένων στοκ γλυκερόλης. Η διαδικασία ψύξης περιλάμβανε το ξέπλυμα τρυβλίων που περιείχαν πολλά άτομα στο πρώτο προνυμφικό στάδιο L1, που μπορούν να επιβιώσουν σε αυτή την κατάσταση, με παγωμένο διάλυμα M9. Στο εναιώρημα που δημιουργήθηκε προστέθηκε ίσος όγκος παγωμένου διαλύματος ψύξης (Πίνακας B.8-2). Το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάκια (cryotubes) και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Η καλλιέργεια των διάφορων στελεχών *C. elegans* στη διάρκεια της διατριβής πραγματοποιήθηκε στους 20°C. Για την ανανέωση των στελεχών, πραγματοποιήθηκε μετεμβολιασμός νέων τρυβλίων, είτε με ασηπτική αποκοπή ενός κομματιού από το άγαρ και τοποθέτησή του ανεστραμμένο σε νέο τρυβλίο, είτε με επιλεκτική μεταφορά μερικών νηματωδών με πεπλατυσμένο πλατινένιο σύρμα. Για την απαλλαγή από περιστασιακές μολύνσεις χρησιμοποιήθηκε αλκαλικό διάλυμα υποχλωρίτη (20% χλωρίνη [5% NaClO]/10% NaOH [5M] ή KOH [5M]). Σταγόνες του διαλύματος τοποθετήθηκαν στην περιφέρεια απαλλαγμένου από μολύνσεις τρυβλίου NGM, και 5-10 αναπαραγωγικώς ενεργά άτομα μεταφέρθηκαν σε κάθε σταγόνα. Οι σταγόνες ανανεώνονταν τακτικά μέχρι την πλήρη αποσύνθεση των σωμάτων και την απελευθέρωση των αυγών. Παρατεταμένη παραμονή των αυγών στο διάλυμα μπορεί να παρεμποδίσει την εκκόλαψή τους. Μετά την εκκόλαψη, τα νεαρά άτομα μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο.

Πίνακας B.8-2. Σύσταση διαλυμάτων για την ψύξη του νηματώδους

Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο	Τελική Συγκέντρωση
Διάλυμα M9		
NaCl	5g	86mM
Na ₂ HPO ₄	6g	42mM
KH ₂ PO ₄	3g	22mM
MgSO ₄ 1M*	1ml	1mM
Διάλυμα Ψύξης		
NaCl	5,85g	100mM

Γλυκερόλη	300g (~200ml)	30% (w/v)
K ₂ PO ₄ pH 6*	50ml	50mM
0,1M MgSO ₄ *	3ml	0,3mM
*Προστίθενται μετά την αποστείρωση		

B.8.2. Παραγωγή αρσενικών ατόμων

Τα αρσενικά άτομα του νηματώδους (γονότυπος Χ0) προκύπτουν από τη μη διαχωρισμό των φυλετικών αδερφών χρωματίδων κατά τη μείωση, και εμφανίζονται σε χαμηλό ποσοστό υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, η συχνότητα παραγωγής τους αυξάνεται υπό συνθήκες στρες. Η διασταύρωση ενός αρσενικού ατόμου με ένα ερμαφρόδιτο οδηγεί στην παραγωγή μεγάλου αριθμού αρσενικών απογόνων (περίπου 50%) σύμφωνα με τη Μενδελική κληρονομικότητα. Η παραγωγή αρσενικών ατόμων στο εργαστήριο επιτυγχάνεται με τη συλλογή τυχαία παραγόμενων αρσενικών και τη διασταύρωσή τους με ερμαφρόδιτα άτομα του ίδιου στελέχους ή με την έκθεση ερμαφρόδιτων ατόμων προνυμφικού σταδίου L4 σε θερμοκρασία 30°C για 4-6 ώρες, που προκαλεί αυξημένο αριθμό αρσενικών απογόνων. Οι αρσενικοί απόγονοι μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο με περίσσεια ερμαφρόδιτων L4 του ίδιου στελέχους (αναλογία περίπου 1:4), προκειμένου να εξασφαλιστεί η παραγωγή περισσότερων αρσενικών στην επόμενη γενιά. Τα αρσενικά άτομα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται κανονικά για διασταυρώσεις.

B.8.3. Διασταύρωση στελεχών *C. elegans*

Οι διασταυρώσεις στελεχών *C. elegans* πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία NGM που επιστρώθηκαν με μικρή ποσότητα βακτηρίων OP50 σε μικρότερης ακτίνας, για να έρχονται τα άτομα πιο συχνά σε επαφή. Τα ερμαφρόδιτα άτομα τοποθετήθηκαν ως προνύμφες σταδίου L3-L4 προκειμένου να προληφθεί η αυτογονιμοποίηση με αρσενικά άτομα που είναι εμφανές το γένος τους, σε αναλογία 4:1. Η επιτυχία κάθε διασταύρωσης αξιολογήθηκε με βάση την παρουσία μεγάλου αριθμού αρσενικών ατόμων στη γενιά F1. Στη συνέχεια, απομονώθηκαν ερμαφρόδιτα άτομα της γενιάς F1 και οι απόγονοι τους (γενιά F2). Η επιβεβαίωση για την ύπαρξη των επιθυμητών μεταλλαγών ή διαγονιδίων έγινε είτε απευθείας στα άτομα της γενιάς F2 είτε στους απογόνους τους (γενιά F3), χρησιμοποιώντας τεχνικές PCR με τους κατάλληλους εκκινητές. Στις περιπτώσεις διασταύρωσης διαγονιδιακών στελεχών που φέρουν εξωχρωμοσωμική συστοιχία DNA, η παρουσία της αξιολογήθηκε μέσω του φθορισμού τους ή του φαινοτύπου τους.

B.8.4. Στελέχη *C. elegans*

Το αγρίου τύπου στέλεχος N2 και μερικά μεταλλαγμένα στελέχη αποκτήθηκαν από το Caenorhabditis Genetics Center (CGC, University of Minnesota), που χρηματοδοτείται από το NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Το μετάλλαγμα *lonp-1(ko)* δημιουργήθηκε με τη μέθοδο CRISPR-Cas σε σκουλήκια N2 (άγριου τύπου) (Dokshin et al., 2018; Farboud et al., 2019) και οι ενέσεις κι η ταυτοποίηση έγιναν από την Invermis Limited, Λονδίνο. Τα crRNAs που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαγραφή του πλήρους ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του LONP-1, καθώς και όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρατίθενται στον Β.8-3. Όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη διασταυρώθηκαν τουλάχιστον 3 φορές με το στέλεχος N2 και τα στελέχη που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν σε γενετικές διασταυρώσεις για την παραγωγή των διπλά μεταλλαγμένων ατόμων. Η παρουσία των μεταλλαγών ανιχνεύθηκε στα άτομα της γενιάς F2, είτε με PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.1-1, είτε μέσω φαινοτυπικής παρατήρησης.

Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Πίνακας Β.8-3. Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Στέλεχος	Γονότυπος	Πληροφορίες	Αναφορά
N2	N2 (Bristol)	Wild-type (wt)	CGC
BRF366	N2; <i>synEx31[rol-6(su1006)]</i>	Ένεση του pRF4 σε wt. Φαινότυπος rollers	Αυτή η μελέτη
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	Διασταύρωση με N2 5 φορές. knockout του <i>lonp-1</i> με τη μέθοδο CRISPR/Cas9	Αυτή η μελέτη
BRF367	<i>lonp-1(ko);synEx31[rol-6(su1006)]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με BRF366 ερμαφρόδιτα. Φαινότυπος rollers	Αυτή η μελέτη
BRF611	<i>lonp-1(ko);synEx455[lonp-1p::lonp-1::gfp;rol-6(su1006)]</i>	Στέλεχος διάσωσης <i>lonp-1</i> . Ένεση του <i>lonp-1p::lonp-1::gfp</i> (κλωνοποιημένο στο φορέα pPD95.77) στα <i>lonp-1(ko)</i> . Φαινότυπος rollers	Αυτή η μελέτη
SJ4103	<i>zcls14[myo-3p::gfp(mit)]</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει GFP στα μιτοχόνδρια των μυϊκών κυττάρων.	CGC
BRF811	<i>lonp-1(ko);zcls14[myo-3p::gfp(mit)]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με SJ4103 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
JV1	<i>unc-119(ed3)III;jrls1[rpl-17p::HyPer+unc119(+)]</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει τον αισθητήρα H ₂ O ₂ , HyPer	CGC
BRF802	<i>lonp-1(ko);jrls1[rpl-17p::HyPer+unc119(+)]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με JV1 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
SJ4100	<i>zcls13[hsp-6p::gfp, lin-15(+)]V</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει GFP κυρίως στην ουρά. Μάρτυρας του UPR ^{mt} .	CGC
BRF789	<i>lonp-1(ko);zcls13(hsp-6p::gfp, lin-15(+)]V</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με SJ4100 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
SJ4058	<i>zcls9[hsp-60p::gfp, lin-15(+)]V</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά με χαμηλή έκφραση GFP κυρίως στην ουρά. Μάρτυρας του UPR ^{mt}	CGC
BRF790	<i>lonp-1(ko);zcls9 hsp-60p::gfp, lin-15(+)]V</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με SJ4058 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
CF1407	<i>daf-16(mu86)I;muls71[daf-16ap::GFP::daf-16a];rol-6(su1006)IX</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει την πρωτεΐνη GFP::DAF-16a σε κυτταρόπλασμα και πυρήνα νευρώνων, μυϊκών/ εντερικών/ υποδερμικών κυττάρων	CGC
BRF801	<i>lonp-1(ko);muls71[daf-16ap::gfp::daf-16a];rol-6(su1006)IX</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με CF1407 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
CL2070	<i>dvls70[hsp-16.2p::gfp;rol-6(su1006)]</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει GFP έπειτα από HS. Μάρτυρας του HSR	CGC
BRF809	<i>lonp-1(ko);dvls70[hsp-16.2p::gfp;rol-6(su1006)]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με CL2070 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
RB867	<i>haf-1(ok705)IV</i>	Απώλεια λειτουργίας του <i>haf-1</i>	CGC
BRF820	<i>lonp-1(ko);haf-1(ok705)IV</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με RB867 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη

Στέλεχος	Γονότυπος	Πληροφορίες	Αναφορά
BRF767	<i>haf-1(ok705)IV;zcIs13[hsp-6p::gfp, lin-15(+)]V</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF820 με SJ4100 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF816	<i>lonp-1(ko)I;haf-1(ok705)IV;zcIs13[hsp-6p::gfp, lin-15(+)]V</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF820 με SJ4100 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
CL2166	<i>dvIs19[gst-4p::gfp::NLS] III</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας του οξειδωτικού στρες	CGC
BRF813	<i>lonp-1(ko)I;dvIs19[gst-4p::gfp::NLS]III</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με BRF813 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
CF1553	<i>muls84[sod-3p::gfp;rol-6(su1006)]</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει GFP σε κεφάλι, ουρά και γεννητικό πόρο	CGC
BRF105	<i>lonp-1(ko)I;muls84[sod-3p::gfp;rol-6(su1006)]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με BRF105 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
VC3201	<i>atfs-1(gk3094)V</i>	Απώλεια λειτουργίας του ZC376.7	CGC
GR2250	<i>mgIs73 [cyp-14A4p::gfp::cyp-14A 3'UTR+myo-2p::mCherry]</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει GFP κυρίως στο έντερο. Μάρτυρας της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας	CGC
BRF139	<i>lonp-1(ko); mgIs73 [cyp-14A4p::gfp::cyp-14A 3'UTR+myo-2p::mCherry]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με GR2250 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF140	<i>N2;Ex[ATF-4::GFP;pRF4 rol-6(su1006)]</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει την πρωτεΐνη T04C10.4 . Μάρτυρας του ISR.	(Rousakis et al., 2013)
BRF855	<i>lonp-1(ko)I;Ex[ATF-4::GFP;pRF4 rol-6(su1006)]</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με BRF140 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BS3383	<i>pmk-3(ok169) IV</i>	Απώλεια λειτουργίας του <i>pmk-3</i> (1.5kb διαγραφή)	CGC
BRF851	<i>lonp-1(ko);pmk-3(ok169) I;IV</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με BS3383 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
KU25	<i>pmk-1(km25)IV</i>	Απώλεια λειτουργίας του <i>pmk-1</i> (375bp διαγραφή)	CGC
BRF864	<i>lonp-1(ko);pmk-1(km25) I;IV</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με KU25 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
FX659	<i>cdc-48.2(tm659) II</i>	Απώλεια λειτουργίας του <i>cdc-48.2</i> (639bp διαγραφή)	CGC
BRF860	<i>lonp-1(ko);cdc-48.2(tm659) I;II</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με BRF867 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
VC3056	<i>zip-2(ok3730) III</i>	Απώλεια λειτουργίας του <i>zip-2</i> (476bp διαγραφή)	CGC

Στέλεχος	Γονότυπος	Πληροφορίες	Αναφορά
BRF843	<i>lonp-1(ko);zip-2(ok3730) I;III</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με VC3056 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
SLR115	<i>dvls67[tbb-6p::gfp + myo-3p::dsRed] N/A</i>	Σταθερή διαγονιδιακή σειρά που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας του MAPK ^{mt} (Munkacsy et al., 2016)	CGC
BRF859	<i>lonp-1(ko); dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών BRF791 με SLR115 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF874	<i>pmk-3(ok169); dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών SLR115 με BRF854 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF875	<i>pmk-3(ok169); lonp-1(ko); dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών SLR115 με BRF854 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF872	<i>pmk-1(km25); dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών SLR115 με BRF864 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF873	<i>pmk-1(km25); lonp-1(ko); dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών SLR115 με BRF864 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF862	<i>cdc-48.2(tm659);dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών SLR115 με BRF860 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη
BRF868	<i>lonp-1(ko);cdc-48.2(tm659);dvls67 (tbb-6p::GFP+myo-3p::dsRed)</i>	Διασταύρωση αρσενικών SLR115 με BRF860 ερμαφρόδιτα	Αυτή η μελέτη

B.9. Αποσιώπηση γονιδίων με RNAi μέσω σίτισης

Η RNAi αποσιώπηση γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της σίτισης πληθυσμού του νηματώδη με στέλεχος *E. coli* HT115, που είχε προηγουμένως μετασχηματιστεί με πλασμίδιο T444T, που φέρει κλωνοποιημένο τμήμα του επιθυμητού γονιδίου, έτσι ώστε να παραχθεί το αντίστοιχο δίκλωνο RNA. Η διαδικασία περιλάμβανε τα εξής βήματα: το βακτηριακό στέλεχος που επιλέχθηκε εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό LB, στο οποίο είχαν προστεθεί αντιβιοτικά, αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη και επώαστηκε για 16 ώρες στους 37° C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, νέο υγρό LB με αμπικιλίνη εμβολιάστηκε με μέρος (αναλογία 1:10) της καλλιέργειας. Η νέα καλλιέργεια επώαστηκε για 2-3 ώρες στους 37° C και υπό ανάδευση με σκοπό να φτάσει στην εκθετική φάση της ανάπτυξης. Σε αυτό το σημείο προστέθηκε IPTG (τελική συγκέντρωση 2 mM) για να επάγει την έκφραση του δίκλωνου RNA. Επώαστηκε ξανά για 3 ώρες στους 37° C, υπό ανάδευση. Μετά, επιστρώθηκε σε τρυβλία (0,5 ml καλλιέργειας / τρυβλίο), τα οποία επώαστηκαν για 16 ώρες στους 37° C.

B.10. Φαινοτυπική ανάλυση

Τα αυγά συγχρονίστηκαν, με εναπόθεση αυγών για διάστημα 2-3 ωρών, σε τρυβλία NGM με επαρκή τροφή και αφέθηκαν να εκκολαφθούν στους 20°C. Καταμετρήθηκε ο αριθμός των απογόνων σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο μετά από 72 ώρες και υπολογίστηκε το ποσοστό κατανομής του πληθυσμού σε όλα τα στελέχη. Ο συνολικός αριθμός των απογόνων καθορίστηκε στους 20°C, συλλέγοντας μία μοναδική προνύμφη L4 σε τρυβλία OP50 και μεταφέροντάς τη καθημερινά σε φρέσκα τρυβλία NGM σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήθηκε ο αριθμός απογόνων κάθε σκουληκιού σε κάθε πιάτο, μετά την εκκόλαψη. Για την εξέταση της κινητικότητας, τα ενήλικα άτομα 1 ημέρας μεταφέρθηκαν σε φρεσκοπαρασκευασμένες τρυβλία NGM με OP50, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήθηκαν οι πλήρεις στροφές του σώματος (κάθε φορά που το τμήμα του σκουληκιού ακριβώς πίσω από το φάρυγγα έφτανε σε μέγιστη στροφή προς την αντίθετη κατεύθυνση από την στροφή που μετρήθηκε τελευταία) για κάθε άτομο για 20 δευτερόλεπτα. Παρομοίως, τα ενήλικα 1 ημέρας τοποθετήθηκαν σε πλάκα χωρίς βακτήρια για να συρθούν ελεύθερα για 30 s και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος M9, όπου εκτιμήθηκε η συχνότητα των «τιναγμάτων» για 30 δευτερόλεπτα, κάτω από ένα στερεοσκόπιο. Οι κάμψεις του σώματος και η συχνότητα του τινάγματος σχεδιάστηκαν για κάθε σκουλήκι ανά στέλεχος για 1 λεπτό. Για τις δοκιμασίες αποφυγής τροφής, περίπου 100 αυγά από κάθε στέλεχος μεταφέρθηκαν στο κέντρο τριβλύων με μικρότερη ποσότητα κυκλικής καλλιέργειας OP50 και επωάστηκαν στους 20°C για 48-72 ώρες. Το ποσοστό των σκουληκιών που "ξέφυγαν" από τον χλοοτάπητα βαθμολογήθηκε για κάθε πλάκα ($N_{\text{off}}/N_{\text{total}} \times 100$).

B.11. Δοκιμασία προσδιορισμού διάρκειας ζωής

Για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής, διαμοιράστηκαν τουλάχιστον 150-200 άτομα τέταρτου προνυμφικού σταδίου (L4) σε τρυβλία NGM, που είχαν επιστρωθεί προηγουμένως με βακτηριακή καλλιέργεια OP50 ή HT115 στην περίπτωση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi σίτισης, στους 20°C ή 25°C. Κάθε συνθήκη περιείχε 3 τρυβλία με 50 άτομα το καθένα. Τα τρυβλία είχαν επιστρωθεί προηγουμένως με βακτηριακή καλλιέργεια και επωάστηκαν στην επιθυμητή θερμοκρασία. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε FUDR (5 φλουορο-δεοξυ-ουριδίνη) τα τρυβλία εκτέθηκαν σε UV ακτινοβολία προκειμένου να νεκρωθούν τα βακτήρια. Το FUDR είναι ένα ανάλογο της θυμιδίνης, που σταματάει την κυτταρική διαίρεση. Επομένως, σταματάει τη γαμετογένεση και την εμβρυογένεση και δεν προκύπτουν νέοι απόγονοι κατά την διάρκεια του πειράματος. Η χορήγηση του έγινε στο στάδιο L4. Σε κάθε πείραμα οι νηματώδεις αναπτύχθηκαν σε ιδανικές συνθήκες αφθονίας θρεπτικού υλικού και αποφυγής υπερπληθυσμού ώστε να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Η ημέρα τοποθέτησης των L4 σκουληκιών θεωρήθηκε ως ημέρα 0 και ο πληθυσμός ελεγχόταν καθημερινά για καταμέτρηση και καταγραφή θανάτων. Νεκρά θεωρήθηκαν τα άτομα που δεν ανταποκρίνονταν στο άγγιγμα. Χαμένα ή ξεραμένα άτομα που απομακρύνθηκαν από το πείραμα δεν θεωρήθηκαν νεκρά και συνυπολογίστηκαν διαφορετικά στα αποτελέσματα, ως censored. Πραγματοποιήθηκαν μεταφορές των ατόμων ανά 2-3 μέρες σε νέα τρυβλία NGM τις πρώτες 10 ημέρες για αποφυγή πείνας και κατανάλωση μόνο φρέσκου βακτηριακού θρεπτικού υλικού αλλά και για αποφυγή οποιουδήποτε άλλου στρες. Στην συνέχεια, λόγω μείωσης του πληθυσμού οι μεταφορές γίνονταν ανά 4-6 μέρες. Ως μέση διάρκεια ζωής θεωρείται το διάστημα μέχρι τη μέρα που έχει προκύψει το 50% των θανάτων του συνολικού πληθυσμού. Ως μέγιστη διάρκεια ζωής ορίζεται ο μέσος όρος των ημερών κατά τις οποίες πεθαίνει το τελευταίο 10% του εκάστοτε πληθυσμού. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (log-rank test) και η απεικόνιση των καμπυλών (καμπύλες επιβίωσης) πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism (version 8.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

B.12. Δοκιμασίες επιβίωσης σε στρες

Οι δοκιμασίες θερμικού στρες πραγματοποιήθηκαν συλλέγοντας συγχρονισμένους πληθυσμούς περίπου 100 ενήλικων σκουληκιών από τους 20°C στους 35°C για τις υποδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Για τα πειράματα RNAi, τα σκουλήκια αναπτύχθηκαν σε τρυβλία RNAi από αυγά πριν μετατοπιστούν στους 35°C ως ενήλικα άτομα 1 ημέρας. Η επιβίωση βαθμολογήθηκε μετά από 16 ώρες αποκατάστασης στους 20°C. Για τη δοκιμασία οσμωτικού στρες, τα ενήλικα άτομα 1 ημέρας τοποθετήθηκαν σε πλάκες που περιείχαν 500 mM NaCl για 24 ώρες. Για το οξειδωτικό στρες με paraquat (Sigma-Aldrich) ή αντιμυκίνη A (Sigma-Aldrich) κατάλληλα συγχρονισμένα σκουλήκια κάθε στελέχους αναπτύχθηκαν παρουσία 40 μM FUdR μέχρι τα τέλη του σταδίου L4. Την επόμενη ημέρα, τα ενήλικα άτομα 1 ημέρας τοποθετήθηκαν σε φρέσκα τρυβλία με βακτήρια που είχαν θανατωθεί με υπεριώδη ακτινοβολία και περιείχαν το οξειδωτικό, χωρίς FUdR. Η επιβίωση παρακολουθήθηκε μετά από 48 ώρες σε πλάκες με 30 mM paraquat ή μετά από 24 ώρες σε τρυβλία με 40 μM αντιμυκίνη A. Οι δοκιμασίες στρες με H₂O₂ πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα άτομα 1 ημέρας, τα οποία ξεπλύθηκαν από τα τρυβλία OP50, σε σωληνάρια των 1,5 ml που περιείχαν 10 mM H₂O₂ (από διάλυμα stock 30% w/w σε H₂O, Sigma-Aldrich) σε συνολικό όγκο 1 ml M9. Τα σωληνάρια επωάστηκαν για 30 λεπτά σε περιστρεφόμενο τροχό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα σκουλήκια σε ίζημα μεταφέρθηκαν σε φρέσκα τρυβλία NGM με OP50 και αφήθηκαν για ανάκαμψη στους 20°C για 30 λεπτά πριν μετρηθεί η επιβίωση. Για τη δοκιμή επιβίωσης στο στρες tBHP, ενήλικα σκουλήκια 1 ή 2 ημερών του αναφερόμενου στελέχους τοποθετήθηκαν σε φρέσκα τρυβλία με tBHP (σύμφωνα με τους (Ewald et al., 2017) που περιείχαν 10 mM tBHP (από διάλυμα αποθέματος 70% σε νερό, Sigma-Aldrich), χωρίς βακτήρια. Τα σκουλήκια επανατοποθετούνταν συνεχώς στο κέντρο της πλάκας για τις πρώτες δύο ώρες, καθώς προσπαθούσαν να "ξεφύγουν" από την πλάκα και να αποφύγουν το tBHP, και η επιβίωση βαθμολογούνταν κάθε ώρα. Τα ζώα που εξερράγησαν ή υπέστησαν βλάβη αφαιρέθηκαν από τη στατιστική επεξεργασία. Για τις δοκιμασίες επιβίωσης σε στρες με sodium arsenite και rotenone, ενήλικα σκουλήκια 1 ημέρας του αναφερόμενου στελέχους τοποθετήθηκαν σε τρυβλία NGM με βακτήρια OP50 που είχαν σκοτωθεί με υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια προστέθηκαν και 7,5 mM sodium arsenite (Acros Organics) ή 10 μM rotenone (Sigma-Aldrich) και προσδιορίστηκε μετά από 24 ώρες το ποσοστό των σκουληκιών που επέζησαν. Για να εξεταστεί η τοξικότητα του sodium azide, τα ενήλικα άτομα 1 ημέρας συλλέχθηκαν σε τρυβλία NGM που περιείχαν 1,5 mM sodium azide (Merck), όπου παρέμειναν αναισθητοποιημένα για 24 h. Ο αριθμός των επιζώντων σκουληκιών μετρήθηκε μετά από 20 ώρες αποκατάστασης στους 20°C. Για τα πειράματα RNAi, τα συγχρονισμένα σκουλήκια αναπτύχθηκαν για μία γενεά σε τρυβλία RNAi πριν από τη συλλογή τους ως ενήλικα 1 ημέρας σε νέες τρυβλία για κάθε δοκιμή. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και κάθε βιολογική επανάληψη περιελάμβανε τρία τρυβλία με 30-40 σκουλήκια ανά συνθήκη και γονότυπο. Το ποσοστό επιβίωσης για κάθε επανάληψη απεικονίστηκε σε διάγραμμα και χρησιμοποιήθηκε μη συζευγμένο *t-test* για την αξιολόγηση της σημαντικότητας. Η ανθεκτικότητα έναντι του βακτηριακού παθογόνου *P. aeruginosa* ελέγχθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας αργής θανάτωσης (slow killing) παθογόνου, η οποία διενεργήθηκε από την SunyBiotech (www.sunybiotech.com). Εν συντομία, ηλικιακά συγχρονισμένα σκουλήκια του υποδεικνυόμενου γονότυπου αναπτύχθηκαν στους 20°C, σε πλάκες NGM που είχαν σπαρθεί με βακτήρια OP50. Περίπου 80 από τα συγχρονισμένα νεαρά ενήλικα άτομα, από κάθε στέλεχος, μεταφέρθηκαν σε φρέσκες πλάκες που περιείχαν FUdR, οι οποίες είχαν μολυνθεί με το στέλεχος *P. aeruginosa* PA14. Η βιωσιμότητα αξιολογούνταν καθημερινά και οι τιμές *p* προσδιορίζονταν με τη χρήση της δοκιμασίας log-rank (Mantel-Cox).

B.13. Μικροσκοπική ανάλυση

Συγχρονισμένα αυγά από διαγονιδιακά σκουλήκια που εξέφραζαν τον αναφερόμενο μάρτυρα φθορισμού αναπτύχθηκαν σε τρυβλία NGM OP50 ή RNAi στους 20°C. Για τα πειράματα N-ακετυλοκουστεΐνης (NAC) και μιτοκινόλης (MitoQ), οι προνύμφες L4 μεταφέρθηκαν σε τρυβλία OP50 με βακτήρια θανατωμένα με υπεριώδη ακτινοβολία και πριν τη χορήγηση 10 mM NAC (Sigma-Aldrich) ή 7,5 μM MitoQ (Cayman), αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τον αντίστοιχο διαλύτη σε τρυβλία ελέγχου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η μικροσκοπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ενήλικα 1 ημέρας, λαμβάνοντας υπόψη τη μικρή καθυστέρηση ανάπτυξης στα μεταλλάγματα *lonp-1*. Τα σκουλήκια ακινητοποιήθηκαν με λεβαμιζόλη (Sigma-Aldrich) (40mM διαλυμένη σε M9) και τοποθετήθηκαν σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα, επιστρωμένη με ένα λεπτό στρώμα πηκτώματος αгарόζης 2%. Οι εικόνες λήφθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιώντας ένα ορθό μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMRA εξοπλισμένο με κάμερα Hamamatsu ORCA-flash 4.0 και φακούς 10x ή 40x. Όλα τα στελέχη εξετάστηκαν παράλληλα και οι ρυθμίσεις του μικροσκοπίου παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια κάθε πειράματος. Η δραστηριότητα του μάρτυρα φθορισμού αξιολογήθηκε μέσω της μέτρησης της μέσης έντασης των pixel με το ImageJ 1.52p (Fiji), στην εικόνα ολόκληρου του σκουληκιού που λήφθηκε. Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με ασύζευκτη ανάλυση t-test χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism version 8.01 για Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Σε όλες τις περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50 σκουλήκια ανά στέλεχος και συνθήκη σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις και απεικονίστηκε ο μέσος όρος των υπολογισμένων τιμών. Οι εικόνες που λήφθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία, έγιναν με τη χρήση του συστήματος συνεστιακής απεικόνισης σάρωσης με λέιζερ Leica TCS SP5 II σε όρθιο μικροσκόπιο DM6000 CFS και αντικειμενικό φακό 10x ή 40x ή 63x. Για τον πυρηνικό εντοπισμό του DAF-16, περίπου 30 διαγονιδιακά ζώα κάθε γονότυπου που εξέφραζαν *muls71[daf-16ap::gfp::daf-16a]* σταθεροποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη σε 1x PBS για 10 λεπτά και πλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα M9 πριν από την οπτικοποίηση, για να αποφευχθεί η μετατόπιση του DAF-16 ως αποτέλεσμα του χειρισμού. Οι θετικοί πυρήνες GFP::DAF-16α καταμετρήθηκαν χειροκίνητα χρησιμοποιώντας προβολές μέγιστης έντασης των z-stacks που δημιουργήθηκαν στο ImageJ 1.52p (Fiji). Οι εικονιζόμενες εικόνες είναι μεμονωμένες οπτικές τομές.

B.13.1. Μέτρηση επιπέδων ROS

Τα ενδογενή επίπεδα H₂O₂ μετρήθηκαν σε διαγονιδιακά σκουλήκια *jrls1[rpl-17p::HyPer]* που εκφράζουν έναν ανιχνευτή HyPer, σε wt ή μεταλλαγμένο υπόβαθρο *lonp-1(ko)*. Περίπου 50 σκουλήκια των υποδεικνυόμενων γονότυπων την 1η ημέρα ενηλικίωσης τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρησιμοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στους Back et al. (Back et al., 2012). Η οξειδωμένη και η ανηγμένη μορφή του HyPer (κυκλικά μεταλλαγμένη YFP) των μεμονωμένων σκουληκιών διεγείρονται στα 490 και 405 nm, αντίστοιχα, με μία μόνο κορυφή εκπομπής στα 535 nm. Τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου μετρήθηκαν ως ο λόγος της έντασης του οξειδωμένου προς το ανηγμένου HyPer. Για τη χρώση με DHE, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε προσαρμόστηκε από τους Aspernig et al. (Aspernig et al., 2019). Εν συντομία, περίπου 100 ενήλικα σκουλήκια 1 ημέρας από κάθε γενετικό υπόβαθρο συλλέχθηκαν σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης των 1,5 ml και πλύθηκαν 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα M9. Στη συνέχεια, έγινε χρώση με 10 μM DHE (Cayman, σε M9 συν 0,01% PEG) για 2 ώρες σε πλατφόρμα ανακίνησης σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε σωληνάριο ήταν τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η οξείδωση της χρωστικής. Μετά τη χρώση, τα σκουλήκια πλύθηκαν σε M9 και τοποθετήθηκαν σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα, επιστρωμένη με ένα λεπτό στρώμα πηκτώματος αгарόζης 2% με λεβαμιζόλη για άμεση απεικόνιση (η ένταση του φθορισμού που προέρχεται από το DHE είναι σταθερή κατά τα πρώτα 30 λεπτά). Οι χωρίς χρώση σκώληκες απεικονίστηκαν για να εκτιμηθεί το

σήμα αυτοφθορισμού που πρέπει να αφαιρεθεί. Η πυκνότητα φθορισμού μετρήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

B.13.2. Χρώση με MitoTracker

Για τη χρώση με MitoTracker Green, συγχρονισμένα ενήλικα σκουλήκια 1 ημέρας πλύθηκαν σε 100 μl M9 με νεκρή υγρή βακτηριακή καλλιέργεια OP50. Στη συνέχεια, προστέθηκε MitoTracker Green (Invitrogen) σε τελική συγκέντρωση 10 μM και τα σκουλήκια επώαστηκαν στους 20° C κατά τη διάρκεια της νύχτας (ο σωλήνας τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η οξείδωση της χρωστικής). Την επόμενη ημέρα τα σκουλήκια πλύθηκαν με M9 και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία NGM με OP50 για 1 ώρα για να απαλλαγούν από την περίσσεια της χρωστικής. Για τη χρώση με Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen) εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος με επώαση 1 ώρας σε τελική συγκέντρωση 4,70 μM διαλύματος και ακολούθησαν 2-3 πλύσεις με M9 για αποχρωματισμό. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με μεγέθυνση 40x ή 63x σε μυϊκές περιοχές χρησιμοποιώντας λεβαμιζόλη ως αναισθητικό παράγοντα.

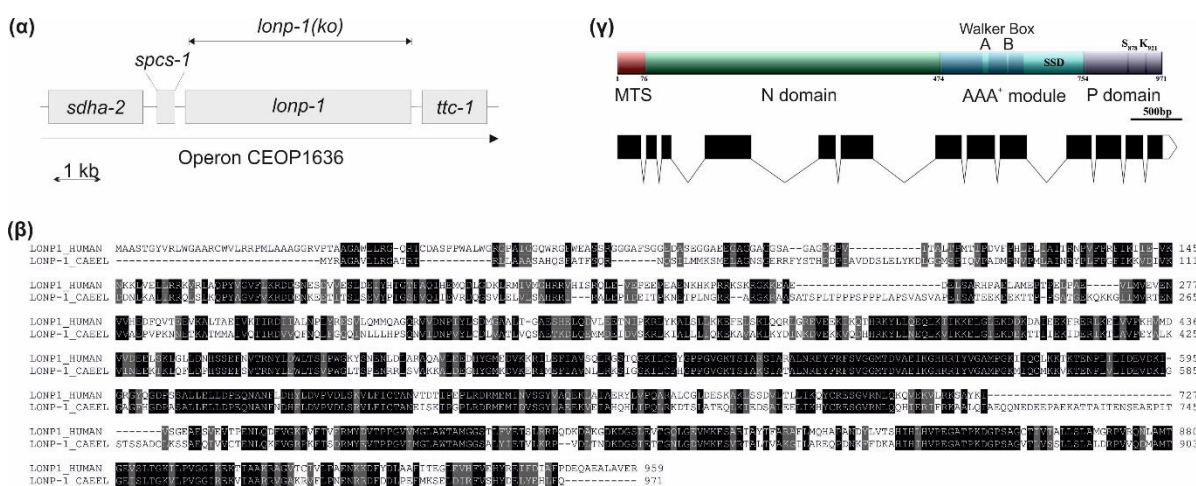
B.14. Στατιστική ανάλυση

Τα γραφήματα και η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism (version 8.0.1 για Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σύγκριση κάθε δείγματος με το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου στην ίδια κατάσταση και η σημαντικότητα (*p-value*) προσδιορίστηκε με το συζευγμένο ή μη *t-test*. Σε όλα τα γραφήματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων ($N \geq 3$) και οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. Για τις καμπύλες επιβίωσης *Kaplan-Meier*, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση *log-rank Mantel-Cox*. Η στατιστική σημαντικότητα ορίζεται ως εξής: **** $p < 0.0001$; *** $p = 0.0001 - 0.001$; ** $p = 0.001 - 0.01$; * $p = 0.01 - 0.05$; ns υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές με $p \text{ value} \geq 0.05$.

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1. Χαρακτηρισμός της πρωτεάσης LON και του στελέχους απώλειας της λειτουργίας της στο *C. elegans*

Το ομόλογο της ανθρώπινης μιτοχondριακής πρωτεάσης LONP1 κωδικοποιείται από ένα μοναδικό γονίδιο στο νηματώδη σκώληκα, το *lonp-1* (*C34B2.6*), που μαζί με τα γονίδια *sdha-2* (*C34B2.7*), *spcs-1* (*C34B2.10*) και *ttc-1* (*C34B2.5*), είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο (CEOP1636) (<https://www.wormbase.org>) (Εικ. Γ.1-1α). Η πρωτεΐνη LONP-1 στο νηματώδη αποτελείται από 971 αμινοξέα, έχει 47.6% ποσοστό ταύτισης των αμινοξικών αλληλουχιών και 62.1% ομοιότητα (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) με την ανθρώπινη ισομορφή 1 της LONP1 (Εικ. Γ.1-1β). Φέρει τη μιτοχondριακή αλληλουχία στόχευσης (Mitochondrial Targeting Signal, MTS) στο αμινοτελικό άκρο (N-άκρο) και όλες τις λειτουργικές περιοχές των πρωτεασών LON (Εικ. Γ.1-1γ).

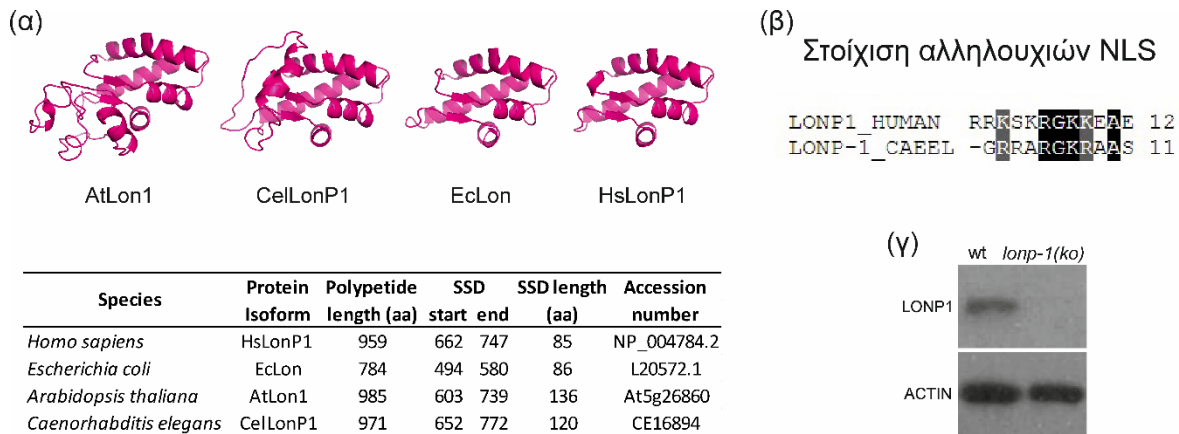


Εικόνα Γ.1-1. Η μιτοχondριακή πρωτεάση LONP1 είναι συντηρημένη σε άνθρωπο και σκουλήκι. (α) Σχηματική αναπαράσταση του οπερονίου (CEOP1636). **(β)** Στοιχισμός της LONP1 σε άνθρωπο (UniProtKB-P36776) and *C. elegans* (UniProtKB-O44952) με το πρόγραμμα EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) και χρωματική στοιχισμός των συντηρημένων αλληλουχιών (http://www.bioinformatics.org/sms2/color_align_cons.html). Τα πλήρως συντηρημένα κατάλοιπα απεικονίζονται με μαύρα κουτιά. **(γ)** Οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης LONP-1. Η μιτοχondριακή αλληλουχία στόχευσης (MTS) κατευθύνει τη μετατόπιση της πρόδρομης πρωτεΐνης διαμέσου των μιτοχondριακών μεμβρανών, η περιοχή N εμπλέκεται στην αναγνώριση του υποστρώματος, μαζί με την κεντρική περιοχή AAA⁺, η οποία περιέχει τα μοτίβα Walker Box A και B για την υδρόλυση του ATP και την περιοχή διαφοροποίησης αισθητήρα και υποστρώματος (SSD). Η C-τελική πρωτεολυτική περιοχή (P domain) περιέχει τα καταλυτικά κατάλοιπα της σερίνης (S) και της λυσίνης (K). Το γράφημα που δείχνει τη γονιδιακή οργάνωση του LONP-1, δημιουργήθηκε με τη χρήση του Exon-Intron Graphic Maker (<http://wormweb.org/exonintron>). Τα μαύρα κουτιά αντιπροσωπεύουν εξόνια που συνδέονται με γραμμές που αντιστοιχούν σε ιντρόνια.

Η κεντρική της περιοχή με το μοτίβο ATPάσης, καθώς και η επικράτεια διαφοροποίησης αισθητήρα και υποστρώματος (Sensor and Substrate Discrimination domain, SSD), διαφοροποιούνται μεταξύ των ομολόγων LON διαφορετικών ειδών (Tsitsekian et al., 2019), ωστόσο η μοριακή μοντελοποίηση της πρωτεΐνης LON σε άνθρωπο, βακτήριο, φυτό και σκουλήκι δείχνει παρόμοια δομή, προτείνοντας συντηρημένες λειτουργίες (Εικ. Γ.1-2α). Πρόσφατη μελέτη (Gibellini et al., 2022) έδειξε πως η ανθρώπινη πρωτεΐνη LONP-1 φέρει μια αλληλουχία στόχευσης στον πυρήνα (Nuclear localization signal, NLS) (RRKSKRGKKEAE). Ο νηματώδης φέρει μία προβλεπόμενη αλληλουχία NLS

(NGRRARGKRAAS) (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>), η οποία έχει 33.33% ποσοστό ταύτισης των αμινοξικών αλληλουχιών και 50% ομοιότητα με την ανθρώπινη (Εικ. Γ.1-2β).

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος *lonp-1(ko)*, όπου το γονίδιο *lonp-1* έχει εξαλειφθεί με τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9. Αυτό δημιουργήθηκε στο εργαστήριό μας (σε συνεργασία με την Invermis Limited, London, UK) για να διερευνηθεί η επίδραση της ανεπάρκειας της LONP-1 στη φυσιολογία και διάρκεια ζωής των σκουληκιών. Η απουσία της πρωτεΐνης στο στέλεχος *lonp-1* επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο Western blot χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την ανθρώπινη LONP-1 (Εικ. Γ.1-2γ).



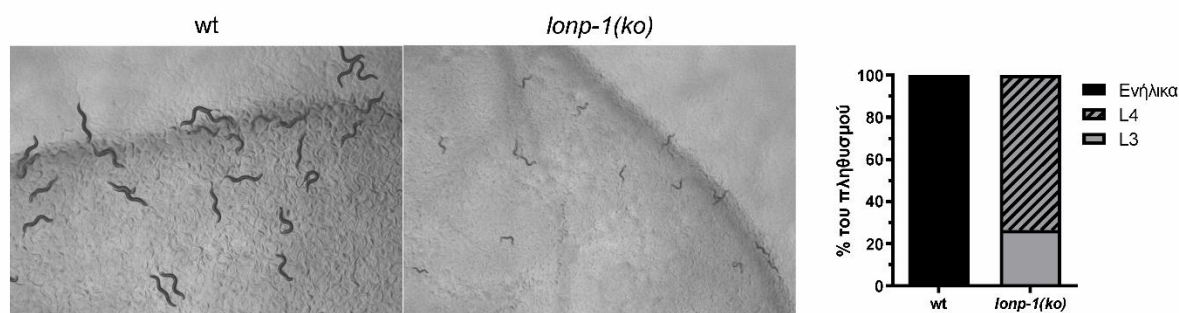
Εικόνα Γ.1-2. Η LONP-1 στο *C.elegans* έχει εξελικτικά συντηρημένες περιοχές. (α) Απεικονίζεται μοριακή μοντελοποίηση της περιοχής SSD σε *Arabidopsis* (AtLon1), σκουλήκι (CelLonP1), βακτήριο (EcLon), και άνθρωπο (HsLonP1). (β) Στοιχίση του ανθρώπινου σινιάλου πυρηνικού εντοπισμού (NLS) της LONP1 με την προβλεπόμενη NLS της LONP-1 στο σκουλήκι. (γ) Η ανάλυση Western blot με ανθρώπινο αντίσωμα για τη LONP-1 και β-ακτίνη ως control, δείχνει την απουσία της πρωτεΐνης στο στέλεχος *lonp-1*.

Γ.1.1. Το στέλεχος *lonp-1* χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη ανάπτυξη, υπογονιμότητα και μειωμένη διάρκεια ζωής

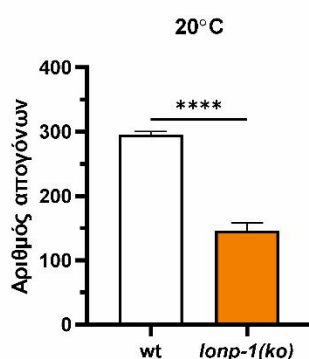
Η ομόζυγη διαγραφή της LONP1 στη δροσόφιλα και τα θηλαστικά οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα (Pareek & Pallanck, 2018; Quiros et al., 2014), ωστόσο από τη μελέτη μας φαίνεται ότι η απώλειά της στο *C. elegans* οδηγεί σε βιώσιμα και αναπαραγωγικά στελέχη χωρίς σημαντικούς περιορισμούς στο χειρισμό τους. Τα μεταλλαγμένα άτομα *lonp-1* χαρακτηρίζονται από καθυστερημένο και ασυγχρόνιστο ρυθμό ανάπτυξης συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (N2) άτομα. Αυτό φαίνεται στο διάγραμμα απεικόνισης της ανάπτυξης (Εικ. Γ.1-3α), όπου σε 72 ώρες από την ώρα εναπόθεσης των αυγών στα πιάτα καλλιέργειας, όλα τα άτομα N2 είναι ενήλικα αναπαραγωγικής ηλικίας ενώ τα *lonp-1(ko)* βρίσκονται ακόμα στο 3^ο και 4^ο προνυμφικό στάδιο (L3, L4). Τα μεταλλάγματα *lonp-1* φτάνουν σε ενήλικο στάδιο και είναι αναπαραγωγικά 24 ώρες αργότερα από τα άτομα N2, και έχουν μειωμένο συνολικό αριθμό απογόνων (Εικ. Γ.1-3β). Πολλά στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που οδηγούν σε διαταραγμένη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, παρουσιάζουν επίσης καθυστερημένη ανάπτυξη και υπογεννητικότητα, ενώ συνήθως συνοδεύονται από επέκταση του προσδόκιμου ζωής τους συγκριτικά με τα άτομα N2 (Dillin et al., 2002; Lee et al., 2003; Rea et al., 2007). Το στέλεχος *lonp-1* αντιθέτως, παρουσιάζει μειωμένη διάρκεια ζωής σε 20° C και 25° C σε τροφή OP50 *E. coli*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (Εικ. Γ.1-3γ & Πίνακας Γ.2-1).

(α)

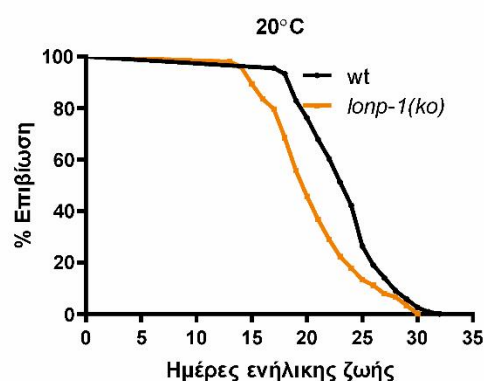
72 ώρες από την εναπόθεση των αυγών, 20°C



(β)



(γ)

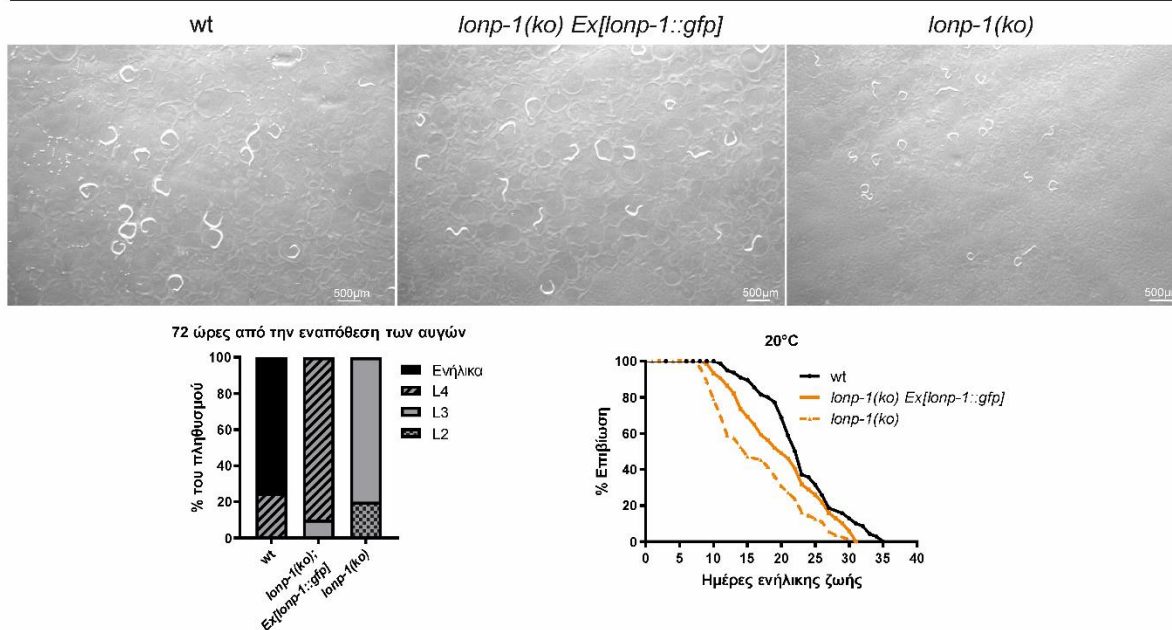


Εικόνα Γ.1-3. Η έλλειψη της LONP-1 προκαλεί καθυστερημένη ανάπτυξη, υπογεννητικότητα και μειωμένη διάρκεια ζωής. (α) Ο ρυθμός ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων *lonp-1* 72 ώρες μετά την εναπόθεση αυγών στους 20° C σε σύγκριση με τα άγριου τύπου N2 (wt). Σε αυτό το χρονικό σημείο, τα σκουλήκια wt έχουν φτάσει στο στάδιο των ενηλίκων, ενώ τα μεταλλάγματα *lonp-1* βρίσκονται στο στάδιο των προνυμφών 3 ή 4 (L3, L4). (β) Δοκιμές γονιμότητας των μεταλλαγμάτων *lonp-1* που δείχνουν τον μέσο αριθμό βιώσιμων απογόνων ανά άτομο σε όλες τις βιολογικές επαναλήψεις. Για την αξιολόγηση της σημαντικότητας (*p*-value) χρησιμοποιήθηκε το μη συζευγμένο *t*-test. (γ) Δοκιμασία διάρκειας ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1* και wt στους 20° C. Η διάρκεια ζωής στους 25° C, οι επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των δοκιμασιών διάρκειας ζωής παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.2-1.

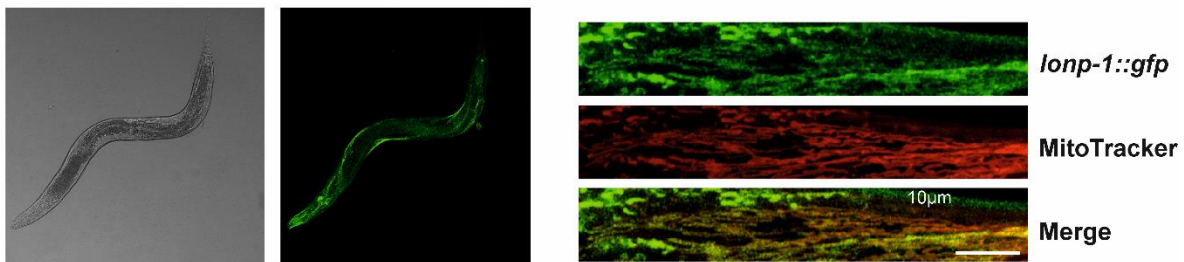
Επιβεβαιώθηκε πως αυτοί οι φαινότυποι οφείλονται στην έλλειψη του γονιδίου *lonp-1*, με δοκιμασία διάσωσης (rescue) των φαινοτύπων. Δημιουργήθηκε στέλεχος *lonp-1* που φέρει διαγονίδιο με την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *lonp-1* σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP, Green Fluorescence Protein), υπό τον έλεγχο μιας περιοχής εσωτερικά στο οπερόνιο και αναρροϊκά του γονιδίου *lonp-1* (*lonp-1::gfp*). Η έλλειψη στοιχείων που προηγούνται του υποκινητή στο 5' άκρο του οπερονίου και ιντρονίων από το διαγονίδιο μπορεί να επηρεάσουν την έκφρασή του. Ωστόσο, τα διαγονιδιακά *lonp-1* άτομα σώζουν μερικώς την ανάπτυξη και διάρκεια ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1*, υποδεικνύοντας ότι είναι εν μέρει λειτουργικά (Εικ. Γ.1-4α). Για να μελετηθεί η υποκυτταρική κατανομή του διαγονιδίου *lonp-1::gfp* στο μιτοχόνδριο, έγινε ταυτόχρονη χρώση των μιτοχονδρίων των διαγονιδιακών ατόμων με τη χρωστική MitoTracker Red CMXRos που ενσωματώνεται στα ενεργά μιτοχόνδρια βάσει του δυναμικού της μεμβράνης τους. Η έκφραση του διαγονιδίου είναι ασθενής, αλλά χαρακτηριστική των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ενώ επιβεβαιώθηκε και ο συνεντοπισμός του με τα μιτοχόνδρια στα τοιχώματα των μυών του σώματος (Εικ. Γ.1-4β).

(α)

72 ώρες από την εναπόθεση των αυγών, 20°C



(β)

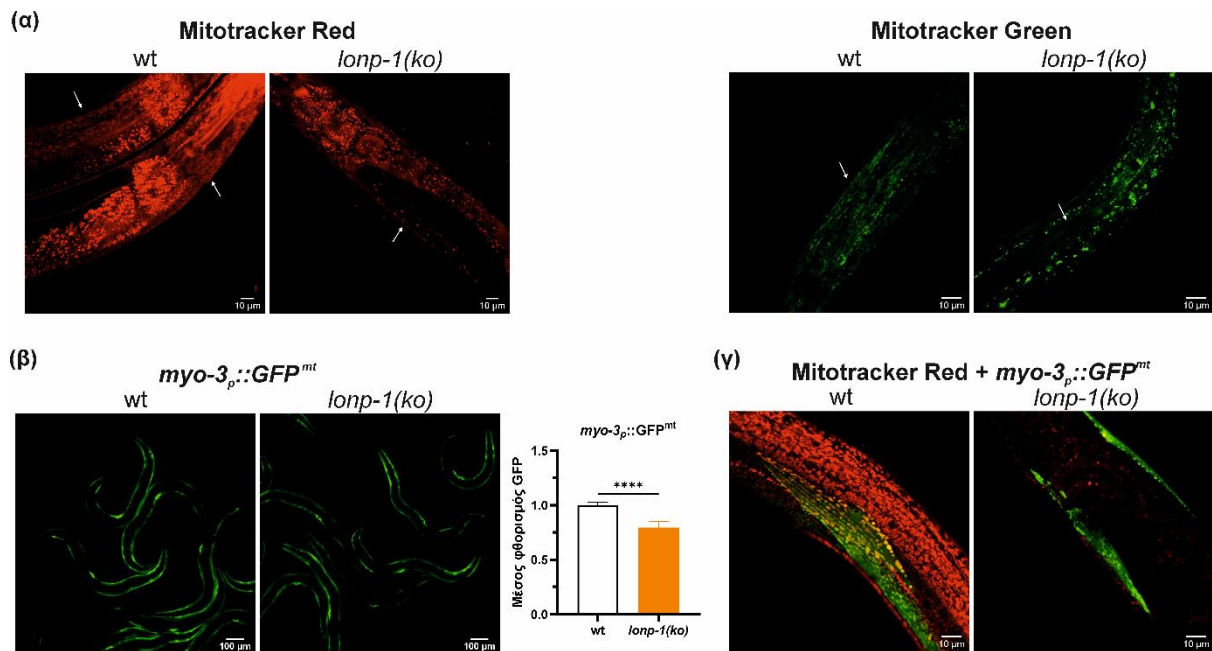
lomp-1(ko); Ex[lomp-1::gfp]

Εικόνα Γ.1-4. Το διαγονίδιο *lomp-1::gfp* σώζει μερικώς τους φαινοτύπους των μεταλλαγμάτων *lomp-1*. (α) Ο ρυθμός ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων διαγονιδικών ατόμων *lomp-1::gfp* σε υπόβαθρο *lomp-1* 72 ώρες μετά την εναπόθεση αυγών στους 20°C σε σύγκριση με τα άγριου τύπου N2 (wt) και *lomp-1*. Το μεταφραστικό διαγονίδιο *lomp-1::gfp*, η έκφραση του οποίου καθοδηγείται από έναν εσωτερικό υποκινητή μπροστά από το *lomp-1* στο οπερόνιο, σώζει εν μέρει την καθυστερημένη ανάπτυξη και μειωμένη διάρκεια ζωής στο στέλεχος *lomp-1(ko)* (υποδεικνύοντας πιθανή έλλειψη επαρκούς επιπέδου έκφρασης από αυτόν τον εσωτερικό υποκινητή ή τοξική επίδραση από την υπερέκφραση του διαγονιδίου). (β) Αντιπροσωπευτική εικόνα μικροσκοπίας των μεταλλαγμάτων *lomp-1* που εκφράζουν καθολικά ένα διαγονίδιο σύντηξης *lomp-1::gfp* αλλά χαμηλής έντασης. Στα δεξιά, εμφανίζεται ο συνεντοπισμός του σήματος GFP με το MitoTracker Red CMXRos σε ένα μυϊκό κύτταρο του σωματικού τοιχώματος. Οι εικόνες που απεικονίζονται είναι στοίβες Z τριών εστιακών επιπέδων που συλλέχθηκαν σε μικροσκόπιο confocal. Κλίμακα, 10 μm.

Γ.1.2. Το στέλεχος *lomp-1* εμφανίζει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και αυξημένη παραγωγή ROS

Η απώλεια της πρωτεάσης LONP-1 επηρεάζει αρνητικά την μιτοχονδριακή αναπνοή και μειώνει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε κύτταρα θηλαστικών (Bota et al., 2005; Ngo & Davies, 2007). Η αξιολόγηση του μιτοχονδριακού δικτύου σε μεταλλαγμένους νηματώδεις *lomp-1* έγινε με αναλύσεις του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω της χρωστικής Mitotracker Red CMXRos, και της μιτοχονδριακής μάζας, μέσω σήμανσης των μιτοχονδρίων με τη χρωστική Mitotracker Green. Η χρώση των μιτοχονδρίων των μεταλλαγμάτων *lomp-1* με Mitotracker Red CMXRos δείχνει μειωμένη ένταση συγκριτικά με τα άτομα N2, υποδεικνύοντας μειωμένο δυναμικό μεμβράνης (Εικ. Γ.1-5α). Η αξιολόγηση της μορφολογίας των μιτοχονδρίων με τη χρωστική Mitotracker Green, παρουσιάζει πως τα μιτοχόνδρια των ατόμων *lomp-1* έχουν ακανόνιστο μέγεθος

και σχήμα συγκριτικά με το φυσιολογικό φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου N2 (Εικ. Γ.1-5α). Ακόμη, η μιτοχονδριακή μάζα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* είναι μειωμένη συγκριτικά με των ατόμων N2 όπως φαίνεται από το μειωμένο φθορισμό διαγονιδιακών στελεχών που φέρουν μια μιτοχονδριακή GFP υπό τον έλεγχο του, ιστοειδικού για τους μύες υποκινητή, *myo-3* (*myo-3_p::GFP^{mt}*) (Εικ. Γ.1-5β). Τα διαγονιδιακά αυτό στέλεχος σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου εμφανίζει το φυσιολογικό δίκτυο μιτοχονδριακών σωληνίσκων, που εκτείνεται παράλληλα με τα μυοϊνίδια (Labrousse et al., 1999) και συνεντοπίζεται με τη Mitotracker Red, το οποίο όμως είναι διαταραγμένο σε υπόβαθρο *lonp-1* (Εικ. Γ.1-5γ).

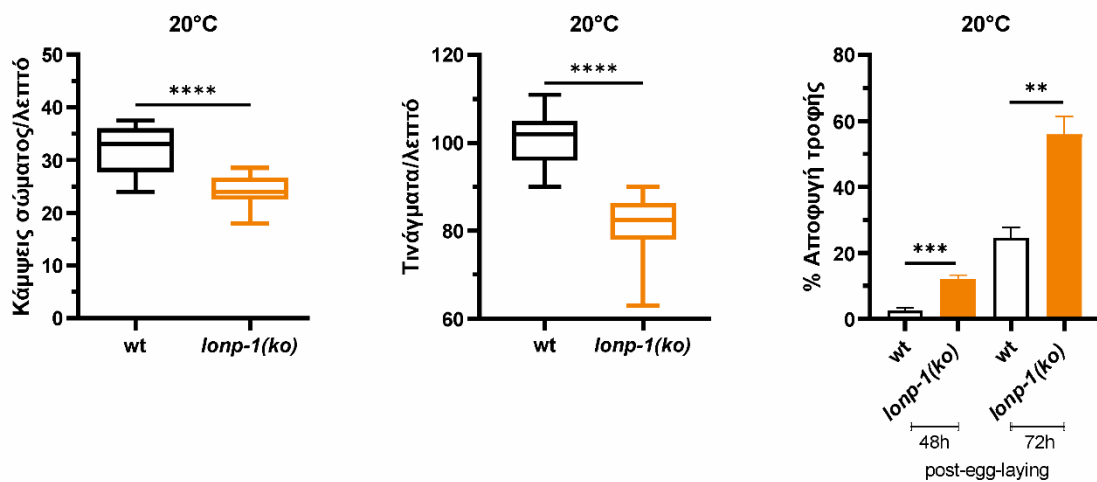


Εικόνα Γ.1-5. Τα *lonp-1* εμφανίζουν διαταραγμένη μορφολογία του μιτοχονδριακού δικτύου. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες confocal μικροσκοπίας από χρώση μιτοχονδρίων *C. elegans* με τη φθορίζουσα χρωστική Mitotracker Red CMXRos (αριστερά) και Mitotracker Green (δεξιά) σε ζώα N2 (wt) και *lonp-1(ko)*. Κλίμακα, 10 μ m. (β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας των διαγονιδιακών ζώων *myo-3_p::GFP^{mt}* που εκφράζουν GFP εντοπισμένη στα μιτοχόνδρια των μυών και ποσοτικοποίηση του φθορισμού τους, σε wt και μεταλλάγματα *lonp-1(ko)*. Για την αξιολόγηση της σημαντικότητας (*p*-value) χρησιμοποιήθηκε το μη συζευγμένο *t*-test. Κλίμακα, 100 μ m. (γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες confocal μικροσκοπίας του μάρτυρα *myo-3_p::GFP^{mt}* και ταυτόχρονη χρώση των μιτοχονδρίων με Mitotracker Red CMXRos. Κλίμακα, 10 μ m.

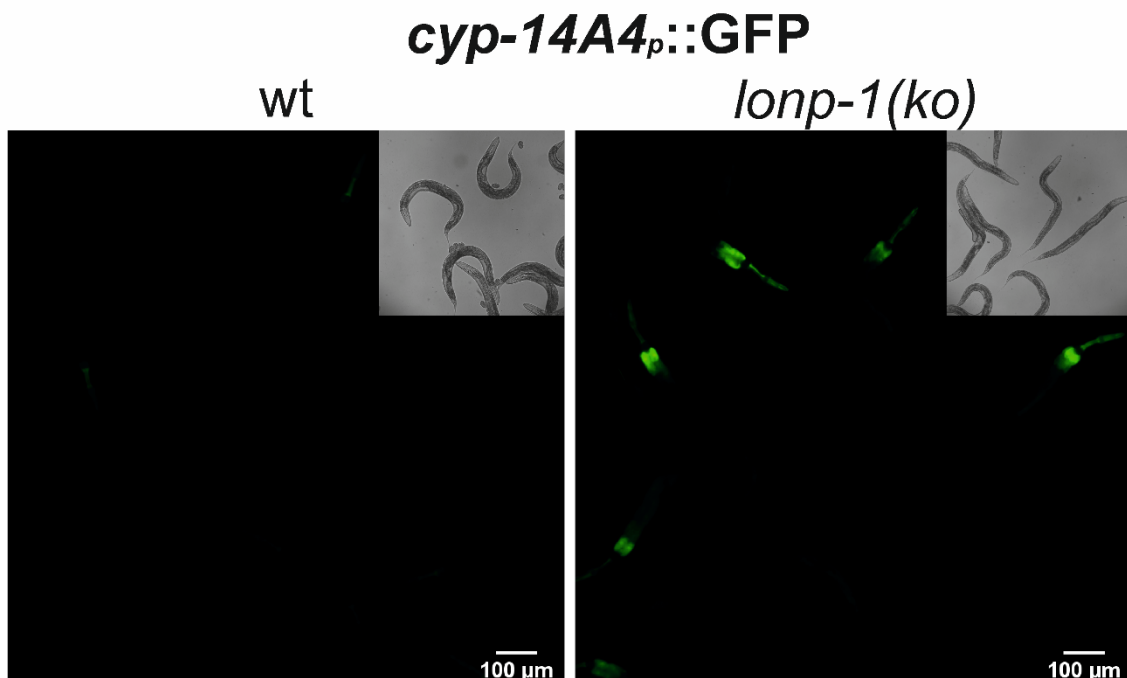
Η διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας έχει συνδεθεί με προβλήματα στη συμπεριφορά και κίνηση στο *C. elegans* (Byrne et al., 2019). Ο χαρακτηρισμός της κίνησης στο *C. elegans* γίνεται από την ταχύτητα που τα ζώα χαράσσουν μία ημιτονοειδή διαδρομή, καθώς κινούνται σε ένα τρυβλίο άγαρ ομοιόμορφα καλυμμένο με ένα στρώμα βακτηρίων OP50 *E. coli*, που καταμετρείται με κάμψεις σώματος (body bends) ανά λεπτό, αλλά και από το ρυθμό που ένα άτομο «τινάσσεται» (thrashing rate) ανά λεπτό σε μία σταγόνα υγρού διαλύματος M9. Η συμπεριφορά αποφυγής της τροφής μπορεί να μετρηθεί με το ποσοστό των ατόμων που απομακρύνονται από τη βακτηριακή χλόη, συγκεντρωμένη στο μέσο ενός πιάτου καλλιέργειας. Ο *C. elegans* αναπτύσσει επίκτητη συμπεριφορά αποφυγής της τροφής κατά την έκθεσή του σε παθογόνα βακτήρια αλλά και όταν υπάρχει μιτοχονδριακή βλάβη (Chiang et al., 2022; Melo & Runken, 2012). Σε συμφωνία με αυτό, τα άτομα *lonp-1* δείχνουν σημαντικά μειωμένες κάμψεις σώματος, ρυθμό «τινάγματος» και μεγαλύτερη αποφυγή τροφής συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (Εικ Γ.1-6α). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά άτομα που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ξενοβιοτικού, αντιοξειδωτικού γονιδίου αναφοράς *cyp-14A4*, που κωδικοποιεί για ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών του κυτοχρώματος P450. Το γονίδιο *cyp-14A4* επάγεται στα κύτταρα του

εντέρου του νηματώδη όταν υπάρχει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, συγκεκριμένα σε μιτοχονδριακά μεταλλάγματα, λόγω απενεργοποίησης γονιδίων ή ως απόκριση σε τοξίνες (Mao et al., 2019; Melo & Runkun, 2012). Η επαγωγή αντιοξειδωτικών γονιδίων και γονιδίων ανοσίας από μια γενετική μεταλλαγή στα μιτοχόνδρια, έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση πως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη φύση συμβαίνει πιο συχνά όταν το *C. elegans* έρχεται σε επαφή με τοξίνες ή παθογόνα βακτήρια, παρά από μεταλλαγές, και οπότε μία μιτοχονδριακή μεταλλαγή επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια επιτήρησης σχετιζόμενα με την έμφυτη ανοσία (Mao et al., 2019). Πράγματι, τα μεταλλάγματα *lonp-1* εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς *cyp-14A4_p::gfp* (Εικ. Γ.1-6β) ενισχύοντας την υπόθεση πως τα μεταλλαγμένα άτομα *lonp-1* βιώνουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

(α)



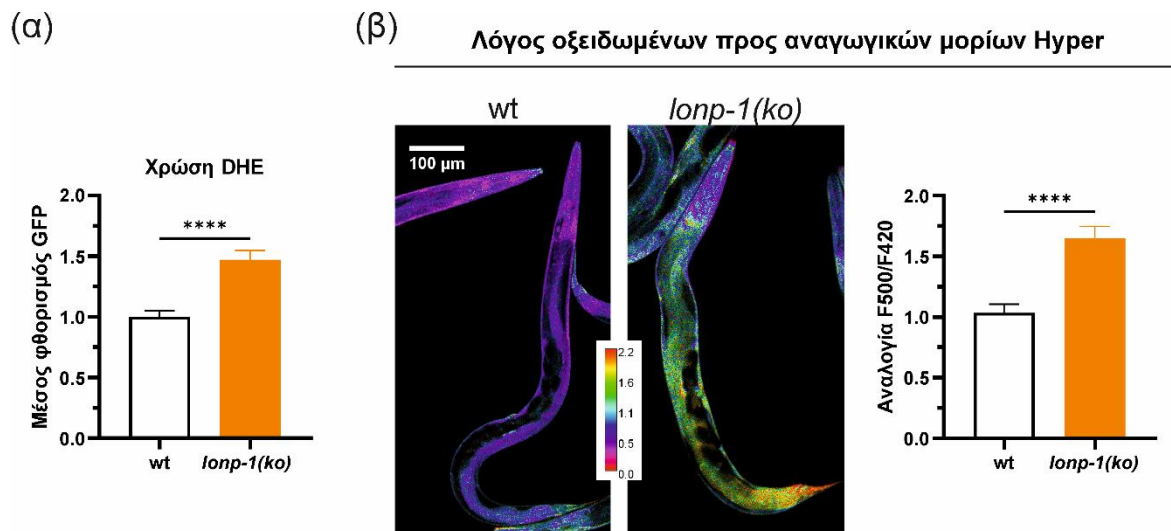
(β)



Εικόνα Γ.1-6. Τα *lonp-1* εμφανίζουν χαρακτηριστικούς φαινοτύπους μειωμένης μιτοχονδριακής λειτουργίας. (α) Εκτιμήθηκε η κινητικότητα ενηλίκων 1 ημέρας, με την ποσοτικοποίηση των κάμψεων του σώματος σε τρυβλία άγαρ και των τιναγμάτων του σώματος σε υγρό μέσο ανά λεπτό, και η αποφυγή βακτηρίων στις υποδεικνυόμενες χρονικές περιόδους, σε wt και μεταλλαγμένα σκουλήκια *lonp-1*. Το ποσοστό των σκουληκιών που "ξεφεύγουν" από τη βακτηριακή χλόη απεικονίζεται για κάθε τρυβλίο ως $N_{off}/N_{total} \times 100$. (β)

Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας διαγονιδιακών ζώων που εκφράζουν το διαγονίδιο *cyp-14A4p::gfp* που επάγεται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, σε *wt* και μεταλλάγματα *lonp-1(ko)*. Κλίμακα, 100 μm .

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνήθως προκαλείται από τη συσσώρευση κακών ή μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ή τη μειωμένη αποικοδόμησή τους, και συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Murphy, 2009) που συμβάλουν περαιτέρω στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Για τον έλεγχο της παραγωγής ROS στα *lonp-1* άτομα, αρχικά έγινε χρώση των *N2* και *lonp-1* ατόμων με τη φθορίζουσα χρωστική 2-υδροεθίδιο (dihydroethidium, DHE) που ανιχνεύει επιλεκτικά το υπεροξειδικό ανιόν (superoxide, O_2^-) και χρησιμοποιείται για απευθείας μέτρηση των επιπέδων κυτταροπλασματικών ROS σε ζωντανά κύτταρα (Y. W. Lee et al., 2010; Schaar et al., 2015). Τα μεταλλάγματα *lonp-1* έχουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα ιόντων υπεροξειδίου συγκριτικά με τα άτομα αγρίου τύπου *N2* (Εικ. Γ.1-7α). Για την περαιτέρω αξιολόγηση των επιπέδων ROS στα *N2* και *lonp-1* άτομα, χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *HyPer*, που ανιχνεύει τα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου (hydrogen peroxide, H_2O_2) *in vivo*, υπό τον έλεγχο ενός ευρέως επαγόμενου υποκινητή στο νηματώδη (Back et al., 2012). Τα μεταλλάγματα *lonp-1* εμφανίζουν αυξημένο λόγο οξειδωμένων προς αναγωγικών μορίων *HyPer* συγκριτικά με τα αγρίου τύπου *N2*, υποδεικνύοντας αυξημένα επίπεδα ενδογενών επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου στα μεταλλαγμένα άτομα (Εικ. Γ.1-7β).



Εικόνα Γ.1-7. Τα *lonp-1* εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ROS. (α) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού σε ζώα *wt* και *lonp-1(ko)* κατά τη χρώση με την ευαίσθητη στις ROS χρωστική DHE. (β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (*confocal*) και ποσοτικοποίηση του λόγου των οξειδωμένων προς αναγωγικών μορίων *HyPer* σε *wt* και *lonp-1(ko)* άτομα που εκφράζουν το διαγονίδιο *jrIs1[rpl-17p::HyPer]*. Κλίμακα, 100 μm . Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα 1 ημέρας και για την αξιολόγηση της σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το μη συζευγμένο *t*-test (*p*-value).

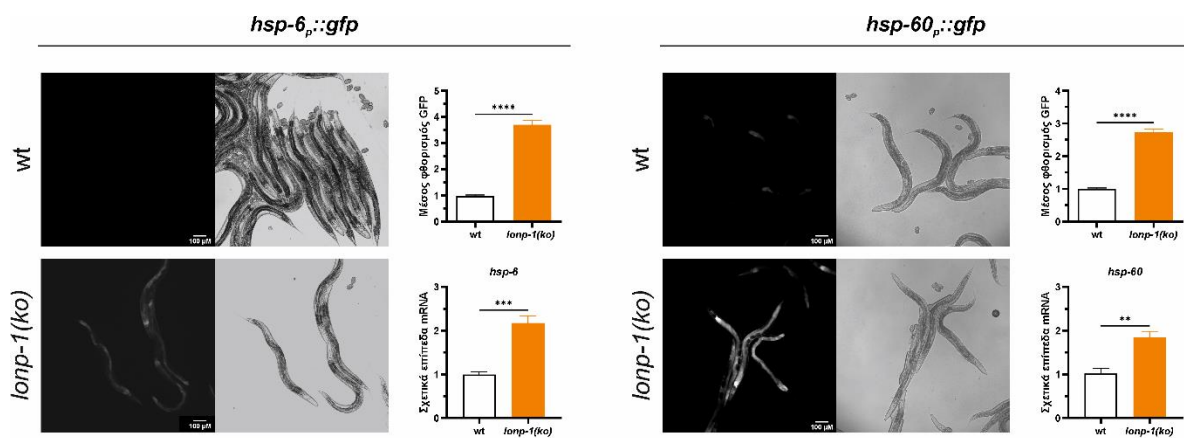
Γ.2. Μελέτη της ενεργοποίησης μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα μεταλλάγματα *lonp-1*

Υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες, οι ROS δρουν ως σηματοδοτικά μόρια για την επικοινωνία του μιτοχονδρίου με τον πυρήνα. Ο πυρήνας κωδικοποιεί για μιτοχονδριακές πρωτεάσες, μοριακές συνοδούς ή αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλουν στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών ή/και την αποικοδόμησή τους. Αυτό συμβαίνει μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών απόκρισης στο στρες που έχουν ως σκοπό την αποκατάσταση της λειτουργίας του μιτοχονδρίου ή αλλιώς της απομάκρυνσής του. Το κύριο μονοπάτι που συμβάλλει στη διατήρηση της μιτοχονδριακής

πρωτεϊνικής ομοιόστασης είναι το μιτοχondριακό μονοπάτι απόκρισης στη μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (mitochondrial Unfolded Protein Response, UPR^{mt}).

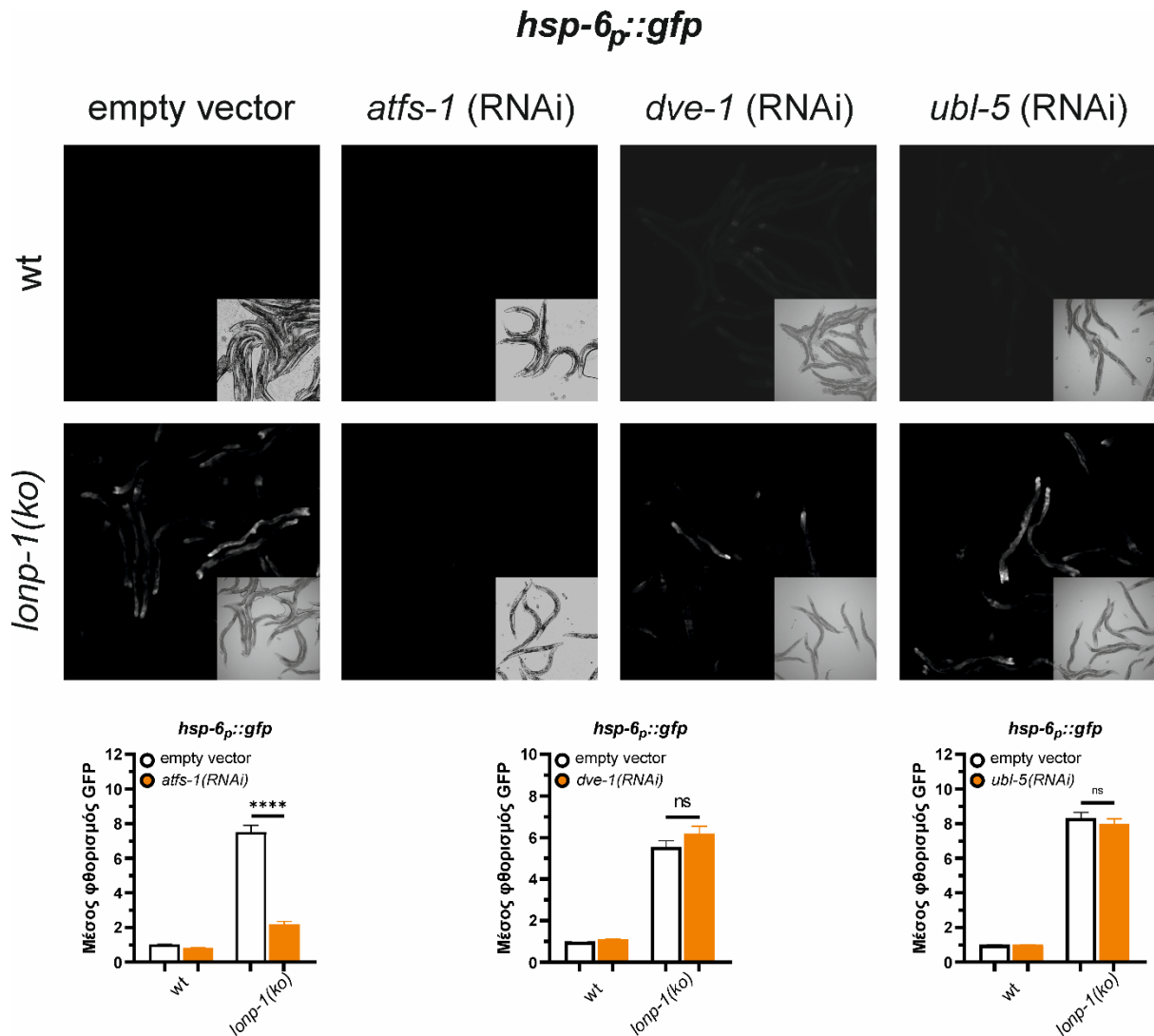
Γ.2.1. Ενεργοποίηση του UPR^{mt} μέσω του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1 στα μεταλλάγματα *lonp-1*

Η αύξηση των ενδογενών επιπέδων ROS έχει δείχθει ότι οδηγεί στην ενεργοποίηση του UPR^{mt} μέσω του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1 στο νηματώδη (αναλυτικά στην § Α.2.3.). Συνθήκες στρες που επηρεάζουν τη μιτοχondριακή λειτουργία, προωθούν τη συσσώρευση του ATFS-1 στο κυτταρόπλασμα και τη μετέπειτα εισαγωγή του στον πυρήνα, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες ο ATFS-1 οδηγείται στο μιτοχόνδριο όπου αποικοδομείται μέσω της πρωτεολυτικής δράσης της LONP-1 (Nargund et al., 2012). Γονιδιακή αποσιώπηση με RNAi της πρωτεάσης LONP-1 δεν είχε βρεθεί να ενεργοποιεί το UPR^{mt} αλλά και ούτε να επηρεάζει με κάποιον τρόπο την ανάπτυξη των νηματωδών (Nargund et al., 2012). Μπορεί όμως η αποσιώπηση του *lonp-1* με RNAi μέσω σίτισης να μην επαρκεί για την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων, όπως έχει περιγραφεί διεθνώς και για άλλα γονίδια. Καθώς από τη μελέτη των μεταλλαγμάτων *lonp-1* δείχθηκε η προβληματική ανάπτυξη και μιτοχondριακή δυσλειτουργία τους, ελέγχθηκε η σχετική έκφραση των γονιδίων *hsp-6/mtHSP70* και *hsp-60/mtHSP60*, που είναι δύο αναγνωρισμένοι μάρτυρες της επαγωγής του UPR^{mt} (Yoneda et al., 2004), σε υπόβαθρο *lonp-1* και αγρίου τύπου N2. Τα *lonp-1* άτομα έχουν μόνιμα αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης των *hsp-6* και *hsp-60* συγκριτικά με τα N2, όπως εξακριβώθηκε τόσο με τη χρήση διαγονιδιακών ατόμων που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο των υποκινητών *hsp-6* και *hsp-60* όσο και με ποσοτική RT-PCR (RT-qPCR) για τα ενδογενή επίπεδα mRNA (Εικ. Γ.2-1). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η απώλεια της πρωτεάσης LONP-1 είναι ικανή να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι UPR^{mt} στο νηματώδη.



Εικόνα Γ.2-1. Η έλλειψη της LONP-1 ενεργοποιεί το μονοπάτι UPR^{mt}. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP των μαρτύρων ενεργοποίησης του UPR^{mt} *hsp-6_p::gfp* και *hsp-60_p::gfp* και η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων *hsp-6* και *hsp-60* σε wt και *lonp-1* σκουλήκια. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα 1 ημέρας και για την αξιολόγηση της σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το μη συζευγμένο t-test (p-value).

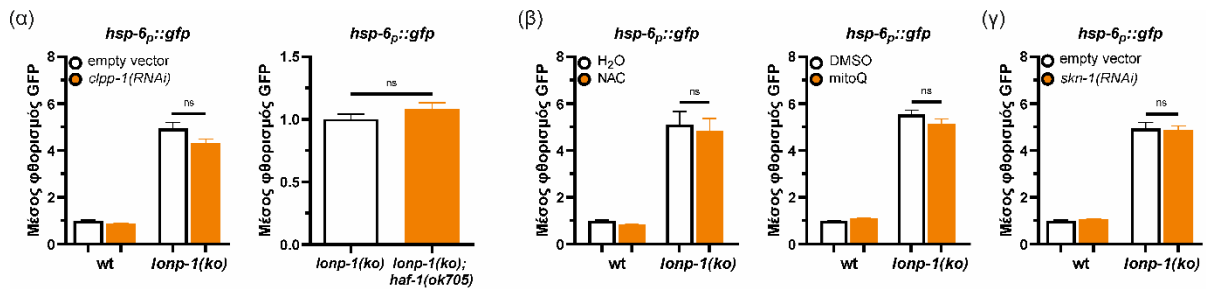
Στη συνέχεια, εξακριβώθηκε πως ο ATFS-1 απαιτείται για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* άτομα, καθώς η αποσιώπηση του με RNAi μειώνει σημαντικά την ένταση του φθορισμού του μάρτυρα *hsp-6_p::gfp* στα μεταλλάγματα *lonp-1* (Εικ. Γ.2-2). Ωστόσο, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης τύπου ουβικιτίνης UBL-5 και του μεταγραφικού παράγοντα DVE-1, που μπορεί να δρουν συνεργιστικά με τον ATFS-1 στον πυρήνα για την ενεργοποίηση του UPR^{mt}, δεν μειώνουν την επαγωγή του *hsp-6_p::gfp* στα *lonp-1* άτομα (Εικ. Γ.2-2).



Εικόνα Γ.2-2. Ο μεταγραφικός παράγοντας *ATFS-1* απαιτείται για την ενεργοποίηση του *UPR^{mt}* στα μεταλλάγματα *lonp-1*. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP των μαρτύρων ενεργοποίησης του *UPR^{mt}* *hsp-6_p::gfp* και *hsp-60_p::gfp* σε μία ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1*, στα οποία έγινε αποσιώπηση των γονιδίων *atfs-1*, *dve-1*, *ubl-5* μέσω RNAi σίτισης σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

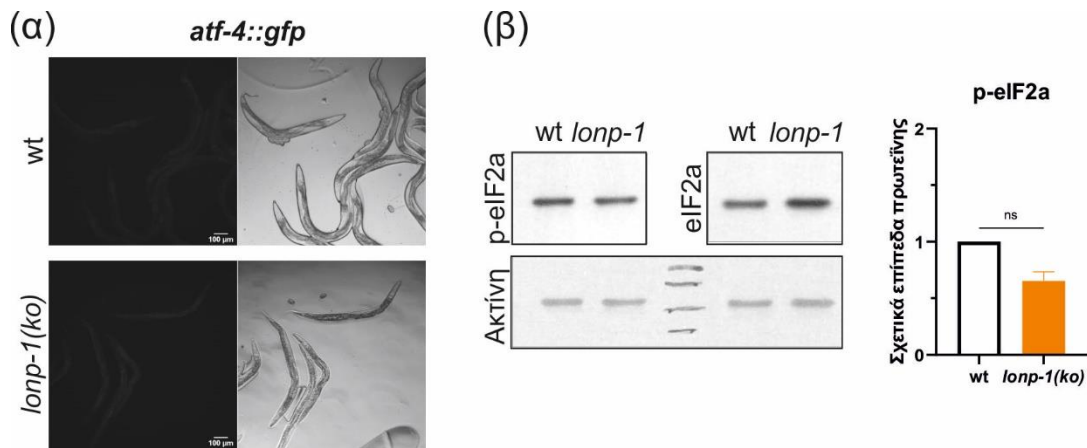
Επιπλέον η μιτοχondριακή πρωτεάση CLPP-1/ClpX και ο μεταφορέας πεπτιδίων HAF-1, που δρουν αναρροϊκά του μονοπατιού του μιτοχondριακού στρες και συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του *UPR^{mt}*, δεν είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίησή του στα άτομα *lonp-1*, καθώς κατά την αποσιώπησή τους δεν εμποδίζεται η επαγωγή του *hsp-6_p::gfp* (Εικ. Γ.2-3α). Συμπεραίνουμε πως η πρωτεάση CLPP-1 και η απελευθέρωση πεπτιδίων από τον HAF-1 στο κυτταρόπλασμα δεν είναι απαραίτητος σηματοδοτικός μηχανισμός για την ενεργοποίηση του *UPR^{mt}* στο στέλεχος *lonp-1*. Για να μελετηθεί περαιτέρω η συμβολή των ελευθέρων ριζών στην ενεργοποίηση του *UPR^{mt}* στο στέλεχος *lonp-1*, χορηγήθηκαν στα σκουλήκια οι αντιοξειδωτικές ουσίες Ν-ακετυλο-L-κυστεΐνη (N-acetylcysteine, NAC) και μιτοκινόλη (Mitoquinol, mitoQ) που καταπολεμούν τις συνολικές και μιτοχondριακές, αντίστοιχα, ROS του κυττάρου (Kelso et al., 2001; Schulz et al., 2007). Η χορήγηση των αντιοξειδωτικών δεν μειώνουν την έκφραση του μάρτυρα *hsp-6_p::gfp* σε υπόβαθρο N2 ή *lonp-1* (Εικ. Γ.2-3β). Επιπλέον, η αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα *skn-1/nrf*, που έχει κυρίαρχο ρόλο στην αντιοξειδωτική απόκριση του *C. elegans*, δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του μάρτυρα

στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-3γ). Επομένως, οι ROS δεν φαίνεται να ενεργοποιούν τον ATFS-1 στο στέλεχος *lonp-1*, αλλά πιθανότερη ως αιτία είναι η εκτεταμένη βλάβη του μιτοχονδριακού δικτύου ή η αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, που έχει αναφερθεί ότι μπορεί να ανιχνεύεται από τον ATFS-1 και να οδηγεί στην ενεργοποίηση του UPR^{mt} (Rolland et al., 2019).



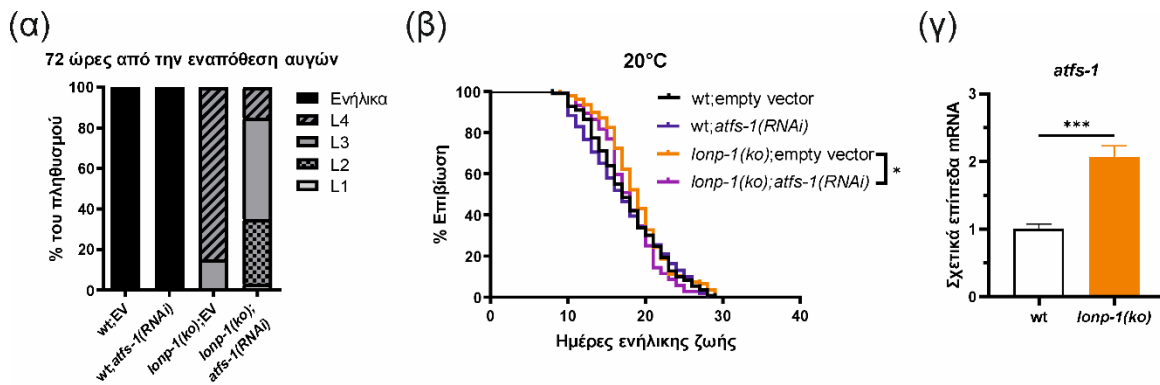
Εικόνα Γ.2-3. Η ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1* είναι ανεξάρτητη των *CLPP-1*, *HAF-1*, *SKN-1* και των ROS του κυττάρου. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP των μαρτύρων ενεργοποίησης του UPR^{mt} *hsp-6p::gfp* και *hsp-60p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1*, στα οποία έγινε (α) αποσιώπηση του γονιδίου *clpp-1* και διαγραφή του γονιδίου *haf-1*, (β) χορήγηση των αντιοξειδωτικών NAC και mitoQ και (γ) αποσιώπηση του γονιδίου *skn-1*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Για την επαγωγή του UPR^{mt} στα θηλαστικά απαιτείται το σύστημα ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες (Integrated Stress Response, ISR) αλλά όχι και για την επαγωγή του στο *C. elegans* (Anderson & Haynes, 2020). Το σηματοδοτικό μονοπάτι ISR, στα θηλαστικά, ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση του ευκαρυωτικού παράγοντα-2 έναρξης της μετάφρασης (alpha subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2, eIF2a) που καταστέλλει την πρωτεϊνσύνθεση και επιτρέπει την επιλεκτική μετάφραση των bZIP μεταγραφικών παραγόντων ATF4 (Vattem & Wek, 2004) και ATF5 (Zhou et al., 2008). Το γονίδιο *atf-4/T04C10.4* (προηγουμένως γνωστό στη βιβλιογραφία ως *atf-5* (Rousakis et al., 2013) κωδικοποιεί για το μοναδικό ομόλογο των bZIP μεταγραφικών παραγόντων ATF4 και ATF5 στο νηματώδη σκώληκα και αποτελεί έναν αναγνωρισμένο μάρτυρα επαγωγής του ISR. Για να ελεγχθεί ο ρόλος του ISR στην επαγωγή του UPR^{mt} στο στέλεχος *lonp-1*, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά άτομα που εκφράζουν ολόκληρο το γονίδιο *atfs-4*, συμπεριλαμβανομένου του αναρροϊκού ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου, συντηγμένο με GFP (Rousakis et al., 2013), σε υπόβαθρο αγρίου τύπου N2 και *lonp-1*. Δεν παρατηρείται αυξημένη επαγωγή του μάρτυρα στα άτομα *lonp-1* συγκριτικά με τα N2 υποστηρίζοντας πως δεν υπάρχει καταστολή της μετάφρασης στα άτομα *lonp-1* (Εικ. Γ.2-4α). Συμπληρωματικά, ελέγχθηκαν τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης του παράγοντα eIF2a σε υπόβαθρο N2 και *lonp-1* μέσω της τεχνικής Western blotting, χρησιμοποιώντας αντισώματα για την ανθρώπινη ολική και φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη eIF2a (anti-eIF2a, anti-phospho-eIF2a (*ser51*)). Η φωσφορυλίωση του eIF2a από τις κινάσες GCN-2 και PERK/PEK-1 στη σερίνη 51 (*ser51*) είναι το κεντρικό γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση του ISR (Ron, 2002). Δεν παρατηρείται αύξηση της *ser51* φωσφορυλίωσης του eIF2a στα άτομα *lonp-1*, αντιθέτως εμφάνισαν μικρή μείωση συγκριτικά με τα N2 (Εικ. Γ.2-4β) αποκλείοντας έτσι την επαγωγή του μονοπατιού ISR ή την καταστολή της μετάφρασης λόγω απώλειας του *lonp-1*.



Εικόνα Γ.2-4. Η επαγωγή του μονοπατιού ISR δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα *lonp-1*. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας διαγονιδίου *atf-4::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1*. (β) Ανάλυση Western blot με ανθρώπινο αντίσωμα για την ολική και φωσφορυλιωμένη μορφή του eIF2a και τη β-ακτίνη ως control. Τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλιωμένης μορφής του eIF2a αξιολογήθηκαν ως ο λόγος κανονικών/φωσφορυλιωμένων επιπέδων eIF2a, κανονικοποιημένα ως προς ακτίνη. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων, κανονικοποιημένος ως προς το στέλεχος N2 (wt) και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value)..

Αν και η επαγωγή του UPR^{mt} λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας έχει συνδεθεί με αυξημένη διάρκεια ζωής, άλλες μελέτες έχουν δείξει πως η επαγωγή του συνδέεται και με μειωμένη διάρκεια ζωής (αναλυτική ανασκόπηση του ρόλου του UPR^{mt} στη διάρκεια ζωής του νηματώδους (Bennett & Kaeberlein, 2014)). Για να διερευνηθεί αν η μειωμένη διάρκεια ζωής των ατόμων *lonp-1* οφείλεται στην ενεργοποίηση του UPR^{mt}, έγιναν προσπάθειες διασταύρωσης των ατόμων *lonp-1* με άτομα απώλειας λειτουργίας *atfs-1(gk3094)*. Ωστόσο η ομόζυγη διπλή μεταλλαγή των γονιδίων αυτών ήταν αδύνατη, καθώς τα διπλά μεταλλαγμένα άτομα είναι στείρα. Σε συμφωνία με αυτό, η αποσιώπηση του *atfs-1* με RNAi μέσω σίτισης για δύο ή παραπάνω γενιές έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη εμβρυϊκή θνησιμότητα και ελάχιστους απογόνους με καθυστερημένη ανάπτυξη στο υπόβαθρο *lonp-1*. Αντιθέτως, η αποσιώπηση του *atfs-1* δεν έχει καμία επίδραση στα αγρίου τύπου N2 (Εικ. Γ.2-5α). Η αποσιώπηση του *atfs-1* κατά την ενηλικίωση (προνομφικό στάδιο L4 ή νεαρό ενήλικο στάδιο πριν παραχθούν απόγονοι) έχει ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μείωση της διάρκειας ζωής των ατόμων *lonp-1* ενώ δεν επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των N2 (Εικ. Γ.2-5β, Πίνακας Γ.2-1). Σημειωτέων, τα άτομα *lonp-1* εμφανίζουν αυξημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *atfs-1* (Εικ. Γ.2-5γ), πιθανόν λόγω της θετικής αυτορρύθμισης του *atfs-1* (Nargund et al., 2015). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν πως η δράση του ATFS-1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση, ανάπτυξη και διάρκεια ζωής των ατόμων *lonp-1*.

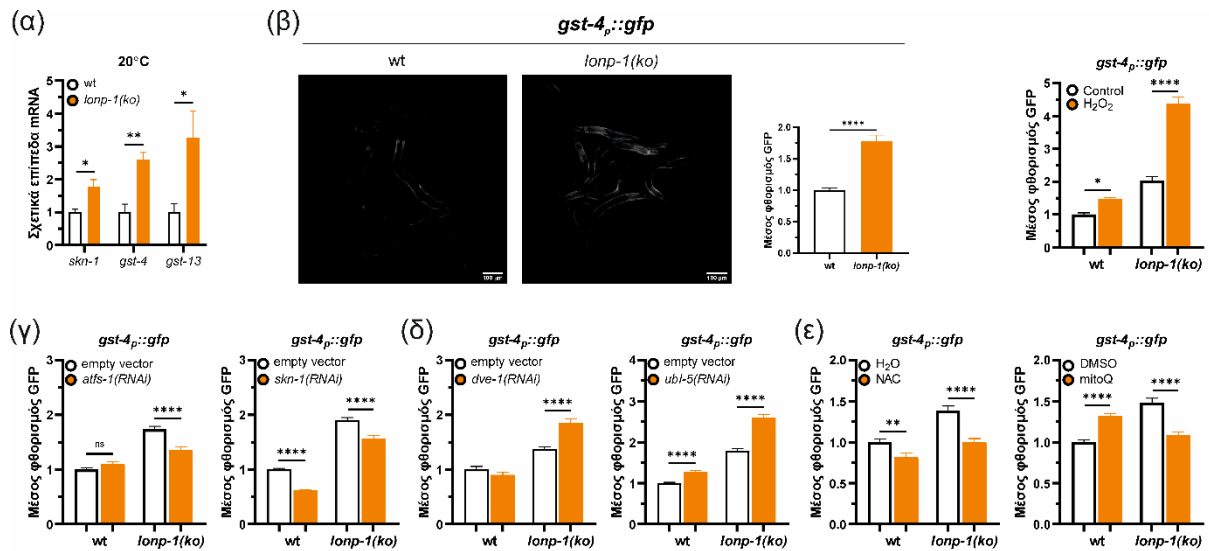


Εικόνα Γ.2-5. Η δράση του ATFS-1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση, ανάπτυξη και διάρκεια ζωής του *lonp-1*. (α) Ο ρυθμός ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων *lonp-1* και *wt* κατά την αποσιώπηση του *atfs-1* με RNAi μέσω σίτισης, 72 ώρες μετά την εναπόθεση αυγών στους 20° C σε σύγκριση με τον κενό φορέα. (β) Δοκιμασία διάρκειας ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1* και *wt* κατά την αποσιώπηση του *atfs-1* με RNAi μέσω σίτισης στους 20° C. Οι επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των δοκιμασιών διάρκειας ζωής παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.2-1. (γ) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *atfs-1* σε *wt* και *lonp-1* σκουλήκια. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Γ.2.2. Ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα μεταλλάγματα *lonp-1*

Τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής ROS είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν κυτταροπλασματικούς μηχανισμούς απόκρισης στο στρες και μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση αντιοξειδωτικών, ενζυμικών και μη, συστημάτων. Ο κύριος ρυθμιστής της αντιοξειδωτικής απόκρισης στο νηματώδη σκώληκα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1, που προσομοιάζει τη λειτουργία των ανθρωπίνων μεταγραφικών παραγόντων NRF1/2 και ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων της φάσης 2 ως απόκριση σε ξενοβιοτικές ουσίες ή σε οξειδωτικό στρες (An & Blackwell, 2003; Blackwell et al., 2015; Oliveira et al., 2009; Walker et al., 2000). Υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες έχει δειχθεί πως ο SKN-1 είναι μεταγραφικός στόχος του ATFS-1 (Munkacsy et al., 2016; Nargund et al., 2015), επομένως έγινε σύγκριση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του *skn-1* και γνωστών γονιδίων-στόχων του, όπως οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης 4 και 13 (glutathione S-transferases *gst-4*, *gst-13*) (Kahn et al., 2008), μεταξύ των στελεχών αγρίου τύπου N2 και *lonp-1*. Το στέλεχος *lonp-1* εμφανίζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης των *skn-1*, *gst-4*, *gst-13* συγκριτικά με το στέλεχος N2 (Εικ. Γ.2-6α). Χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *gst-4* (Glover-Cutter et al., 2013), επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του SKN-1 (Dues et al., 2016; Kahn et al., 2008) στο στέλεχος *lonp-1* συγκριτικά με το N2. Η ενεργοποίηση του SKN-1 ήταν ακόμη μεγαλύτερη και στα δύο στελέχη υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες με τη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Εικ. Γ.2-6β). Όπως αναμενόταν, η γονιδιακή αποσιώπηση του *skn-1* μειώνει την επαγωγή του μάρτυρα *gst-4_p::gfp* και στα δύο στελέχη, αλλά η γονιδιακή αποσιώπηση του *atfs-1* μειώνει την επαγωγή του *gst-4* μόνο στο στέλεχος *lonp-1* (Εικ Γ.2-6γ). Αυτό υποδηλώνει ότι σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες λόγω απώλειας της LONP-1, ο ATFS-1 ρυθμίζει, τουλάχιστον εν μέρει, την ενεργότητα του SKN-1. Αντιθέτως, η αποσιώπηση των μεταγραφικών ρυθμιστών του UPR^{mt} *dve-1* και *ubl-5* όχι μόνο δεν μειώνει αλλά αυξάνει την επαγωγή του μάρτυρα στα στελέχη αγρίου τύπου N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-6δ), υποδεικνύοντας πως δεν είναι απαραίτητοι για τη ρύθμιση της ενεργότητας του SKN-1 από τον ATFS-1 σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες. Επιπλέον, η χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC μειώνει την επαγωγή του μάρτυρα *gts-4_p::gfp* στο στέλεχος *lonp-1* σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα N2, ενώ η χορήγηση του αντιοξειδωτικού mitoQ μειώνει την επαγωγή του μάρτυρα μόνο στο στέλεχος *lonp-1* (Εικ. Γ.2-6ε). Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant response,

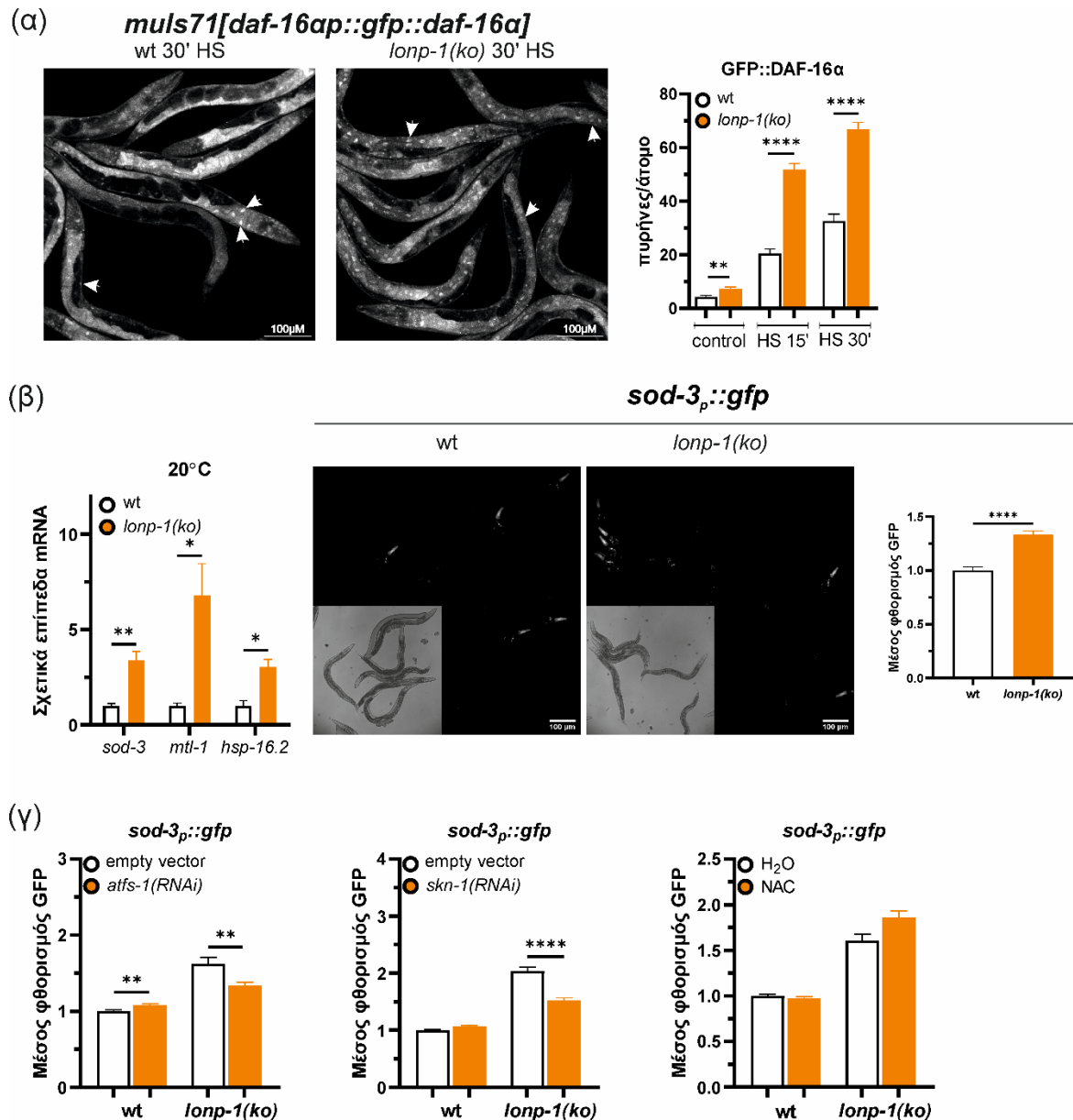
AR) μέσω του SKN-1 στο στέλεχος *lonp-1*, εξαρτάται από την ενεργοποίηση του ATFS-1 αλλά και από την παραγωγή των ROS.



Εικόνα Γ.2-6. Στο στέλεχος *lonp-1* ενεργοποιείται η αντιοξειδωτική απόκριση στο στρες και εξαρτάται από τη δράση του ATFS-1 και την επαγωγή ROS. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων *skn-1*, *gst-4*, *gst-13* σε wt και *lonp-1* σκουλήκια. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων, κανονικοποιημένος ως προς το στέλεχος N2 (wt) και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το συζευγμένο t-test (p-value). (β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP των μαρτύρων ενεργοποίησης του AR σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* σε φυσιολογικές και στρες συνθήκες (10 mM H₂O₂ για 30 λεπτά, και 30 λεπτά ανάρρωση). Ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP των μαρτύρων ενεργοποίησης του AR σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά (γ) την αποσιώπηση των *atfs-1*, *skn-1*, (δ) την αποσιώπηση των *dne-1*, *ubl-5* και (ε) τη χορήγηση των αντιοξειδωτικών NAC και mitoQ. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Η ενεργοποίηση του SKN-1 εξαρτάται και από την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης (Insulin/IGF signaling pathway, IIS) (Tullet et al., 2008), βασικός στόχος του οποίου είναι ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16/FOXO. Έχει δειχθεί πως σε αρκετά μιτοχονδριακά μεταλλαγμένα στελέχη νηματωδών ο DAF-16 ενεργοποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα λόγω συσσώρευση των ROS αλλά και εν μέρει μέσω του ATFS-1 (Senchuk et al., 2018; Wu et al., 2018). Ο DAF-16 ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων απαραίτητων για τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την απόκριση στο στρες και την ανοσολογική απόκριση, και θεωρείται βασικός παράγοντας διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης. Για τον κυτταρικό εντοπισμό του DAF-16 χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη που εκφράζουν την άλφα υπομονάδα του DAF-16 σε σύμπτυξη με GFP, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *daf-16*, σε υπόβραθρο αγρίου τύπου N2 και *lonp-1*. Τα διαγονιδιακά στελέχη ελέγχθηκαν σε συνθήκες φυσιολογικής ανάπτυξης, αλλά και σε συνθήκες θερμικού στρες, όπου η αυξημένη θερμοκρασία ευνοεί τη μετατόπιση του DAF-16 στον πυρήνα και την επαγωγή των γονιδίων-στόχων του. Στο στέλεχος *lonp-1* παρατηρείται αυξημένος εντοπισμός του DAF-16 στον πυρήνα, συγκριτικά με το N2, σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας (Εικ. Γ.2-7α). Ακόμη, ελέγχθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης τριών γονιδίων-στόχων του DAF-16, της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης MnSOD (*sod-3*), της μεταλλοπρωτεϊνάσης (*mtl-1*) και της μικρής θερμικής πρωτεΐνης (*hsp-16.2*) που είναι το ομόλογο της ανθρώπινης κρυσταλλίνης (Libina et al., 2003; Murphy et al., 2003; Tepper et al., 2013). Σε συμφωνία με τον αυξημένο εντοπισμό του DAF-16 στον πυρήνα, παρατηρούνται αυξημένα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των στόχων του στο στέλεχος *lonp-1* συγκριτικά με το N2 (Εικ. Γ.2-7β). Αυτό επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση διαγονιδιακών ζώων που

εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *sod-3* (Εικ. Γ.2-7β) (Dues et al., 2016; Honda & Honda, 1999). Η επαγωγή του DAF-16 στα μεταλλάγματα *lonp-1* εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες ATFS-1 και SKN-1, καθώς η αποσιώπησή τους έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του φθορισμού του μάρτυρα (Εικ. Γ.2-7γ). Ωστόσο η χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC δεν μειώνει την ένταση του φθορισμού σε κανένα στέλεχος (Εικ. Γ.2-7γ), υποστηρίζοντας πως οι αυξημένες ROS δεν συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του DAF-16. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες λόγω της έλλειψης του γονιδίου *lonp-1*, ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1 επάγεται σε επίπεδο μεταγραφής αλλά και ενεργότητας από τον ATFS-1, τόσο λόγω της συσσώρευσης ROS για την αντιοξειδωτική απόκριση, αλλά και ανεξαρτήτως των ROS για την ενεργοποίηση του DAF-16.

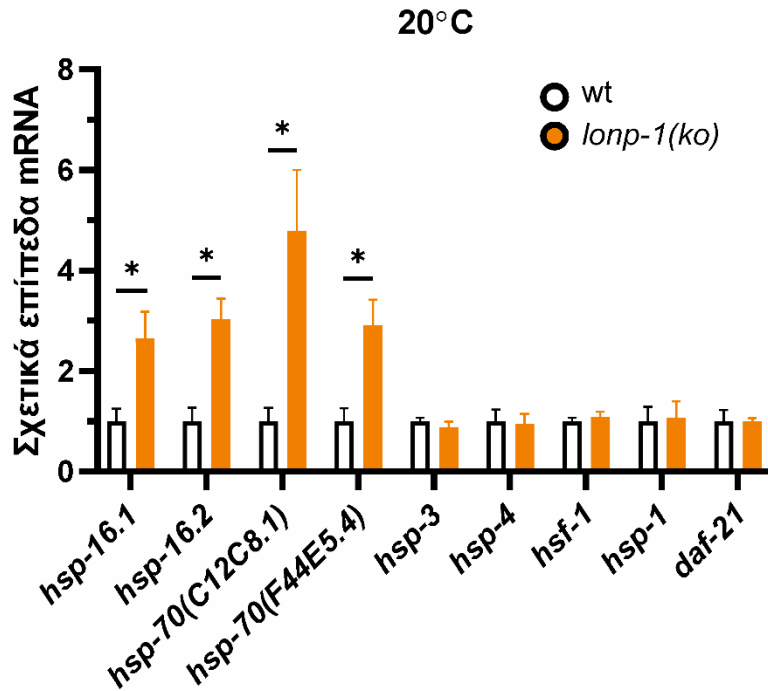


Εικόνα Γ.2-7. Η ενεργοποίηση του DAF-16/FOXO εξαρτάται από την ATFS-1-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του SKN-1 στα *lonp-1*. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση των πυρήνων με GFP σε μίας ημέρας wt και *lonp-1* άτομα που εκφράζουν τον μεταφραστικό μάρτυρα *muls71[daf-16ap::gfp::daf-16α(bKO)]* σε φυσιολογικές και θερμικού στρες συνθήκες (θερμικό στρες για 15 και 30 λεπτά). Τα λευκά βέλη δείχνουν την μετατόπιση του μάρτυρα σε πυρήνες επιδερμίδας και εντέρου. (β) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων *sod-3*, *mtl-1*, *hsp-16.2* και οι αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας

και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα ενεργοποίησης του DAF-16, *sod-3p::gfp*, σε μίας ημέρας ενήλικα *wt* και *lonp-1* σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. (γ) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του διαγονιδίου *sod-3p::gfp* υπό συνθήκες αποσιώπησης των *atfs-1*, *skn-1* με RNAi σίτισης και υπό χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC σε μίας ημέρας ενήλικα *wt* και *lonp-1* σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

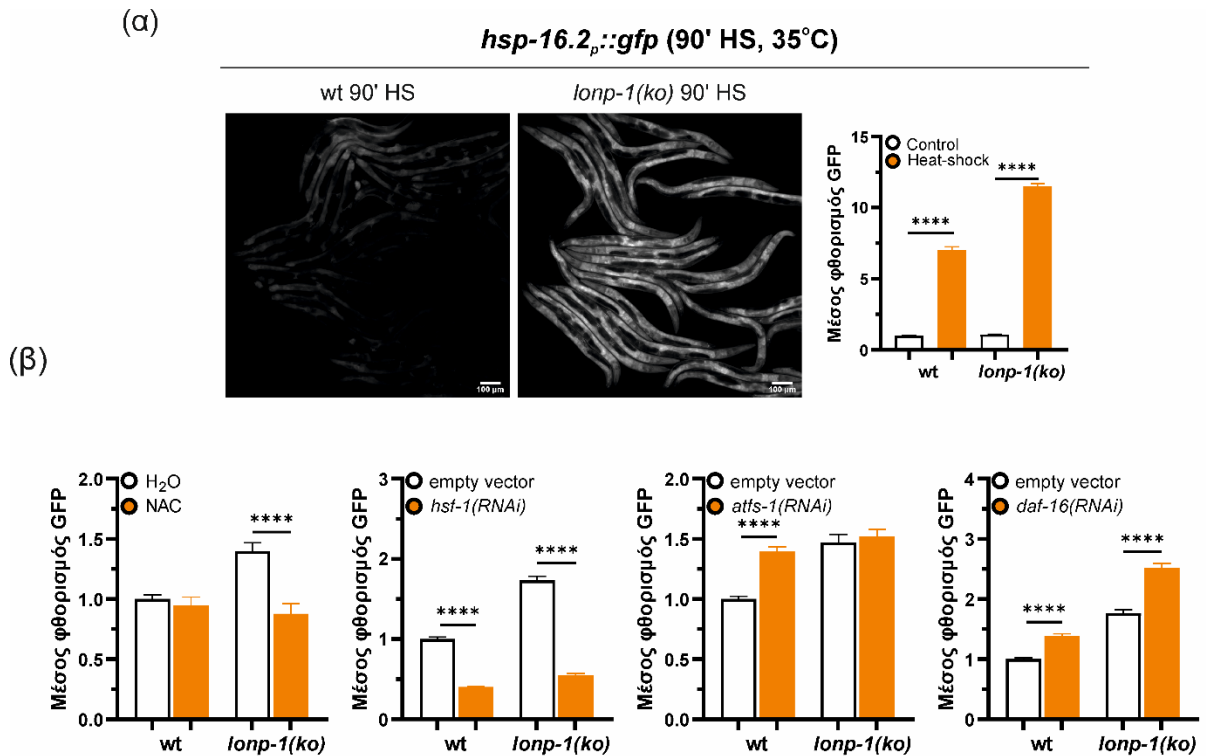
Γ.2.3. Ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στο θερμικό στρες στα μεταλλάγματα *lonp-1*

Εκτός από την ενεργοποίηση του UPR^{mt} και της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω SKN-1 και DAF-16, ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1 προκαλεί την αυξορρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στο UPR του ενδοπλασματικού δικτύου (UPR^{ER}) όπως και στο κυτταροπλασματικό UPR (UPR^{cyt}), γνωστό και ως απόκριση στο θερμικό στρες (Heat Shock Response, HSR) (Soo et al., 2021). Η HSR είναι ένας προσαρμοστικός ευκαρυωτικός μηχανισμός που προστατεύει τα κύτταρα από τη συσσώρευση μετουσιωμένων ή κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και μπορεί να ενεργοποιηθεί από πολλούς διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως η υψηλή θερμοκρασία, το οξειδωτικό στρες, η υποξία ή τα βαρέα μέταλλα. Για την έκφραση γονιδίων απόκρισης στο στρες που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικού στρες (Heat Shock Proteins, HSP), είναι απαραίτητη η υπερ- ή υπο-φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του κύριου μεταγραφικού παράγοντα της θερμικής απόκρισης στο στρες (Heat Shock Transcription Factor 1, HSF-1) (Williams et al., 2020; Wu et al., 1986; Wu, 1984). Ο HSF-1 δένεται επιλεκτικά στα στοιχεία απόκρισης στο θερμικό στρες (Heat Shock Element, HSE) που βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων των HSP ενισχύοντας τη μεταγραφή τους (Gupta 2013). Η ενεργότητα του HSF-1 ελέγχθηκε μετρώντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων του, τις πρωτεΐνες θερμικού στρες (*hsp*). Στο στέλεχος *lonp-1* ελέγχθηκε η ενεργότητα του HSF-1 μέσω της επαγωγής γονιδίων-στόχων του, υπό φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας, και παρατηρήθηκαν αυξημένα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *hsp-16.1* και *hsp-16.2*, και δύο μελών της οικογένειας των κυτταροπλασματικών HSP70, *hsp-70(C12C8.1)* και *hsp-70(F44E5.4)* συγκριτικά με το αγρίου τύπου N2 (Εικ. Γ.2-8). Αντιθέτως, δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ στελεχών N2 και *lonp-1* στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων συνεχούς έκφρασης (constitutively expressed) *hsf-1*, *hsp-1/HSC70*, *daf-21/HSP90* (Εικ. Γ.2-8). Τέλος, δεν υπάρχει επαγωγή των γονιδίων *hsp-3* και *hsp-4*, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες δέσμησης ανοσοσφαιρίνης (Binding immunoglobulin protein, BiP), BiP/HSP70 και είναι δείκτες ενεργοποίησης του UPR^{ER} (Dues et al., 2016; Urano et al., 2002).



Εικόνα Γ.2-8. Η απώλεια του *lonp-1* ενισχύει την απόκριση σε θερμικό σοκ (HSR). Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων HSR και των γονιδίων που σχετίζονται με το UPR^{ER}, σε σκουλήκια N2 (wt) και *lonp-1* σε φυσιολογική θερμοκρασία ανάπτυξης (20°C). Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το συζευγμένο t-test (*p*-value).

Για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης της κυτταροπλασματικής απόκρισης στο θερμικό στρες, επιλέχθηκε το αναγνωρισμένο γονίδιο-μάρτυρας *hsp-16.2* (Dues et al., 2016; Link et al., 1999). Χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά στελέχη που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *hsp-16.2* σε υπόβαθρο αγρίου τύπου και *lonp-1*, δεν παρατηρείται κανένα σήμα φθορισμού σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας (λόγω πολύ μικρών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου) αλλά έπειτα από μικρής διάρκειας θερμικού στρες, παρατηρείται αυξημένη ένταση φθορισμού στο στέλεχος *lonp-1* σε σχέση με το N2 (Εικ. Γ.2-9α). Η αυξημένη θερμική απόκριση στο στρες του *lonp-1*, εξαρτάται εν μέρει από την αυξημένη συγκέντρωση των ROS, καθώς η χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC οδηγεί σε μείωση του φθορισμού του μάρτυρα στο στέλεχος *lonp-1* (Εικ. Γ.2-9β). και από τον HSF-1 καθώς η αποσιώπηση του *hsf-1* οδηγεί σε μείωση του φθορισμού του μάρτυρα και στα δύο στελέχη (Εικ. Γ.2-9β). Η επαγωγή του μάρτυρα δεν εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες ATFS-1 και DAF-16 (Εικ. Γ.2-9β), με την αποσιώπησή τους να αυξάνει περαιτέρω την ένταση φθορισμού του μάρτυρα, πιθανώς λόγω του αυξημένου κυτταρικού στρες (Wu et al., 2018).



Εικόνα Γ.2-9. Η επαγωγή του HSR εξαρτάται από τον HSF-1 και την παραγωγή ROS. (α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *hsp-16.2_p::gfp* έπειτα από 90 λεπτά HS (35°C) σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1*. (β) Ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *hsp-16.2_p::gfp* έπειτα από 90 λεπτά HS (35°C) σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* στα οποία έγινε χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC ή αποσιώπηση των γονιδίων *hsf-1*, *atfs-1*, *daf-16* μέσω RNAi σίτισης σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

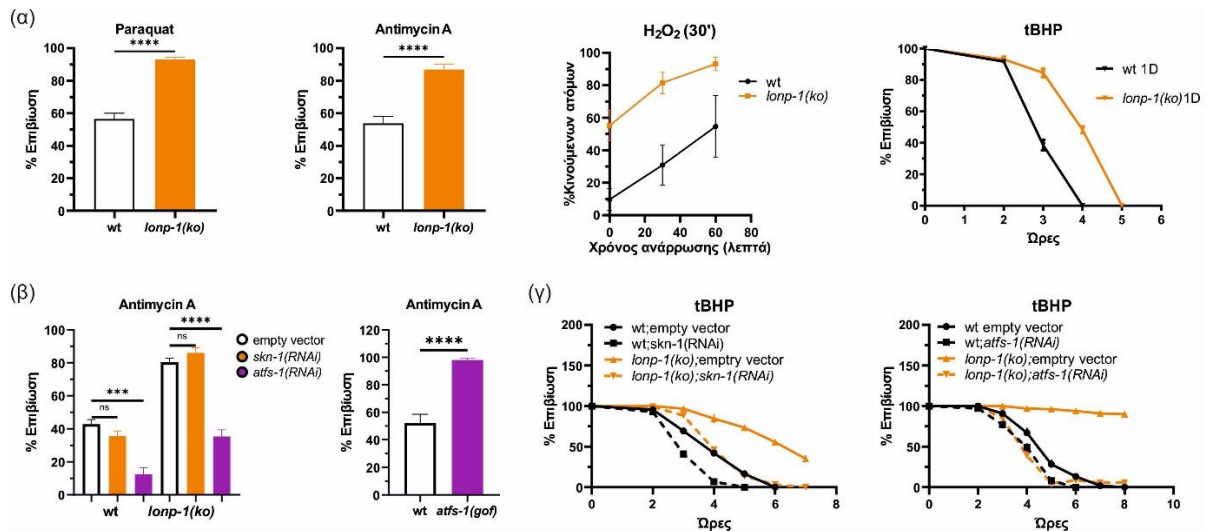
Γ.2.4. Η έλλειψη της LONP-1 επηρεάζει την επιβίωση του νηματώδους σε διάφορα είδη περιβαλλοντικού στρες

Η πρωτεάση LONP-1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου και την προστασία του από στρεσογόνους παράγοντες (Ngo & Davies, 2009), αλλά η απώλειά της ενεργοποιεί βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια που εμπλέκονται στην άμυνα και προσαρμογή στο στρες. Επομένως ελέγχθηκε πώς η έλλειψή της επηρεάζει την απόκριση του *C. elegans* σε διαφορετικά είδη εξωγενούς στρες.

Γ.2.4.1. Η απόκριση των μεταλλαγμάτων *lonp-1* στο οξειδωτικό στρες

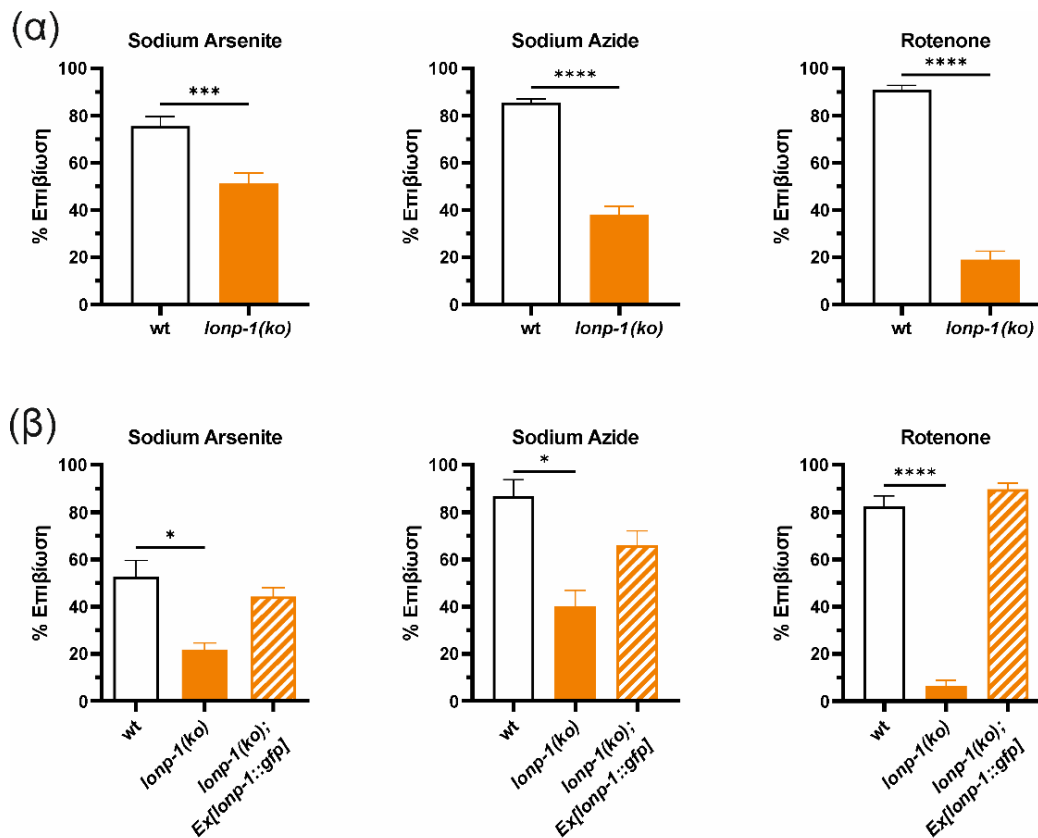
Η επαγωγή ROS στα κύτταρα νηματωδών έγινε με τη χορήγηση της προ-οξειδωτικής ουσίας Παρακουάτ (Paraquat, Pq) (Cochemé & Murphy, 2008; Runkel et al., 2013; Yoneda et al., 2004), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) ή του πιο σταθερού οργανικού tert-βουτυλο-υπεροξειδίου του υδρογόνου (tert-butyl hydroperoxide, tBHP)-Ref. Επίσης η χορήγηση της Αντιμυκίνης A (Antimycin A) έχει δειχθεί ότι παράγει ανιόντα υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια (Cochemé & Murphy, 2008; Runkel et al., 2013). Επώαση ενήλικων ατόμων αγρίου τύπου και *lonp-1* με τις παραπάνω ουσίες έδειξε ότι το στέλεχος *lonp-1* είναι πολύ πιο ανθεκτικό από το στέλεχος αγρίου τύπου N2 σε όλες τις περιπτώσεις (Εικ. Γ.2-10α). Σε συμφωνία με τον κυρίαρχο ρόλο του ATFS-1 στην απόκριση στο μιτοχονδριακό στρες, γενετική αποσιώπηση του *atfs-1* μειώνει την επιβίωση και των δύο υπό εξέταση στελεχών στην Αντιμυκίνη A (Εικ. Γ.2-10β), ενώ αντίθετα η μόνιμη παρουσία του ATFS-1 στον πυρήνα σε ένα στέλεχος που ο ATFS-1 δεν έχει λειτουργικό MTS (*atfs-1* gain-of-function) προσδίδει σημαντική ανθεκτικότητα

στην Αντιμυκίνη Α (Εικ. Γ.2-10β). Τέλος, η αποσιώπηση τόσο του *atfs-1* όσο και του *skn-1* μειώνει την επιβίωση των δύο στελεχών στο tBHP, επιβεβαιώνοντας το σημαντικό ρόλο και των δύο μεταγραφικών παραγόντων στην απόκριση στο κυτταρικό οξειδωτικό στρες (Εικ. Γ.2-10γ).



Εικόνα Γ.2-10. Το στέλεχος *lonp-1* είναι ανθεκτικό στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από Paraquat, Antimycin A ή H₂O₂. (α) Επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από paraquat (30 mM για 48 ώρες), antimycin A (40 μM για 24 ώρες), H₂O₂ (10 mM για 30 λεπτά) ή tBHP (7.5-10 mM) των ατόμων wt και *lonp-1*. (β) Επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από antimycin A (40 μM για 24 ώρες) των ατόμων wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση των *skn-1*, *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης και του, στελέχους *atfs-1(gof)* συγκριτικά με το N2 (wt). (γ) Επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από tBHP (10 mM) των ατόμων wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση των *skn-1*, *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

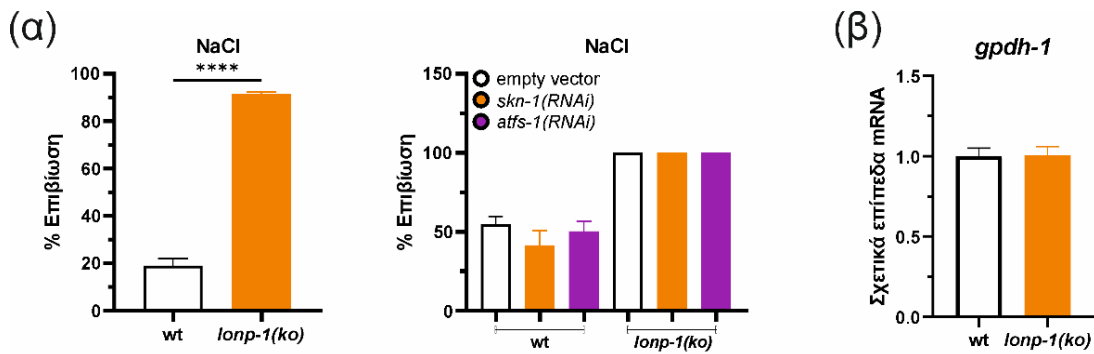
Η απόκριση ενός οργανισμού στο οξειδωτικό στρες μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο, τον τόπο και τη διάρκεια παραγωγής των ROS. Αυτή η υπόθεση ενισχύθηκε έπειτα από την επαγωγή ROS με τη χορήγηση των οξειδωτικών ουσιών αρσενικό νάτριο (sodium arsenite, NaAsO₂) (Hu et al., 2020), αζίδιο του νατρίου (sodium azide, NaN₃) (Hong et al., 2004) και ροτενόνη (rotenone) (Li et al., 2003) που δείχθηκε να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα από τα προηγούμενα οξειδωτικά, καθιστώντας το στέλεχος *lonp-1* πολύ πιο ευαίσθητο από το N2 (Εικ. Γ.2-11α). Πιθανώς τα αυξημένα επίπεδα των γονιδίων απόκρισης στο στρες στο στέλεχος *lonp-1* δεν επαρκούν για να αντιμετωπίσουν τους πρόσθετους μηχανισμούς ή μεταβολικές αλλαγές που προκαλούνται από αυτούς τους οξειδωτικούς παράγοντες και το συσσωρευτικό στρες γίνεται τελικά επιβλαβές. Πραγματικά, το στέλεχος *lonp-1* που εκφράζει έστω το μερικής λειτουργικό διαγονίδιο *lonp-1::gfp*, δεν είναι πιο ευαίσθητο σε αυτούς τους οξειδωτικούς παράγοντες (Εικ. Γ.2-11β), επιβεβαιώνοντας την αναγκαιότητα της πρωτεΐνης LONP-1 για την επιβίωση του *C. elegans* στις συγκεκριμένες συνθήκες στρες.



Εικόνα Γ.2-11. Το στέλεχος *lonp-1* είναι ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από *Sodium Arsenite*, *Sodium Azide* ή *Rotenone*. Επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από *sodium arsenite* (7.5 mM), *sodium azide* (1.5 mM) ή *rotenone* (10 μM) για 24 ώρες των ατόμων (α) wt και *lonp-1* και (β) wt, *lonp-1* και των μεταλλαγμάτων *lonp-1* που φέρουν το διαγονίδιο *lonp-1::gfp*. Παρουσιάζεται το ποσοστό επιβίωσης όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Γ.2.4.2. Τα μεταλλάγματα *lonp-1* είναι ανθεκτικά στο οσμωτικό στρες

Έχει δείχθει πως η ενεργοποίηση του ATFS-1 βοηθά στην επιβίωση των σκουληκιών στο οσμωτικό ή υπερτονικό στρες ενεργοποιώντας την απόκριση στο υπερτονικό στρες (hypertonic stress response, HTSR) (Soo et al., 2021; Wu et al., 2018). Ελέγχθηκε έτσι η επιβίωση των στελεχών σε συνθήκες οσμωτικού στρες, χορηγώντας τους αυξημένα ποσότητα αλατιού (500mM NaCl). Το στέλεχος *lonp-1* εμφανίζει αυξημένη επιβίωση στο οσμωτικό στρες συγκριτικά με το N2, αλλά αυτή η ανθεκτικότητα δεν εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες ATFS-1 και SKN-1, καθώς η αποσιώπησή τους δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στην επιβίωση των σκουληκιών (Εικ. Γ.2-12α). Σε συνθήκες υπεροσμωτικού στρες, αυξάνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *gpdh-1*, που κωδικοποιεί για την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH-1) και είναι γονίδιο μάρτυρας για το HTSR (Urso et al., 2020). Μετρώντας όμως τα σχετικά επίπεδα έκφρασής του δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των στελεχών *lonp-1* και N2 σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (Εικ. Γ.2-12β). Επομένως η ανθεκτικότητα του στελεχούς *lonp-1* στο HTS πιθανώς να οφείλεται σε διαφορετικούς πρωτεοστατικούς μηχανισμούς που επάγονται και του δίνουν πλεονέκτημα και σε οσμωτικό στρες.

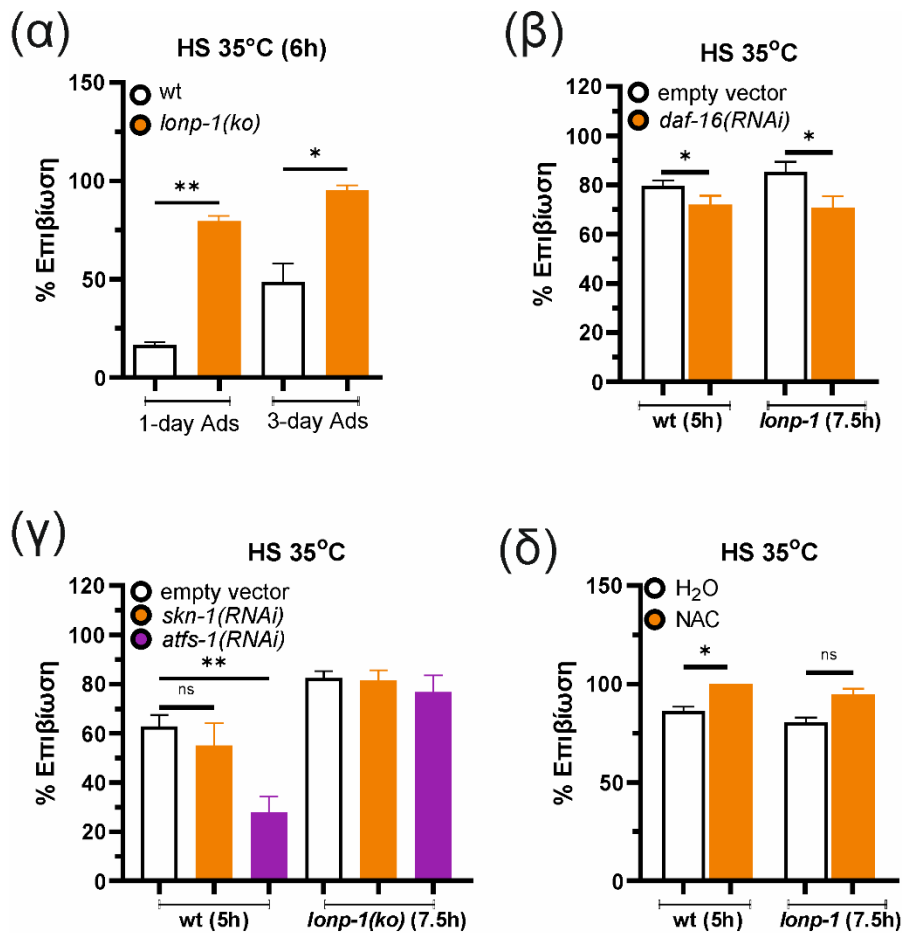


Εικόνα Γ.2-12. Τα μεταλλάγματα *lonp-1* είναι ανθεκτικά στο οσμωτικό στρες. (α) Επιβίωση σε οσμωτικό στρες από NaCl (500 mM για 24 ώρες) των ατόμων wt και *lonp-1* και κατά την αποσιώπηση των *skn-1*, *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης στα ίδια στελέχη. Παρουσιάζεται το ποσοστό επιβίωσης όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value). (β) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *gpdh-1* σε wt και *lonp-1* σκουλήκια. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Γ.2.4.3. Η έλλειψη της LONP-1 προσδίδει ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες

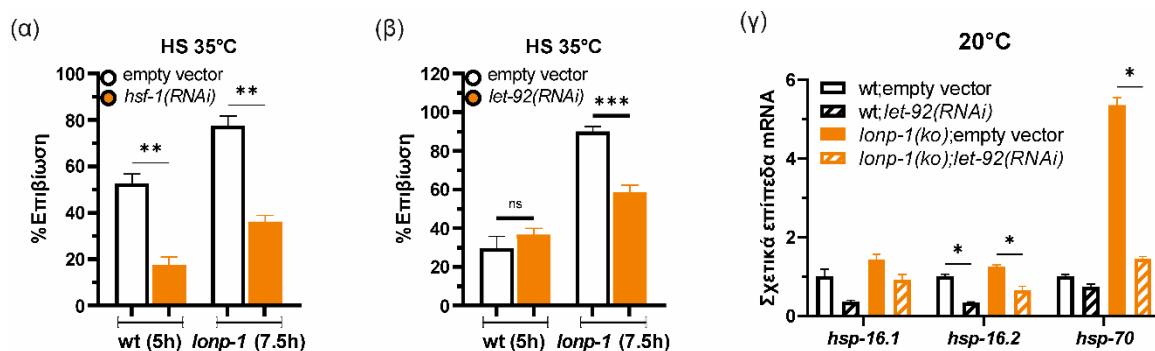
Σε απόλυτη συμφωνία με την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HSF-1 και τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των επαγόμενων HSPs που αναφέρθηκαν στην § Γ.2.3, η έκθεση μίας ημέρας ενήλικων σκουληκιών σε υψηλές θερμοκρασίες (35°C) οδηγεί σε στατιστικά σημαντικό υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης του στελέχους *lonp-1* συγκριτικά με το N2 (Εικ. Γ.2-13α). Καθώς η απόκριση στο θερμικό στρες μπορεί να επηρεαστεί από την περίοδο που ξεκινάει η αναπαραγωγική ηλικία (Labbadia & Morimoto, 2015), και τα άτομα *lonp-1* χαρακτηρίζονται από μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και μικρότερη γονιμότητα (§ Γ.1.1), η θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε και σε τριών ημερών ενήλικα σκουλήκια (Εικ. Γ.2-13α).

Από τα πειράματα ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του διαγονιδίου *hsp-16.2_{p::gfp}* στα στελέχη N2 και *lonp-1* μετά από μικρής διάρκειας θερμικού στρες έχει διαπιστωθεί σχετικά αυξημένος φθορισμός και στα δύο στελέχη κάτω από συνθήκες έλλειψης του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16/FOXO (§ Γ.2.3). Αυτό όμως μπορεί να είναι ένας προσαρμοστικός μηχανισμός του κυττάρου που προσπαθεί να αντισταθμίσει, χωρίς αποτέλεσμα, την έλλειψη του DAF-16 και την προκαλούμενη διαταραχή της πρωτεϊνικής ομοιοστάσης. Προς ενίσχυση αυτής της υπόθεσης, η αποσιώπηση του *daf-16* και στα δύο στελέχη μείωσε την θερμοανθεκτικότητά τους στον ίδιο βαθμό (Εικ. Γ.2-13β). Κάτι παρόμοιο ίσως συμβαίνει και σε συνθήκες έλλειψης του ATFS-1 (§ Γ.2.3), τουλάχιστον στο υπόβαθρο N2, ενώ στο μεταλλάγμα *lonp-1* δεν παρατηρήθηκε ούτε αύξηση του φθορισμού του διαγονιδίου (§ Γ.2.3) ούτε αλλαγή στην θερμοανθεκτικότητα (Εικ. Γ.2-13γ). Συμπληρωματικά, ούτε η αποσιώπηση του *skn-1* επηρεάζει την επιβίωση των στελεχών αγρίου τύπου και *lonp-1* στο θερμικό στρες (Εικ. Γ.2-13γ). Συμπερασματικά, επιβεβαιώσαμε και εδώ ότι η μεγάλη θερμοανθεκτικότητα των ατόμων *lonp-1* δεν εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες DAF-16 και ATFS-1, παρά το γεγονός ότι και οι δύο έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στο θερμικό στρες (Morimoto, 1998; Soo et al., 2021). Τέλος, η θερμοανθεκτικότητα των *lonp-1* δεν φαίνεται να εξαρτάται από τη συσσώρευση ROS καθώς η χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC δεν μειώνει την επιβίωση του στελέχους *lonp-1* (Εικ. Γ.2-13δ).



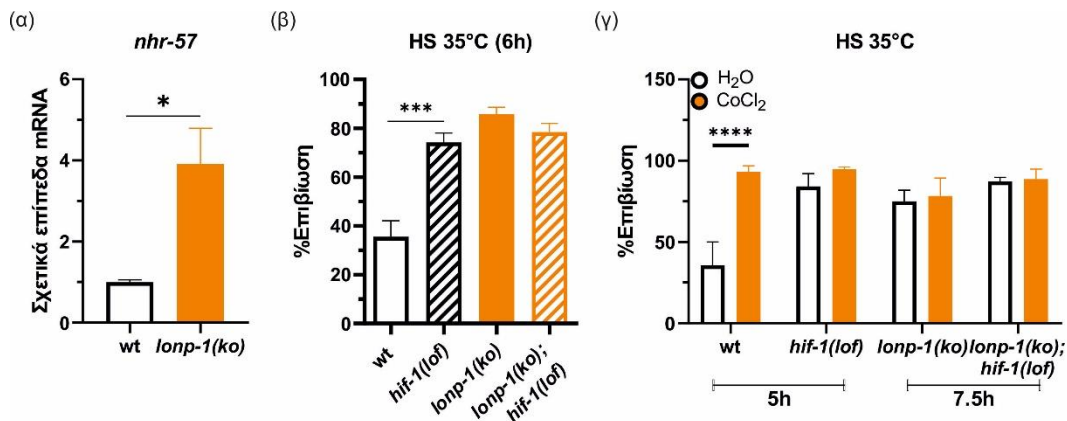
Εικόνα Γ.2-13. Τα μεταλλάγματα *lonp-1* είναι ανθεκτικά στο θερμικό στρες (HS). Το θερμικό στρες έγινε σε άτομα μίας ημέρας ενηλίκων στους 35° C για 6 ώρες, εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά στο διάγραμμα. Εμφανίζεται η επιβίωση των ατόμων N2 (wt) και *lonp-1* στο HS (α) μίας και τριών ημερών ενήλικα σκουλήκια, (β) κατά την αποσιώπηση του *daf-16* μέσω RNAi σίτισης, (γ) κατά την αποσιώπηση των *skn-1*, *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης και (δ) κατά τη χορήγηση του αντιοξειδωτικού NAC. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Όπως είναι αναμενόμενο λόγω του κεντρικού ρόλου του HSF-1 την απόκριση στο θερμικό στρες, η επιβίωση και των δύο στελεχών, N2 και *lonp-1*, στο θερμικό στρες εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα HSF-1 (Εικ. Γ.2-14α). Υπό συνθήκες ήπιου μιτοχονδριακού στρες, ο HSF-1 αποφωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο πρωτεϊνικής φωσφατάσης σερίνης-θρεονίνης PP2A (serine-threonine protein phosphatase complex, PP2A). Το σύμπλοκο PP2A στο *C. elegans* αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα LET-92, από την υπομονάδα ικριώματος PPP2R1A/PAA-1 και αρκετές ρυθμιστικές υπομονάδες που είναι υπεύθυνες για την ειδικότητα δέσμησης υποστρωμάτων. Σε αυτή την υπο-φωσφορυλιωμένη κατάσταση λόγω μιτοχονδριακού στρες, ο HSF-1 επάγει την μεταγραφή μικρών HSP για την προστασία του κυττάρου από τη συσσώρευση κακώς διπλωμένων πρωτεϊνών. Η αποσιώπηση του γονιδίου *let-92* δεν επηρεάζει την επιβίωση του στελέχους N2 στο θερμικό στρες, αλλά μειώνει την θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* (Εικ. Γ.2-14β), υποδεικνύοντας πως η υπο-φωσφορυλιωμένη μορφή του HSF-1 είναι απαραίτητη για τη θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1*. Τα αυξημένα επίπεδα των μικρών *hsp* και *hsp-70* υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης στο στέλεχος *lonp-1*, εξαρτώνται από τη λειτουργία του LET-92 (Εικ. Γ.2-14γ) και πιθανώς δίνουν πλεονέκτημα επιβίωσης υπό συνθήκες θερμικού στρες.



Εικόνα Γ.2-14. Η θερμοανθεκτικότητα των *lonp-1* εξαρτάται από τη λειτουργία του *HSF-1* και του *LET-92*. (α) Η επιβίωση των ατόμων *N2* (*wt*) και *lonp-1* στο HS (35° C για 5 ώρες στα *N2* (*wt*) και 7,5 ώρες στα *lonp-1*) κατά την αποσιώπηση του (α) *hsf-1* και του (β) *let-92* μέσω RNAi σίτισης. (γ) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων του HSR σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης (20° C) κατά την αποσιώπηση του *let-92* μέσω RNAi σίτισης σε *wt* και *lonp-1*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Η απόκριση στο θερμικό στρες είναι επίσης απαραίτητη για την προσαρμογή σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία) κατά την οποία ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας (hypoxia-inducible transcription factor, HIF-1) αυξάνει τα μεταγραφικά επίπεδα των πρωτεϊνών *hsp* (Baird et al., 2006). Η αποσιώπηση του γονιδίου *lonp-1* έχει δείξει πως οδηγεί στην ενεργοποίηση μιτοχονδριακών κοκκίων στρες (mitochondrial Stress Granules, mitoSGs) που επάγονται από υποξία, υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (Sun et al., 2023). Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του μονοπατιού της υποξίας από τον HIF-1, ελέγχθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του αναγνωρισμένου μάρτυρα ενεργοποίησης του HIF-1, του γονιδίου *nhf-57* (Bishop et al., 2004; Dues et al., 2016), που βρέθηκαν αυξημένα στα μεταλλάγματα *lonp-1* συγκριτικά με το *N2* (Εικ. Γ.2-15α). Επομένως, διερευνήθηκε η συνεισφορά του μονοπατιού της υποξίας στο θερμικό στρες, χρησιμοποιώντας επιπλέον το γενετικά μεταλλαγμένο στέλεχος για το γονίδιο *hif-1* και το διπλά μεταλλαγμένο *lonp-1;hif-1*. Η απώλεια του *hif-1* στο υπόβαθρο αγρίου τύπου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοανθεκτικότητά του, πιθανώς λόγω ενεργοποίησης αντισταθμιστικών μηχανισμών (Εικ. Γ.2-15β). Αντιθέτως, η θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* είναι ανεξάρτητη του HIF-1, καθώς η επιβίωσή τους δεν επηρεάζεται από την έλλειψή του (Εικ. Γ.2-15β). Συμπληρωματικά, ελέγχθηκε πώς η ενεργοποίηση του HIF-1 μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση στο θερμικό στρες, χρησιμοποιώντας το χλωριούχο κοβάλτιο (II) (CoCl₂) που είναι μιμητικός παράγοντας της υποξίας μέσω ενεργοποίησης του HIF-1 (Hirsilä et al., 2005). Η χορήγηση του CoCl₂ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης του στελέχους *N2* στο θερμικό στρες, αλλά όχι των στελεχών *hif-1*, *lonp-1*, *lonp-1;hif-1* (Εικ. Γ.2-15γ) επιβεβαιώνοντας πως η ενεργοποίηση του HIF-1 δε συμβάλλει στη θερμοανθεκτικότητα του *lonp-1*.



Εικόνα Γ.2-15. Η θερμοανθεκτικότητα των *lnop-1* είναι ανεξάρτητη της δράσης του HIF-1. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου *nhr-57* σε wt και *lnop-1* σκουλήκια. (β) Η επιβίωση των ατόμων N2 (wt) και *lnop-1* στο HS (35° C για 6 ώρες) κατά την απώλεια λειτουργίας του HIF-1 με τη χρήση του στελέχους *hif-1(lof)* και του διπλά μεταλλαγμένου *lnop-1(ko);hif-1(lof)*. (γ) Η επιβίωση των ατόμων N2 (wt) και *lnop-1* στο HS (35° C για 5 ώρες στ υπόβαθρο N2 (wt) και 7,5 ώρες στο υπόβαθρο *lnop-1*) κατά την την απώλεια λειτουργίας του HIF-1. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

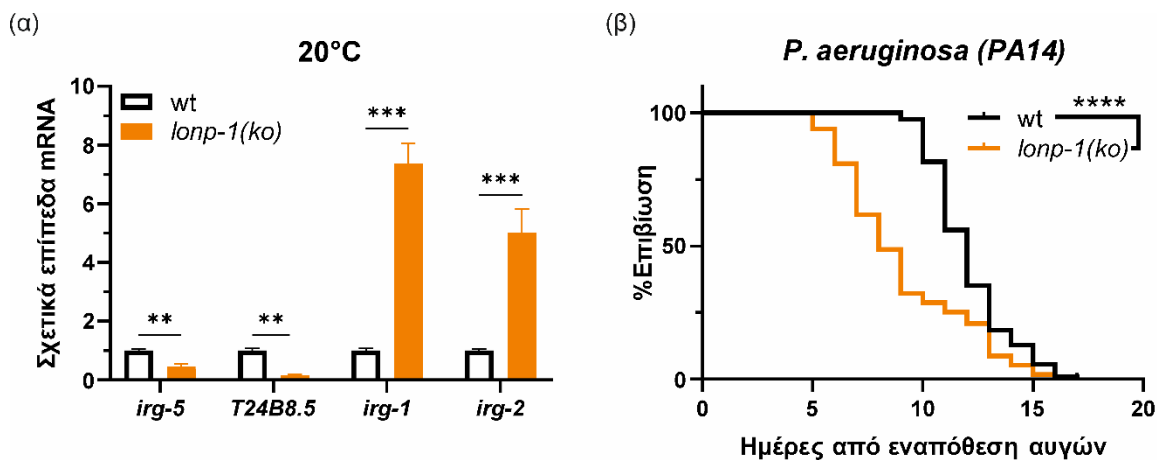
Γ.2.4.4. Η ανοσολογική απόκριση στα μεταλλάγματα *lnop-1* δεν βοηθά στην επιβίωσή τους σε παθογόνο

Η διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, όπως και άλλων βασικών διεργασιών του κυττάρου, όπως π.χ. η μετάφραση, έχει δειχθεί ότι επάγει την απόκριση στην έμφυτη ανοσία του *C. elegans* (Dunbar et al., 2012; Melo & Runkun, 2012). Ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1/ATF5, υπό ήπιο μιτοχονδριακό στρες, επάγει γονίδια που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία του νηματώδους, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στο παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* (Pellegrino et al., 2014). Σε συνθήκες ήπιου μιτοχονδριακού στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας DAF-16/FOXO επίσης συνεισφέρει στην επιβίωση από μόλυνση με *P. aeruginosa*, χωρίς αυτή η ανθεκτικότητα να είναι απαραίτητη για την εξαιρετική μακροβιότητα που παρατηρείται στα στελέχη με ενεργοποιημένο τον DAF-16 (άτομα μεταλλαγμένα για το γονίδιο *daf-2*) (Dues et al., 2019). Ωστόσο το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι της έμφυτης ανοσίας που αποκρίνεται στη μόλυνση από παθογόνο, είναι το εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinase, MAPK) PMK-1/p38 (Hoffmann et al., 1999; Irazoqui et al., 2010; Kimbrell & Beutler, 2001). Το μονοπάτι αυτό στο νηματώδη ορίζεται από τον καταρράκτη φωσφορυλιώσεων των κινασών NSY-1/ASK1 (MAPK κινάση κινάση), SEK-1/MKK3/MKK6 (MAPK κινάση) και PMK-1/p38 (MAPK) (Kim et al., 2002). Ανεξάρτητη από το μονοπάτι PMK-1/p38, κατά τη μόλυνση από παθογόνο επάγεται και μια απόκριση που εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα με μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (bZip) ZIP-2, και είναι απαραίτητη για την ανθεκτικότητα στο *P. Aeruginosa* (Estes et al., 2010). Λόγω του μιτοχονδριακού στρες στο στέλεχος *lnop-1*, ελέγχθηκαν με RT-qPCR τα σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που επάγονται κατά τη μόλυνση από παθογόνο από γνωστά μονοπάτια απόκρισης στη μόλυνση.

Αρχικά εκτιμήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *irg-5* και *T24B8.5*, που είναι στόχοι του PMK-1 (Peterson et al., 2019; Shivers et al., 2010; Troemel et al., 2006; Youngman et al., 2011). Και τα δύο γονίδια εμφανίζουν μειωμένη επαγωγή στο στέλεχος *lnop-1* (Εικ. Γ.2-16α), υποδεικνύοντας πως κατά τη μιτοχονδριακή τους δυσλειτουργία, δεν επάγεται το μονοπάτι της έμφυτης ανοσίας που ορίζεται από τη σηματοδότηση p38/MAPK. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων απόκρισης στη μόλυνση *irg-1*, *irg-2* (Infection Response

Genes) που εξαρτώνται από τον μεταγραφικό παράγοντα ZIP-2 (Dunbar et al., 2012; McEwan et al., 2012) και είναι ικανά να προσδώσουν ανθεκτικότητα στη μόλυνση από το *P. aeruginosa* χωρίς να εξαρτώνται από το μονοπάτι PMK-1/p38 MAPK. Το γονίδιο *irg-1* εκτός από την εξάρτησή του από το ZIP-2, επάγεται και κατά την ενεργοποίηση του UPR^{mt} με ATF5-1-εξαρτώμενο τρόπο (Pellegrino et al., 2014). Και τα δύο αυτά γονίδια επάγονται σημαντικά στο στέλεχος *lonp-1* συγκριτικά με το αγρίου τύπου απουσία παθογόνου, υποδηλώνοντας την επαγωγή του μονοπατιού απόκρισης στην ανοσία που εξαρτάται από το ZIP-2 (Εικ. Γ.2-16α).

Για να ελεγχθεί αν αυτή η ενεργοποίηση γονιδίων της έμφυτης ανοσίας επηρεάζει το στέλεχος *lonp-1*, έγινε έκθεση των στελεχών στο παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa* και παρατηρήθηκε πως το στέλεχος *lonp-1* είναι εξαιρετικά ευαίσθητο συγκριτικά με το αγρίου τύπου N2 (Εικ. Γ.2-16β). Συμπερασματικά, η επαγωγή γονιδίων απόκρισης στη μόλυνση στο στέλεχος *lonp-1* δεν είναι επαρκής για να προσδώσει ανθεκτικότητα, αλλά πιθανώς η επαγωγή τους επηρεάζει διαφορετικές λειτουργίες του νηματώδους.

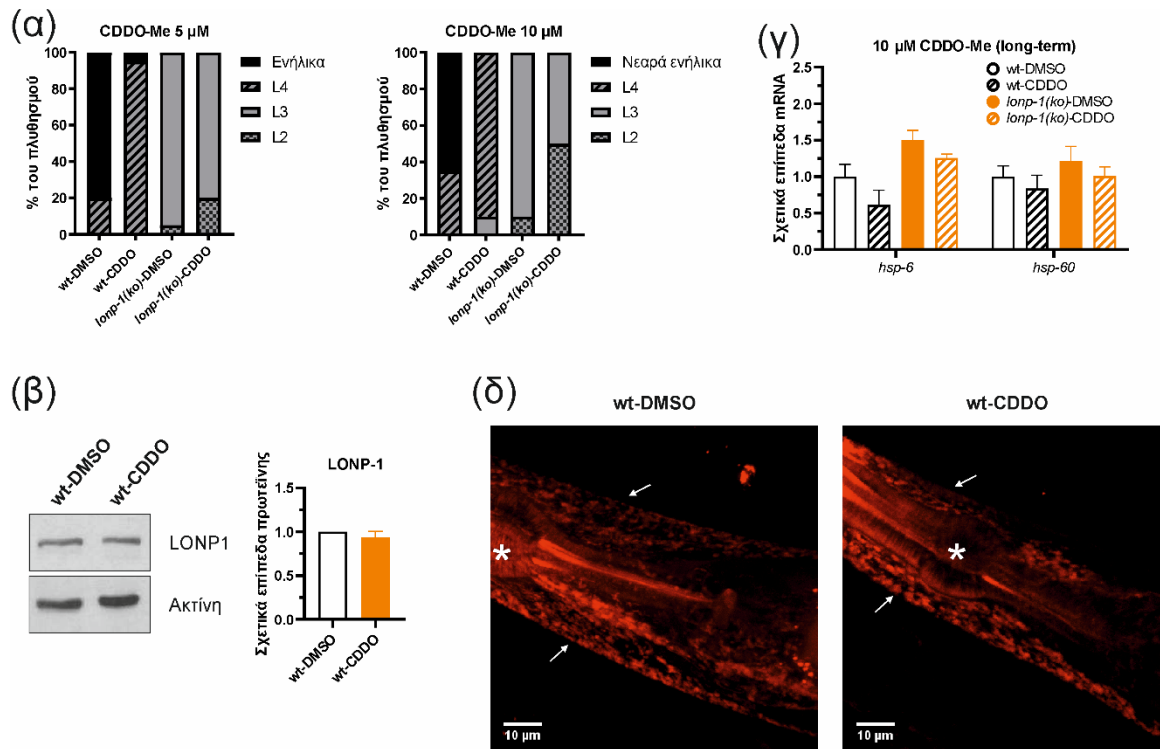


Εικόνα Γ.2-16. Η αυξημένη επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία δεν βοηθούν στην επιβίωση των μεταλλαγμάτων *lonp-1* στη μόλυνση από παθογόνο. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων *irg-5*, T24B8.5 στόχων του PMK-1, και των *irg-1*, *irg-2* στόχων του ZIP-2, σε μία ημέρα wt και *lonp-1* σκουλήκια, απουσία παθογόνου. (β) Η επιβίωση των ατόμων wt και *lonp-1* στο παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa* με τη δοκιμασία αργής θανάτωσης. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Γ.2.4.5. Η φαρμακολογική αναστολή της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της πρωτεάσης LONP-1 επάγει μιτοχονδριακούς και κυτταροπλασματικούς μηχανισμούς διατήρησης της πρωτεόστασης

Έχει αποδειχθεί πως σε ανθρώπινα κύτταρα το συνθετικό τριτερπενοειδές 2-κυανο-3,12-διοξοolean-1,9-διεν-28 οϊκό οξύ (2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid, CDDO) και το πιο γνωστό παράγωγό του, το CDDO μεθυλεστέρας (bardoxolone-methyl, CDDO-Me) δεσμεύουν και αναστέλλουν την πρωτεολυτική δραστηριότητα της ανθρώπινης πρωτεάσης LONP1 (Bernstein et al., 2012). Το CDDO-Me προκαλεί συσσωμάτωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, κατακερματισμό των μιτοχονδρίων, απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Gibellini et al., 2015). Λόγω της υψηλού ποσοστού συντήρησης της πρωτεάσης LON σε νηματώδη και άνθρωπο ελέγχθηκε η επίδραση του αναστολέα CDDO-Me στη φυσιολογία των στελεχών N2 και *lonp-1*. Η δοσοεξαρτώμενη καθυστέρηση στην ανάπτυξη και των δύο στελεχών υποδηλώνει πως η ουσία είναι απορροφήσιμη από τους νηματώδεις από τα πιάτα καλλιέργειας όσο και από το υγρό διάλυμα, και προκαλεί αναπτυξιακή καθυστέρηση ανεξάρτητα της έλλειψης LONP-1 (Εικ. Γ.2-17α). Με τη χορήγηση CDDO-Me δεν φάνηκε επίσης να επηρεάζονται τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης LONP-1 στο στέλεχος αγρίου τύπου N2 (Εικ. Γ.2-17β). Για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, η χορήγηση του CDDO-Me

έγινε είτε από το τέλος του τέταρτου προνυμφικού σταδίου για 24 ώρες (βραχυπρόθεσμη χορήγηση, short-term) είτε από την ημέρα εναπόθεσης των αυγών μέχρι πρώτης ημέρας ενηλικίωσης (μακροπρόθεσμη χορήγηση, long-term). Η μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει το UPR^{mt}, καθώς δεν παρατηρείται επαγωγή της σχετικής έκφρασης των γονιδίων μαρτύρων *hsp-6* και *hsp-60* σε κανένα στέλεχος (Εικ. Γ.2-17γ). Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, το CDDO-Me δεν προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία και δυναμικό των μιτοχονδρίων του στελέχους N2, όπως αξιολογήθηκε με τη χρωστική MitoTracker Red (Εικ. Γ.2-17δ).

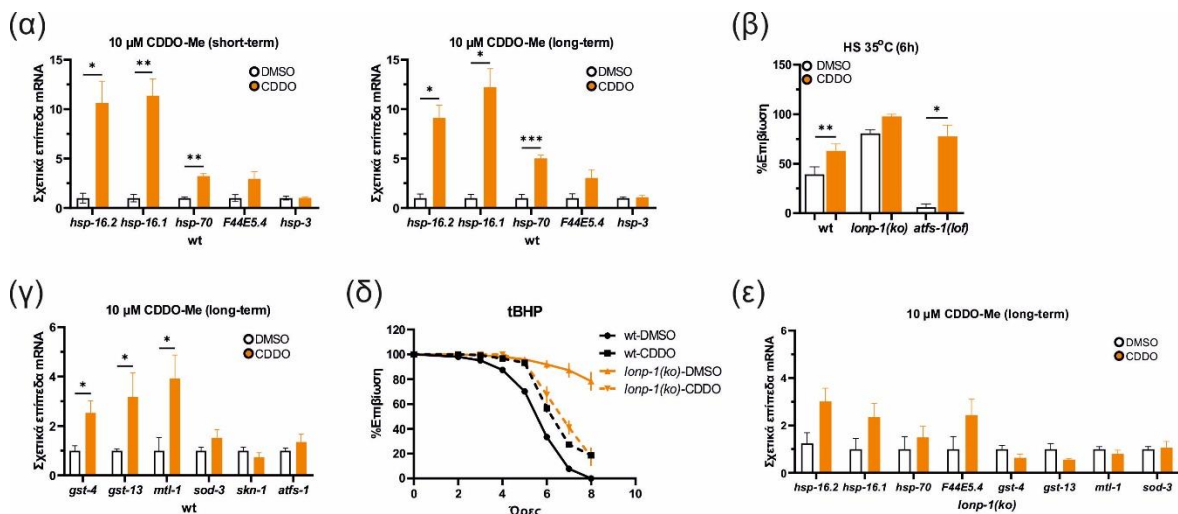


Εικόνα Γ.2-17. Η αναστολή της πρωτεολυτικής δράσης της LONP-1 με το CDDO-Me επηρεάζει την ανάπτυξη των ατόμων χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης ή τη μιτοχονδριακή μορφολογία. (α) Η ανάπτυξη των ατόμων N2 (wt) και *lonp-1* κατά τη χορήγηση CDDO-Me (5 μM και 10 μM). **(β)** Ανάλυση Western blot με ανθρώπινο αντίσωμα για LONP-1 και β-ακτίνη ως control σε N2(wt) στελέχη κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. Για την αξιολόγηση της σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το μη συζευγμένο t-test (*p*-value). **(γ)** Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των μαρτύρων ενεργοποίησης του UPR^{mt} *hsp-6* και *hsp-60* σε wt και *lonp-1* σκουληκία κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value). **(δ)** Αντιπροσωπευτικές confocal μικροσκοπίες από χρώση μιτοχονδρίων *C. elegans* με τη φθορίζουσα χρωστική Mitotracker Red CMXRos σε άτομα N2 (wt) κατά τη χορήγηση CDDO-Me και DMSO ως control. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν το φυσιολογικό μιτοχονδριακό δίκτυο και ο αστερίσκος το φάρυγγα του ζώου.

Αντίθετα, η ανάλυση με RT-qPCR των σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων που επάγονται από θερμικό στρες, δείχνει ισχυρή επαγωγή των μικρών *hsp* και *hsp-70*, και στις δύο συνθήκες χορήγησης CDDO-Me στο αγρίου τύπου στέλεχος N2 (Εικ. Γ.2-18α). Το CDDO-Me δεν επάγει το *hsp-3*, ένα γονίδιο μάρτυρα του UPR^{ER} (Εικ. Γ.2-18α). Η μακροπρόθεσμη χορήγηση του CDDO-Me στο στέλεχος *lonp-1* επιφέρει μία αύξηση αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό των σχετικών επιπέδων των μικρών *hsp* και *hsp-70* γονιδίων, υποδηλώνοντας πως το CDDO-Me επηρεάζει κάπως την έκφραση αυτών των γονιδίων και ανεξάρτητα της έλλειψης LONP-1 (Εικ. Γ.2-18ε). Όμως, η χορήγηση CDDO-Me οδηγεί σε αυξημένη θερμοανθεκτικότητα του στελέχους N2 χωρίς να αυξάνει περαιτέρω την θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* (Εικ. Γ.2-18β). Η θερμοανθεκτικότητα που προσφέρει το

CDDO-Me είναι ανεξάρτητη του ATFS-1, όπως δείχθηκε στο στέλεχος με απώλεια λειτουργίας του ATFS-1 (*atfs-1(gk3094)*) (Εικ. Γ.2-18β).

Το CDDO-Me έχει συνδεθεί και με την πιθανή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 (ανθρώπινο ομόλογο του SKN-1 στο *C. elegans*) και των στόχων του (Dinkova-Kostova et al., 2005; Sporn et al., 2011; Yates et al., 2007). Πράγματι, η μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me στο στέλεχος N2 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων της αντιοξειδωτικής απόκρισης στο στρες, όπως τα γονίδια-στόχοι του SKN-1 *gst-4* και *gst-13* (Εικ. Γ.2-18γ). Αυτή η ανοδική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων δεν παρατηρείται στο στέλεχος *lonp-1* (Εικ. Γ.2-18ε), υποστηρίζοντας πως η ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι πιθανό να προκαλείται από την ανασταλτική λειτουργία του CDDO-Me στη λειτουργία της LONP-1. Ως υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, η χορήγηση του CDDO-Me αυξάνει την επιβίωση του στελέχους N2, αλλά όχι του *lonp-1*, στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το χημικό tBHP (Εικ. Γ.2-18δ).

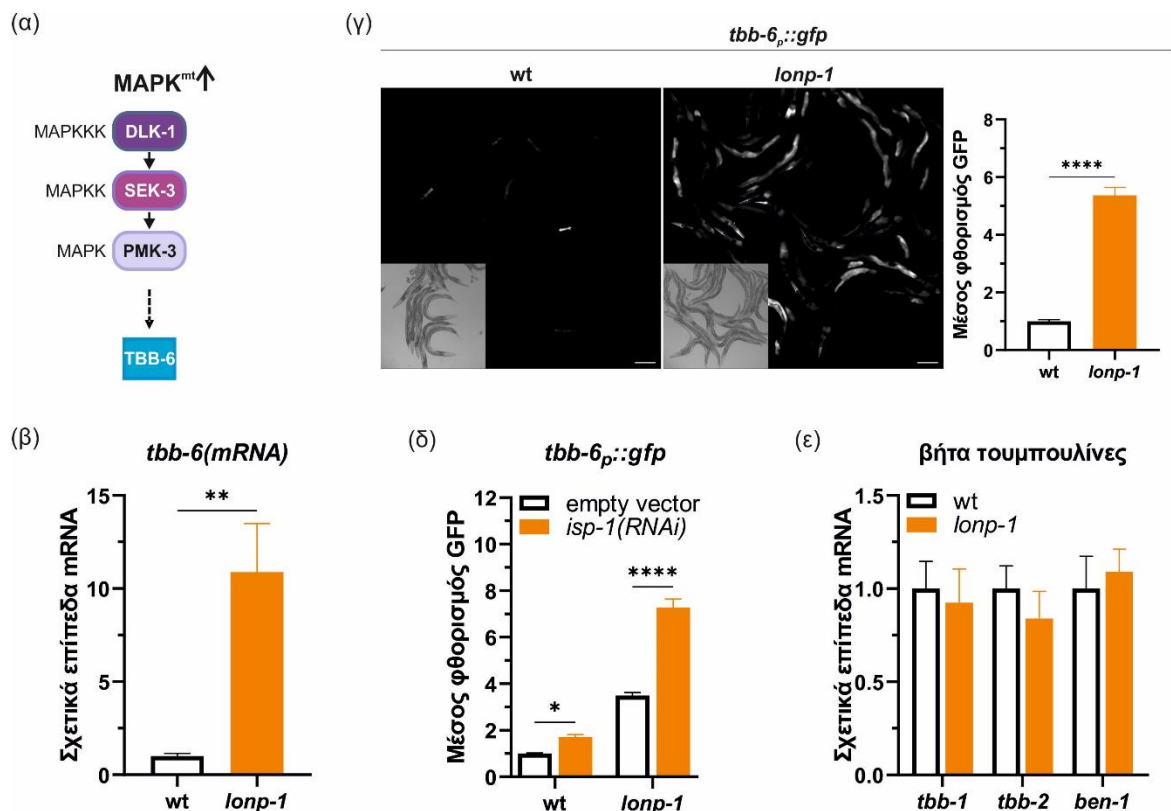


Εικόνα Γ.2-18. Η χορήγηση του CDDO-Me ενεργοποιεί την απόκριση στο θερμικό στρες και την αντιοξειδωτική απόκριση. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων του HSR και των γονιδίων που σχετίζονται με το UPR^{ER} , σε wt σκουλήκια κατά τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. (β) Η επιβίωση των ατόμων N2 (wt), *lonp-1* και *atfs-1(lof)* στο HS (35° C για 6 ώρες) κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. (γ) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων της αντιοξειδωτικής απόκρισης (AR) σε wt σκουλήκια κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. (δ) Η επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από tBHP (10 mM) των ατόμων wt και *lonp-1* κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. (ε) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων του HSR, UPR^{ER} και AR σε *lonp-1* σκουλήκια κατά τη μακροπρόθεσμη χορήγηση CDDO-Me 10 μM. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως, σε αντίθεση με την απώλεια του γονιδίου *lonp-1*, η αναστολή της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της LONP-1 με το CDDO-Me δεν είναι ικανή να ενεργοποιήσει το UPR^{mt} στο *C. elegans*. Ωστόσο, η χορήγηση του CDDO-Me ενεργοποιεί την απόκριση στο θερμικό στρες και την αντιοξειδωτική απόκριση στο στέλεχος αγρίου τύπου, αλλά όχι στο στέλεχος *lonp-1*, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο της πρωτεολυτικής λειτουργίας της πρωτεάσης LONP-1 στην επικοινωνία των επαγόμενων μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών μηχανισμών διατήρησης της πρωτεόστασης.

Γ.2.5. Ενεργοποίηση του μιτοχondριακού p38/ MAPK μέσω του σηματοδοτικού καταρράκτη κινασών DLK-1/SEK-3/PMK-3

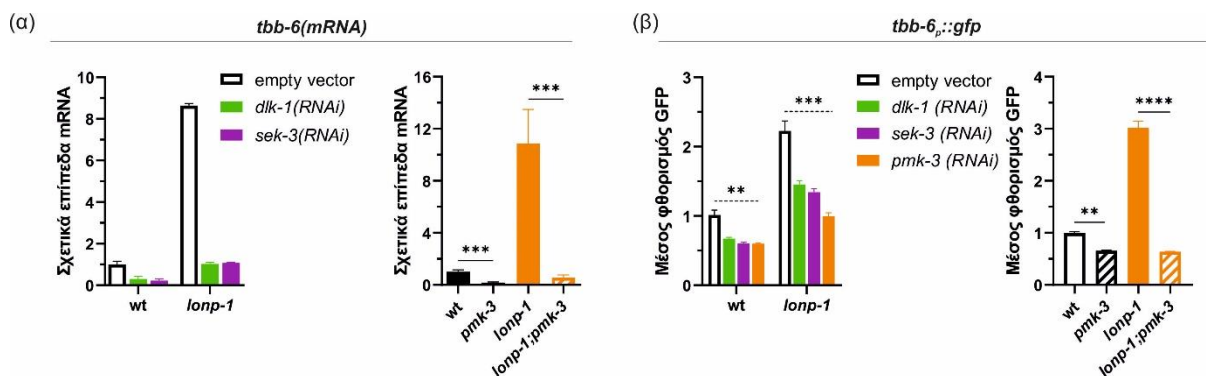
Σε συνθήκες διατάραξης της μιτοχondριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων λόγω έλλειψης του γονιδίου *isp-1* και της επακόλουθης μιτοχondριακής δυσλειτουργίας, έχει δειχθεί η ενεργοποίηση ενός μιτοχondριακού μονοπατιού p38/MAPK (mitochondrial MAPK, MAPK^{mt}) (Munkacsy et al., 2016). Αυτό διαφέρει από το κανονικό PMK-1/p38 MAPK (canonical p38 MAPK) που επάγεται κατά την ανοσολογική απόκριση, και αποτελείται από τον σηματοδοτικό καταρράκτη MAP κινασών DLK-1/SEK-3/PMK-3 (Munkacsy et al., 2016). Το γονίδιο μάρτυρα του μονοπατιού είναι το *tbb-6* (Munkacsy et al., 2016), που κωδικοποιεί για ένα μέλος της οικογένειας των βήτα τουμπουλινών στο *C. elegans* (Hurd, 2018), και του οποίου ο ρόλος δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί (Εικ. Γ.2-19α). Τα επίπεδα mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος *lonp-1* συγκριτικά με το N2 (Εικ. Γ.2-19β). Αντίστοιχα, τα διαγονιδιακά άτομα που εκφράζουν GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *tbb-6* (*tbb-6_p::gfp*) στο γενετικό υπόβαθρο *lonp-1* έχουν στατιστικά σημαντικά αυξημένο φθορισμό στο έντερο και τους φαρυγγικούς μύες συγκριτικά με τα N2 (Εικ. Γ.2-19γ). Η διατάραξη της αναπνευστικής αλυσίδας μέσω αποσίωσης του *isp-1* αυξάνει περαιτέρω τον φθορισμό του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* στο στέλεχος *lonp-1*, υποδηλώνοντας προσθετική μιτοχondριακή δυσλειτουργία από την απώλεια των δύο γονιδίων για την επαγωγή του μάρτυρα (Εικ. Γ.2-19δ). Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *tbb-1*, *tbb-2* και *ben-1* της οικογένειας των βήτα τουμπουλινών του *C. elegans*, κανένα από τα οποία δεν έχει διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ στελεχών N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-19ε), επιβεβαιώνοντας τον εξειδικευμένο ρόλο του TBB-6 κατά τη μιτοχondριακή δυσλειτουργία.



Εικόνα Γ.2-19. Η επαγωγή του μάρτυρα *tbb-6* στα μεταλλάγματα *lonp-1*. (α) Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού MAPK^{mt} αποτελούμενο από τον καταρράκτη φωσφορυλιώσεων των κινασών DLK-1/SEK-3/PMK-3 και το γονίδιο στόχο του μονοπατιού *tbb-6*. (β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας και ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1*. (γ) Η ποσοτικοποίηση των

σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε *wt* και *lonp-1* σκουλήκια. (δ) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα *wt* και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση του γονιδίου *isp-1* μέσω RNAi σίτισης. (ε) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA τριών βήτα τουμπουλινών σε *wt* και *lonp-1* σκουλήκια. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *tbb-6* αλλά και του μάρτυρα μειώνονται σημαντικά έπειτα από αποσιώπηση των *dlk-1*, *sek-3* με RNAi ή απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *pmk-3* στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-20). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK^{mt} στο στέλεχος *lonp-1*, και πως η σηματοδότηση του MAPK^{mt} ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε φυσιολογικές συνθήκες (βασική έκφραση γονιδίων στο N2) όσο και επαγόμενες συνθήκες (μιτοχονδριακού στρες).



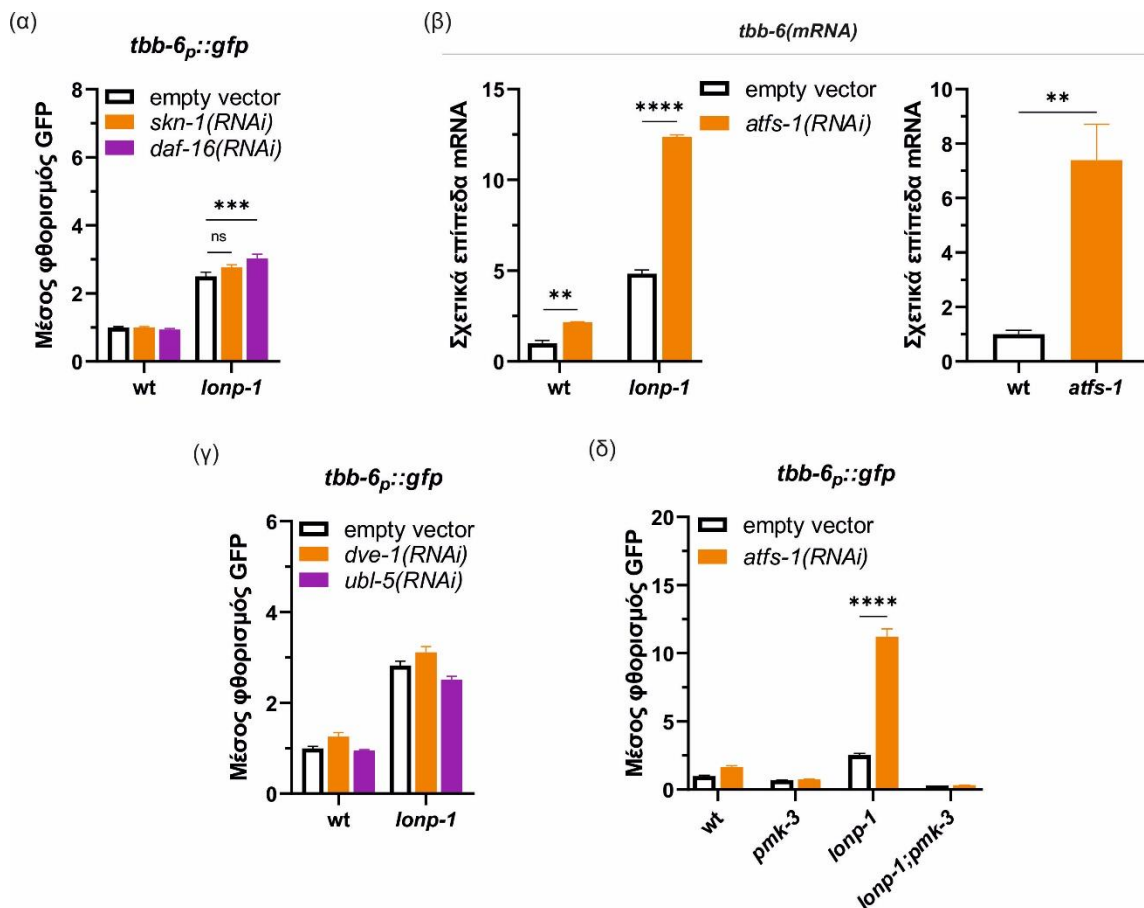
Εικόνα Γ.2-20. Η ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού MAPK (MAPK^{mt}) μέσω του καταρράκτη κινασών DLK-1/SEK-3/PMK-3 στα μεταλλάγματα *lonp-1*. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε *wt* και *lonp-1* σκουλήκια κατά αποσιώπηση των γονιδίων *dlk-1*, *sek-3* μέσω RNAi σίτισης ή κατά την έλλειψη του *pmk-3*. (β) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα *wt* και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση των γονιδίων *dlk-1*, *sek-3*, *pmk-3* μέσω RNAi σίτισης ή κατά την έλλειψη του *pmk-3*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Γ.2.5.1. Η ενεργοποίηση του ATFS-1 αναστέλλει το μονοπάτι MAPK^{mt}

Στις προηγούμενες ενότητες αποδείχθηκε πως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την απώλεια της LONP-1 προκαλεί την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων απόκρισης στο στρες όπως ο ATFS-1/ATF5, ο SKN-1/NRF και ο DAF-16/FOXO. Διευρενήθηκε πώς η ενεργοποίηση αυτών των παραγόντων μπορεί να αλληλεπιδρά με το μονοπάτι MAPK^{mt}. Καθώς ο υποκινητής του γονιδίου-μάρτυρα της ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK^{mt}, *tbb-6*, περιέχει προβλεπόμενες θέσεις δέσμησης για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες SKN-1 και DAF-16 (WormBase version WS289), ελέγχθηκε η επαγωγή του *tbb-6* υπό συνθήκες αποσιώπησης τους. Το RNAi μέσω σίτισης των γονιδίων *skn-1* ή *daf-16* δεν μειώνει ούτε τα επίπεδα φθορισμού του μάρτυρα στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-21α), υποδεικνύοντας πως οι παράγοντες αυτοί δεν έχουν ρόλο στην επαγωγή του *tbb-6* στο στέλεχος *lonp-1*. Ωστόσο η αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1 οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της επαγωγής του γονιδίου *tbb-6* στο γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-21β). Αυτό επιβεβαιώθηκε και κατά την απώλεια λειτουργίας του ATFS-1 με το στέλεχος *atfs-1(gk3094)*, το οποίο εμφανίζει σημαντικά αυξημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *tbb-6* συγκριτικά με το αγρίου τύπου (Εικ. Γ.2-21β).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν πως ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1 αναστέλλει τη δραστηριότητα του μονοπατιού MAPK^{mt} σε φυσιολογικές και μιτοχονδριακού στρες συνθήκες, όπως αυτό που προκαλεί η απώλεια της LONP-1, αντίστοιχα με τη μελέτη που έχει γίνει στο

μεταλλαγμένος στέλεχος *isp-1* (Munkacsy et al., 2016). Μία πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε πως το UPR^{mt} παρεμποδίζει τη δραστηριότητα του MAPK^{mt} (Tjahjono et al., 2020), ωστόσο η αποσιώπηση των παραγόντων DVE-1, UBL-5 που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του UPR^{mt} συνεργατικά με τον ATFS-1, δε δείχνει διαφορά στην επαγωγή του μάρτυρα στα στελέχη αγρίου τύπου N2 ή *lonp-1* (Εικ. Γ.2-21γ). Επομένως ο ATFS-1 καταστέλλει την ενεργοποίηση του MAPK^{mt} ανεξάρτητα από το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι του UPR^{mt}. Η κατασταλτική λειτουργία του ATFS-1 στην επαγωγή του *tbb-6* συμβαίνει αναρροϊκά της λειτουργίας της κινάσης PMK-3, καθώς η αποσιώπηση του *atfs-1* στα μεταλλαγμένα στελέχη *pmk-3*, *lonp-1;pmk-3* δεν μπόρεσε να αυξήσει το φθορισμό του μάρτυρα *tbb-6::gfp* (Εικ. Γ.2-21δ).



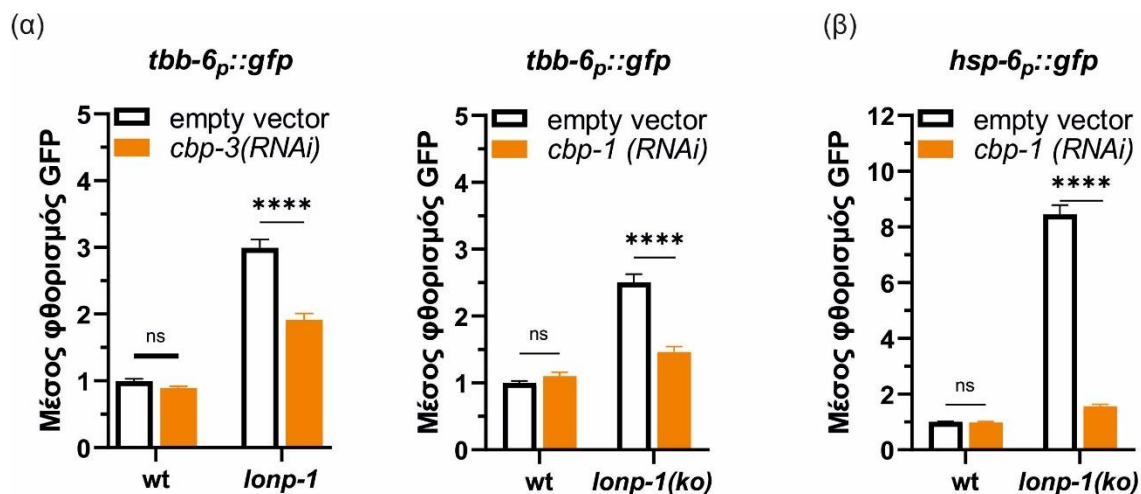
Εικόνα Γ.2-21 Η δράση του ATFS-1 αναστέλλει την ενεργοποίηση του MAPK^{mt}. (α) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση των γονιδίων *skn-1*, *daf-16* μέσω RNAi σίτισης. (β) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε wt και *lonp-1* σκουλήκια κατά αποσιώπηση του γονιδίου *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης ή σε wt και *atfs-1(lof)* σκουλήκια. (γ) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση των γονιδίων *dve-1*, *ubl-5* μέσω RNAi σίτισης. (δ) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση του γονιδίου *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης και την ταυτόχρονη έλλειψη του γονιδίου *pmk-3*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Γ.2.5.2. Ο ATFS-1 αναστέλλει την επαγωγή του *cbp-3* στο στέλεχος *lonp-1*

Η επαγωγή του *tbb-6* κατά τη διατάραξη της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων έχει βρεθεί πως εξαρτάται από τη λειτουργία του γονιδίου *cbp-3/F40F12.7*, ένα ομόλογο της ακετυλοτρανσφεράσης CBP/p300 στα θηλαστικά (Munkacsy et al., 2016). Ωστόσο το *cbp-3* είναι

πιθανώς ένα ψευδογονίδιο του *cbp-1* (CREB-binding protein-1), καθώς η πρωτεΐνη CBP-3 φέρει μόνο την περιοχή αλληλεπίδρασης επαγόμενη από κινάσες KIX (kinase-inducible domain (KID) interacting domain, KIX) αλλά όχι την περιοχή ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης HAT (histone acetyl-transferase, HAT) της πρωτεΐνης CBP-1 (Li et al., 2021). Η αποσιώπηση του *cbp-1* προκαλεί ισχυρό φαινότυπο στα στελέχη αγρίου τύπου N2 και *lonp-1* καθυστερώντας την ανάπτυξη τους, ενώ η αποσιώπηση του *cbp-3* δεν προκαλεί κάποιον εμφανή φαινότυπο στην ανάπτυξη των σκουληκιών. Η αποσιώπηση και των δυο CBP παραγόντων όμως, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού του μάρτυρα *tbb-6p::gfp* στο στέλεχος *lonp-1* (Ει. Γ.2-22α), υποστηρίζοντας τον ρόλο όχι μόνο του CBP-3, αλλά και του CBP-1 στην επαγωγή του *tbb-6* στο στέλεχος *lonp-1*. Πιθανώς η περιοχή KIX που είναι παρούσα και στους δύο CBP παράγοντες CBP-1, CBP-3 να έχει ρόλο στην ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK^{mt}. Για να αποκλειστούν πιθανά αναπτυξιακά προβλήματα που μπορεί να επηρεάσουν την επαγωγή του *tbb-6*, η αποσιώπηση του *cbp-1* δεν έγινε από την ημέρα εναπόθεσης των αυγών, αλλά από το προνυμφικό στάδιο L4 για 24 ώρες μέχρι την ενηλικίωση.

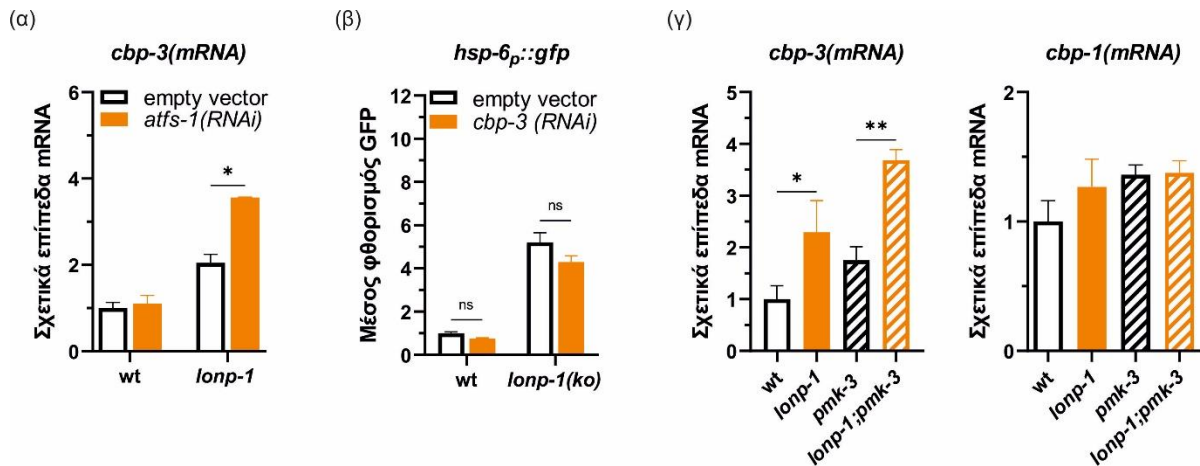
Ο CBP-1 ρυθμίζει τη δραστηριότητα του ATFS-1 μέσω ακετυλίωσης των ιστονών στους γονιδιακούς τόπους (*loci*) των γονιδίων του UPR^{mt}, συνεισφέροντας στην μεταγραφική αυξορρυθμισή τους υπό διαφορετικούς τύπους μιτοχονδριακού στρες (Li et al., 2021). Αυτό επιβεβαιώθηκε καθώς η επαγωγή του *hsp-6p::gfp*, του μάρτυρα ενεργοποίησης του UPR^{mt}, μειώνεται σημαντικά κατά την αποσιώπηση του *cbp-1* στο προνυμφικό στάδιο L4 για 24 ώρες στο στέλεχος *lonp-1* (Εικ. Γ.2-22β), παρόμοια με την αποσιώπηση του *atfs-1* (§ Γ.2.1). Με τον τρόπο αυτό, αποδεικνύεται η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης του *cbp-1* και μετά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Επομένως η δραστηριότητα του CBP-1 είναι απαραίτητη για την πρόσβαση του ATFS-1 στους γονιδιακούς τόπους που ενεργοποιούν το UPR^{mt}, αλλά όχι για αυτούς που καταστέλλουν το MAPK^{mt}.



Εικόνα Γ.2-22. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης CBP-1 και CBP-3 απαιτούνται για την ενεργοποίηση του MAPK^{mt} στα *lonp-1*. (α) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση των γονιδίων *cbp-3* και *cbp-1* μέσω RNAi σίτισης. (β) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα ενεργοποίησης του UPR^{mt}, *hsp-6p::gfp*, σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση του γονιδίου *cbp-1* μέσω RNAi σίτισης. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο CBP-3 είναι πιθανός στόχος του ATFS-1 (Nargund et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη, φαίνεται πως η αποσιώπηση του *atfs-1* αυξάνει τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *cbp-3* στο στέλεχος *lonp-1* (Εικ. Γ.2-23α), παρόμοια με την επίδραση που έχει η αποσιώπηση του *atfs-1* στην επαγωγή του *tbb-6* (§ Γ.2.5.1). Συμπληρωματικά, η αποσιώπηση του

cbp-3 δε μειώνει την επαγωγή του μάρτυρα του UPR^{mt} στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-23β) συμπεραίνοντας πως ο CBP-3 δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση του ATFS-1, ίσως λόγω έλλειψης της περιοχής HAT. Επιπλέον, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *cbp-3*, αλλά όχι του *cbp-1*, εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα στο στέλεχος *lonp-1*, ανεξάρτητα από την απώλεια ή μη του *pmk-3* (Εικ. Γ.2-23γ). Επομένως, η κατασταλτική λειτουργία του ATFS-1 στο MAPK^{mt} εκτείνεται και στον CBP-3, τοποθετώντας τον αναρροϊκά της σηματοδότησης PMK-3/TBB-6.

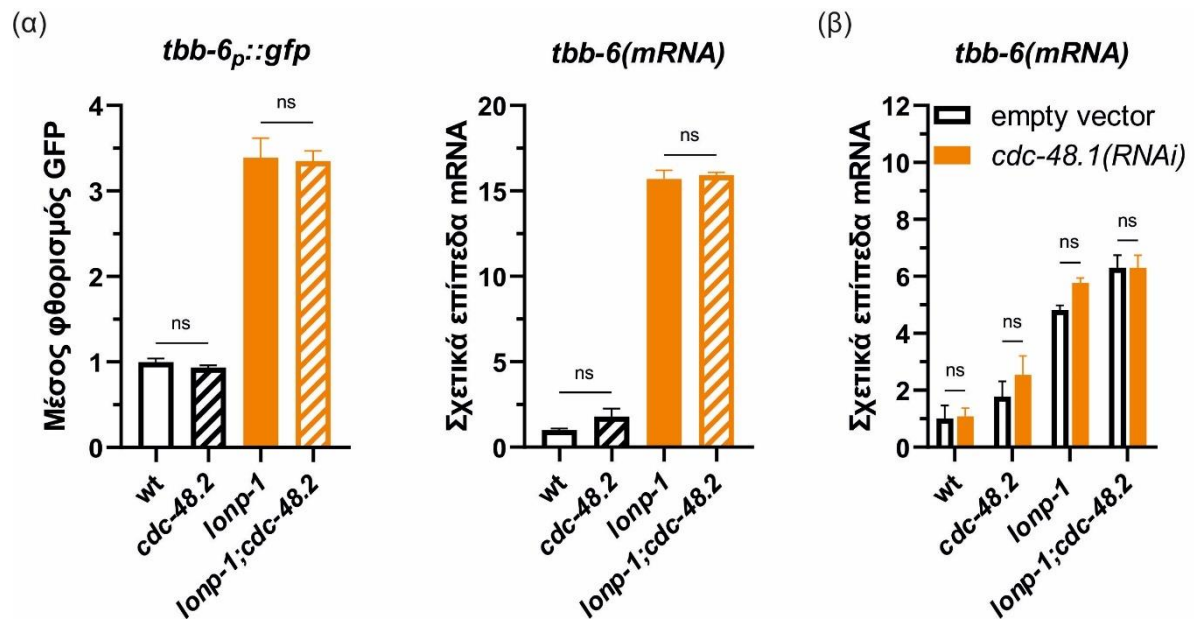


Εικόνα Γ.2-23. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *cbp-3* καταστέλλονται από τον ATFS-1 στα μεταλλάγματα *lonp-1*. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *cbp-3* σε wt και *lonp-1* σκουληκία κατά αποσιώπηση του γονιδίου *atfs-1* μέσω RNAi σίτισης. (β) Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6p::gfp* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την αποσιώπηση του γονιδίου *cbp-3* μέσω RNAi σίτισης. (γ) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων *cbp-3* και *cbp-1* σε wt και *lonp-1* σκουληκία κατά την έλλειψη του γονιδίου *pmk-3*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Γ.2.5.3. Το μονοπάτι MAD δεν απαιτείται για την επαγωγή του MAPK^{mt} στο στέλεχος *lonp-1*

Η μιτοχονδριακή λειτουργία έχει βρεθεί πως ενεργοποιεί και το μιτοχονδριακό μονοπάτι αποικοδόμησης (mitochondria-associated degradation, MAD) (Wu et al., 2016), η λειτουργικότητα του οποίου είναι απαραίτητη για την επαγωγή του μάρτυρα *tbb-6p::gfp* σε συνθήκες διαταραγμένης αναπνευστικής αλυσίδας (στέλεχος *isp-1*) του *C. elegans* (Munkacsy et al., 2016). Το μονοπάτι MAD δρα υπό μιτοχονδριακό στρες στα μιτοχόνδρια ανάλογα με το μονοπάτι ERAD στο ενδοπλασματικό δίκτυο και οδηγεί τις ουβικουτινωμένες πρωτεΐνες από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (MOM) στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Liao et al., 2020). Έχει βρεθεί πως το CBP-3 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ουβικουτινίνωση πρωτεϊνών όπως οι F57C12.2 (Li et al., 2004; Zhong & Sternberg, 2006) και UBQ-1 (Koyuncu et al., 2021), οπότε είναι πιθανό το CBP-3 να δρα με το μονοπάτι MAD για την ενεργοποίηση του MAPK^{mt} στο στέλεχος *lonp-1*. Οι AAA⁺ ATPάσες CDC-48.1 και CDC-48.2 στο *C. elegans* είναι ορθόλογες της υψηλά συντηρημένης ATPάσης CDC48/p97 στα θηλαστικά και είναι μέρος του συμπλέγματος που οδηγεί τις ουβικουτινωμένες πρωτεΐνες για αποικοδόμηση (Heo et al., 2010; Hirsch et al., 2009; Xu et al., 2011). Το μεταλλαγμένο στέλεχος για το γονίδιο *cdc-48.2(tm659)* διασταυρώθηκε με το στέλεχος *lonp-1* και το διαγονιδιακό στέλεχος *tbb-6p::gfp*, για τον έλεγχο της επαγωγής του γονιδίου μάρτυρα της ενεργοποίησης του MAPK^{mt}. Η απώλεια του *cdc-48.2* δε μειώνει την επαγωγή του μάρτυρα ή του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-24α). Συμπληρωματικά, ούτε η αποσιώπηση του *cdc-48.1* με RNAi μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του *tbb-6* στα στελέχη N2 και *lonp-1* ούτε κατά την ταυτόχρονη απώλεια του *cdc-48.2* (Εικ. Γ.2-24β). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η ενεργότητα του

μονοπατιού MAD δεν είναι προαπαιτούμενο για την ενεργοποίηση του MAPK^{mt} στο στέλεχος *lonp-1*, και πως το CBP-3 δεν επηρεάζει τη σηματοδότηση PMK-3/TBB-6 μέσω του μονοπατιού MAD.



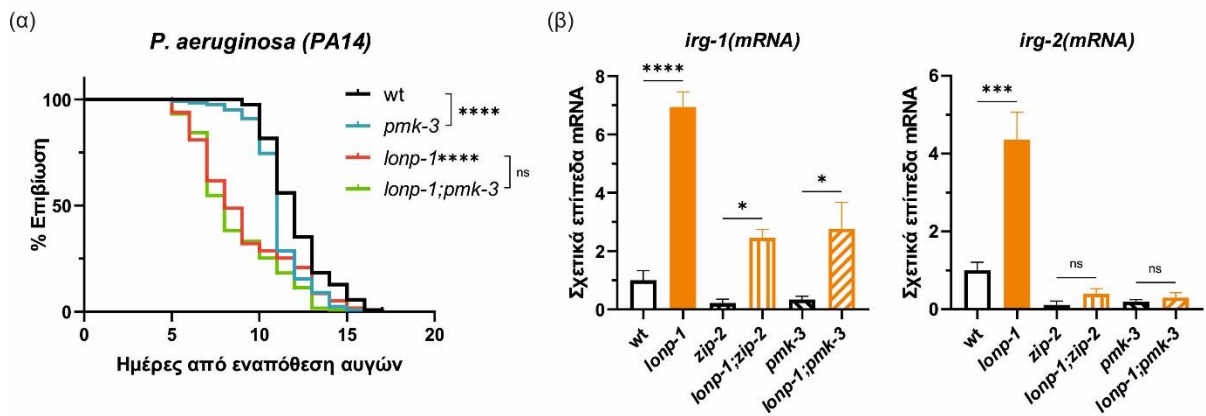
Εικόνα Γ.2-24 Το σύμπλοκο CDC-48.1/CDC-48.2 δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση του MAPK^{mt}. Η ποσοτικοποίηση (α) του φορτισμού GFP του μάρτυρα *tbb-6_p::gfp* και (β) των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την έλλειψη του γονιδίου *cdc-48.2*. (γ) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε μίας ημέρας ενήλικα wt και *lonp-1* κατά την έλλειψη του γονιδίου *cdc-48.2* και την ταυτόχρονη αποσιώπηση του γονιδίου *cdc-48.1* μέσω RNAi σίτισης. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Γ.2.5.4. Η κινάση PMK-3 απαιτείται για την επαγωγή των γονιδίων ανοσίας στο στέλεχος *lonp-1*

Στο στέλεχος *lonp-1* παρατηρείται η επαγωγή αρκετών γονιδίων απόκρισης στη μόλυνση που εξαρτώνται από την ενεργότητα του ATFS-1 και του ZIP-2. Η επαγωγή αυτή όμως δεν είναι επαρκής για να προσδώσει ανθεκτικότητα στη μόλυνση από το παθογόνο *P. aeruginosa*, αφού αντιθέτως, το στέλεχος *lonp-1* είναι πιο ευπαθές στη μόλυνση από το στέλεχος αγρίου τύπου N2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προηγούμενων ενοτήτων, ο ATFS-1 καταστέλλει τη λειτουργία του μονοπατιού MAPK^{mt}, το οποίο επίσης είναι ενεργοποιημένο στο στέλεχος *lonp-1*, και δε γνωρίζουμε πολλά πράγματα για τη φυσιολογική του δράση στον οργανισμό. Δεδομένου του ρόλου του PMK-1/p38 στην έμφυτη ανοσία και το γεγονός πως τα γονίδια *pmk-1* και *pmk-3* εδράζονται στο ίδιο οπερόνιο, το PMK-3 είναι πιθανό να επιτελεί αντίστοιχες / συμπληρωματικές λειτουργίες. Αν ο ATFS-1 ενεργοποιεί την απόκριση στην έμφυτη ανοσία μέσω καταστολής του MAPK^{mt}, τότε η απώλεια του *pmk-3* θα μπορεί να αποκαταστήσει την ευαισθησία του στελέχους *lonp-1* στο παθογόνο. Η απώλεια του *pmk-3* όμως δεν επηρεάζει την επιβίωση του *lonp-1* στο παθογόνο αλλά αυξάνει την ευαισθησία του στελέχους N2 (Εικ. Γ.2-25α). Επομένως η κινάση PMK-3 απαιτείται για την επιβίωση των αγρίου τύπου σκουληκιών στο *P. aeruginosa*.

Τα επίπεδα έκφρασης όμως των *irg-1* και *irg-2*, που εξαρτώνται από τον μεταγραφικό παράγοντα ZIP-2, αλλά όχι από την κινάση PMK-1, μειώνονται σημαντικά κατά την απώλεια του *pmk-3* κατά αντίστοιχο τρόπο με την απώλεια του *zip-2* στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-25β). Επομένως η επαγωγή των στόχων του ZIP-2 στο στέλεχος *lonp-1* απαιτεί τη λειτουργικότητα του PMK-3, υποδηλώνοντας πιθανή αλληλεπίδραση των PMK-3 και ZIP-2 για τον έλεγχο της δραστηριότητας του

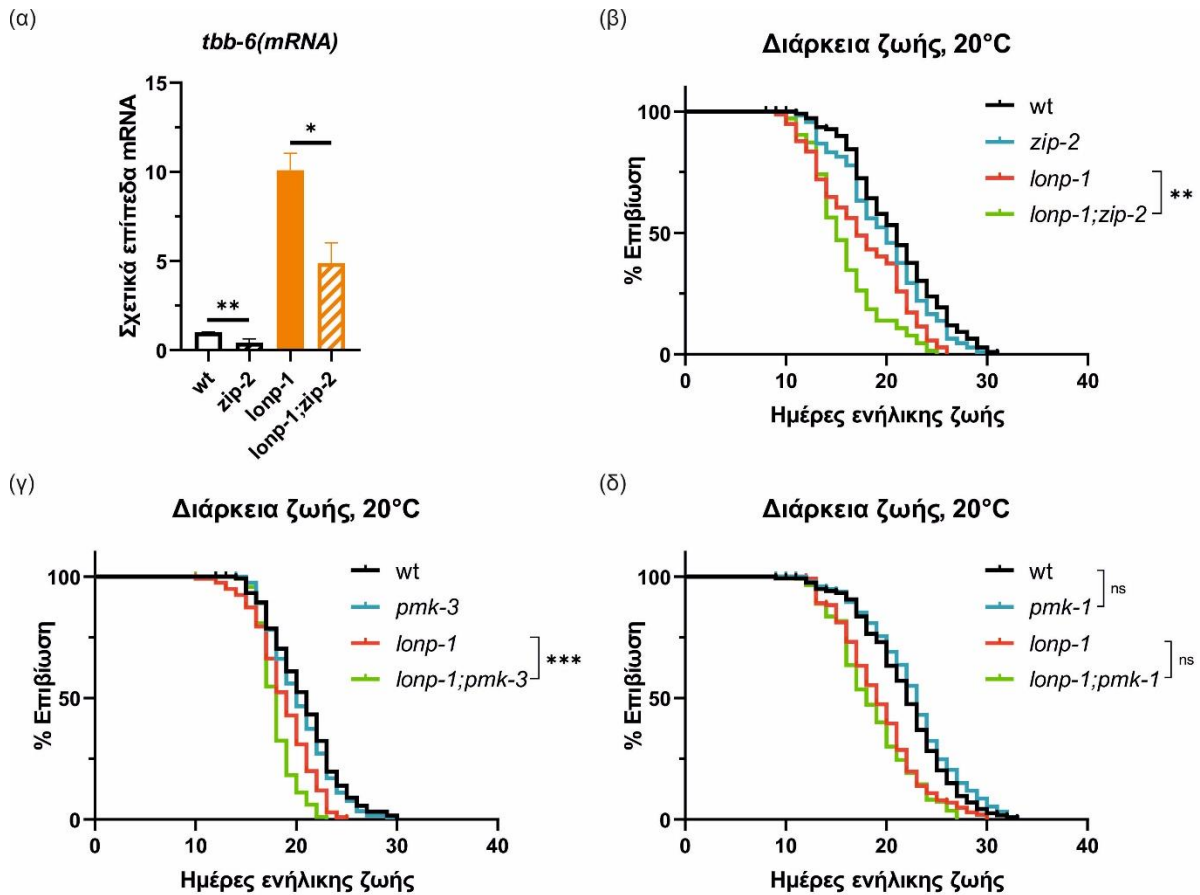
ZIP-2 σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο. Η αυξημένη δραστηριότητα του ZIP-2 μπορεί να μη δρα ευεργετικά στην επιβίωση σε παθογόνο, αλλά ίσως επηρεάζει διαφορετικές λειτουργίες του νηματώδους.



Εικόνα Γ.2-25. Η PMK-3-εξαρτώμενη επαγωγή των γονιδίων-στόχων του ZIP-2 δεν προσφέρει ανθεκτικότητα στο παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa*. (α) Η επιβίωση των ατόμων wt και *lonp-1* κατά την έλλειψη του γονιδίου *pmk-3* στο παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa* με τη δοκιμασία αργής θανάτωσης. (β) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων *irg-1* και *irg-2*, στόχων του ZIP-2, σε μίας ημέρας wt και *lonp-1* σκουλήκια κατά την έλλειψη του γονιδίου *zip-2* ή *pmk-3*, απουσία παθογόνου. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

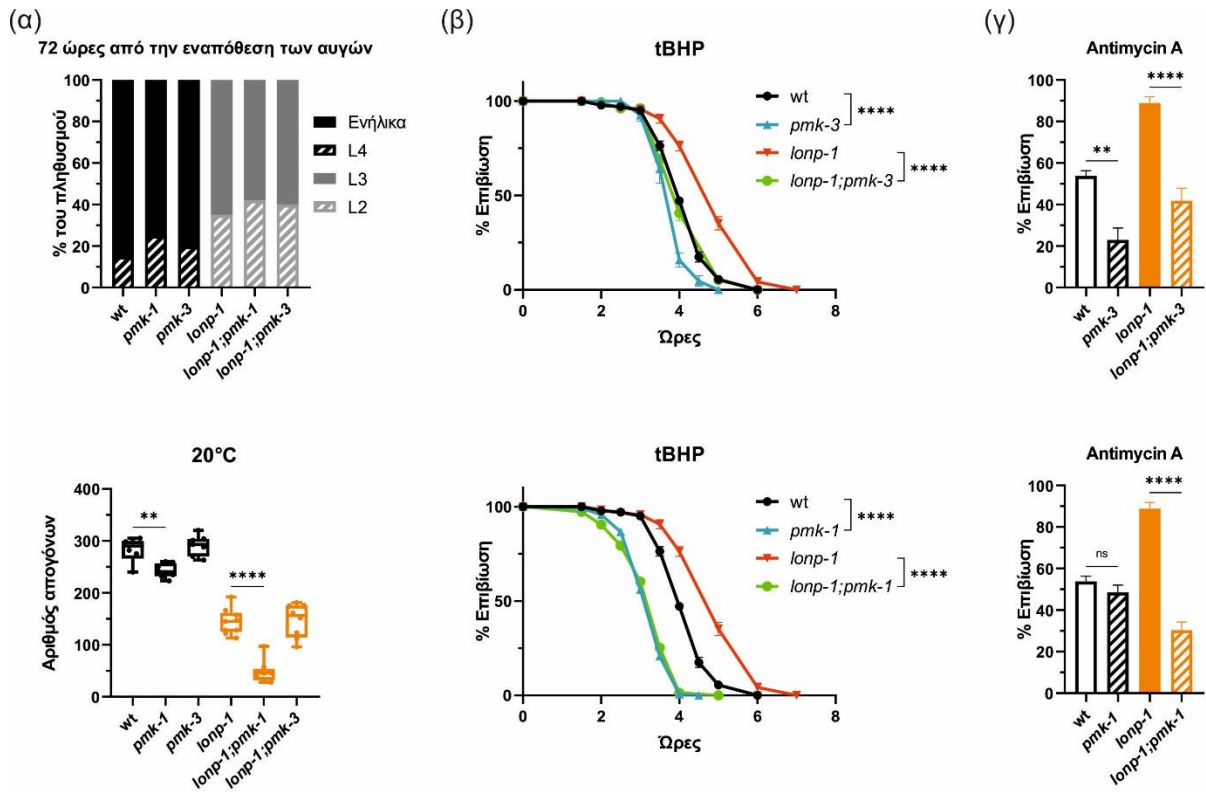
Γ.2.5.5. Το μονοπατιού MAPK^{mt} απαιτείται για τη διάρκεια ζωής και την απόκριση στο στρες των μεταλλαγμάτων *lonp-1*

Η ενεργότητα του bZip μεταγραφικού παράγοντα ZIP-2, ανεξάρτητα από το ρόλο της στην απόκριση στη μόλυνση (Estes et al., 2010), βοηθά στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ακεραιότητας και ομοιόστασης κατά τη γήρανση (Hahm et al., 2020). Επιπλέον ο ZIP-2 ενεργοποιείται κατά τη διαδικασία της γήρανσης μέσω διαφορετικού μηχανισμού από τη μόλυνση από παθογόνο και ανεξάρτητα από το μεταγραφικό παράγοντα ATFS-1 (Hahm et al., 2020). Αν και έχει δειχθεί πως ο ZIP-2 δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση του MAPK^{mt} στο στέλεχος *isp-1* (Munkacsy et al., 2016), η απώλειά του οδηγεί σε μειωμένη επαγωγή του *tbb-6* στα στελέχη N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-26α), υποδεικνύοντας πως ο ZIP-2 δεν δρα καταρροϊκά του ATFS-1 για την καταστολή του μονοπατιού MAPK^{mt}. Δεδομένου ότι κατά τη γήρανση αυξάνεται η δραστηριότητα του ZIP-2 και ότι το στέλεχος *lonp-1* εμφανίζει πρόωρη γήρανση, είναι πιθανό ο ZIP-2 να μην απαιτείται για την ενεργοποίηση του MAPK^{mt} στο μακρόβιο στέλεχος *isp-1* την πρώτη ημέρα ενηλικίωσης, αλλά αργότερα κατά τη διάρκεια της ζωής του. Η αυξημένη διάρκεια ζωής του *isp-1* απαιτεί ενεργό το μονοπάτι MAPK^{mt} και συνδυαστικά με την πιθανή αλληλεπίδραση των PMK-3 και ZIP-2, ελέγχθηκε πώς η απώλεια των γονιδίων *pmk-3*, *zip-2* επηρεάζει τη διάρκεια ζωής του στελέχους *lonp-1*. Το στέλεχος *lonp-1* ζει σημαντικά λιγότερο από το αγρίου τύπου και η απώλεια του *pmk-3* ή του *zip-2* μειώνουν σημαντικά ακόμη περισσότερο τη διάρκεια ζωής του στελέχους *lonp-1*, χωρίς να επηρεάζουν τη φυσιολογική διάρκεια ζωής του στελέχους αγρίου τύπου N2 (Εικ. Γ.2-26β,γ). Παράλληλες δοκιμασίες διάρκειας ζωής κατά την απώλεια του γονιδίου *pmk-1*, δείχνουν πως η απώλειά του δεν επηρεάζει το προσδόκιμο ζωής των στελεχών N2 και *lonp-1* (Εικ. Γ.2-26δ).



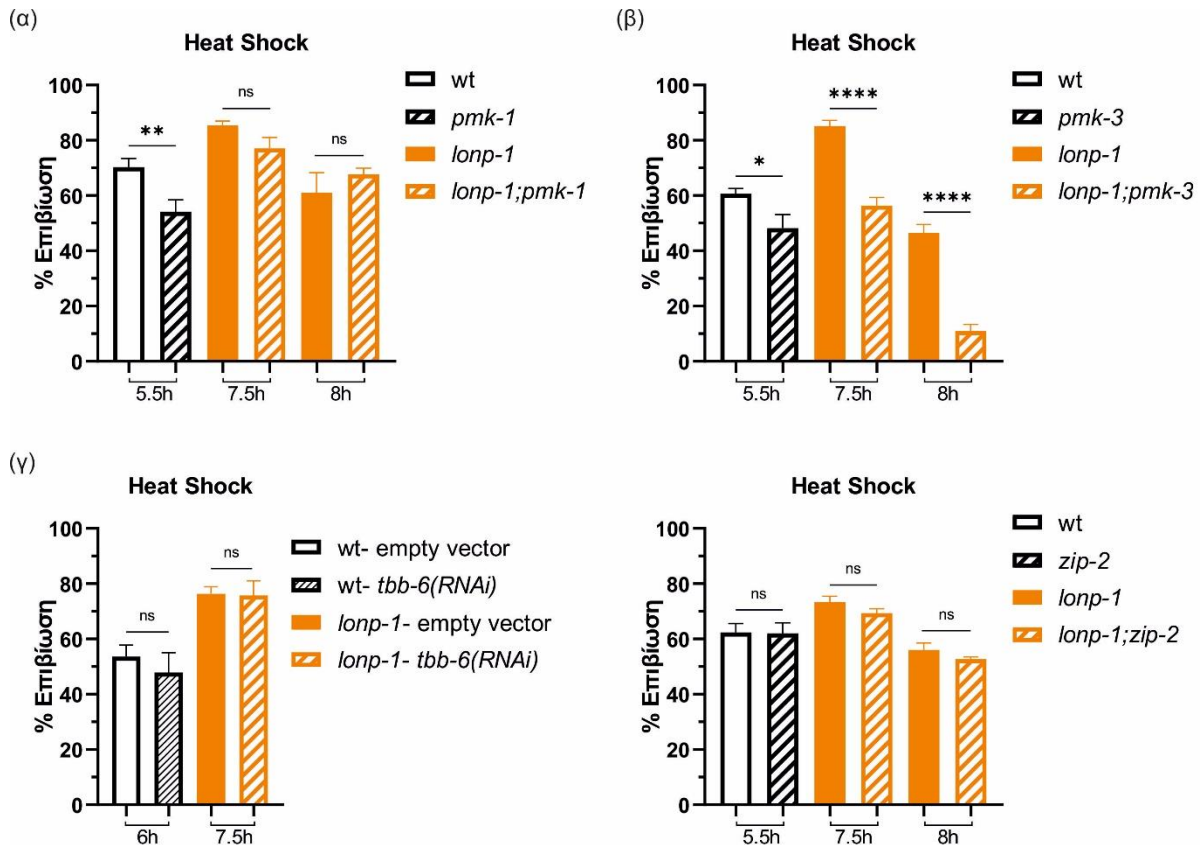
Εικόνα Γ.2-26. Ο ZIP-2 και η PMK-3 απαιτούνται για τη φυσιολογική διάρκεια ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1*. (α) Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ενδογενούς γονιδίου *tbb-6* σε μία ημέρας wt και *lonp-1* σκουλήκια κατά την έλλειψη του γονιδίου *zip-2*. (β) Δοκιμασία διάρκειας ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1* και wt στους 20°C κατά την έλλειψη του γονιδίου (α) *zip-2*, (β) *pmk-3* και (γ) *pmk-1*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Στη συνέχεια ελέγχθηκε πώς η διατάραξη του κανονικού αλλά και του μιτοχονδριακού μονοπατιού MAPK/p38 επηρεάζει την ανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* σε οξειδωτικό και θερμικό στρες. Η απώλεια των γονιδίων *pmk-1* και *pmk-3* δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των στελεχών N2 και *lonp-1*, αλλά η απώλεια του *pmk-1* μειώνει τον αριθμό απογόνων και στα δύο στελέχη (Εικ. Γ.2-27α). Έπειτα από χορήγηση του οργανικού υπεροξειδίου tBHP παρατηρήθηκε πως η απώλεια του *pmk-1* και του *pmk-3* καθιστά και τα δύο στελέχη πολύ ευαίσθητα (Εικ. Γ.2-27β). Επομένως όχι μόνο η κινάση PMK-1, αλλά και η PMK-3 έχει σημαντικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες σε φυσιολογικές και μιτοχονδριακού στρες συνθήκες ανάπτυξης. Η απώλεια του *pmk-1* έχει επίσης επίπτωση στην ανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* στην Αντιμυκίνη Α χωρίς να επηρεάζει την επιβίωση του N2, ενώ η απώλεια του *pmk-3* μειώνει την επιβίωση και των δύο στελεχών σε αυτό το στρες (Εικ. Γ.2-27γ). Η Αντιμυκίνη Α αναστέλλει το σύμπλοκο III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων προκαλώντας τη δημιουργία ανιόντων υπεροξειδίου στο μιτοχόνδριο. Επομένως, η κινάση PMK-3 απαιτείται γενικά για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στο μιτοχόνδριο και στα δύο στελέχη, ενώ η PMK-1 μόνο για την επιβίωση των ατόμων με απώλεια της πρωτεάσης LONP-1.



Εικόνα Γ.2-27. Οι κινάσες PMK-1 και PMK-3 απαιτούνται για την αυξημένη επιβίωση των *lonp-1* στο οξειδωτικό στρες. (α) Ο ρυθμός ανάπτυξης και απογόνων των ατόμων *N2* (*wt*) και *lonp-1* κατά την έλλειψη του γονιδίου *pmk-1* ή του *pmk-3*, 72 ώρες μετά την εναπόθεση αυγών στους 20° C. (β) Η επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από tBHP (10 mM) των ατόμων *wt* και *lonp-1* κατά την έλλειψη του γονιδίου *pmk-1* ή του *pmk-3*. (γ) Η επιβίωση σε οξειδωτικό στρες από antimycin A (40 μm για 24 ώρες) των ατόμων *wt* και *lonp-1* κατά την έλλειψη του γονιδίου *pmk-1* ή του *pmk-3*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (*p*-value).

Γνωρίζουμε πως η p38 κινάση PMK-1 συνεισφέρει στην υπερφορφοσφορυλίωση και ενεργοποίηση του κύριου μεταγραφικού παράγοντα της θερμικής απόκρισης στο στρες (Heat Shock Transcription Factor 1, HSF-1) (Dayalan Naidu et al., 2016), που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού στρες (Heat Shock Proteins, HSP) (Wu et al., 1986; Wu, 1984). Πράγματι, η απώλεια του *pmk-1* καθιστά το στέλεχος αγρίου τύπου ευαίσθητο στο θερμικό στρες, αλλά δεν έχει επίπτωση στην ανθεκτικότητα στον στελέχους *lonp-1* (Εικ. Γ.2-28α). Ωστόσο η απώλεια του *pmk-3* μειώνει την ανθεκτικότητα όχι μόνο του στελέχους *N2* αλλά και του *lonp-1* (Εικ. Γ.2-28β). Δεν είναι γνωστό πώς η κινάση PMK-3 έχει καθοριστικό ρόλο στη θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1*, αλλά δεν χρειάζεται τη λειτουργία του ZIP-2 ούτε απαιτεί την β-τουμπουλίνη TBB-6, που είναι ο τελικός στόχος του μονοπατιού MAPK^{mt} (Εικ. Γ.2-28γ). Καθώς για τη θερμοανθεκτικότητα αυτή απαιτείται ο μεταγραφικός παράγοντας της απόκρισης στο θερμικό στρες HSF-1, περισσότερες μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της PMK-3, αντί της PMK-1, με τον HSF-1 υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες. Συμπερασματικά, τα δεδομένα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν πως το μονοπάτι PMK-3/p38 MAPK^{mt} μεσολαβεί στον καθορισμό της διάρκειας ζωής και έχει σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο στρες, υπό τις συνθήκες μιτοχονδριακού στρες που προκαλούνται από την απώλεια της πρωτεάσης LONP-1.



Εικόνα Γ.2-28. Η κινάση PMK-3 απαιτείται για την αυξημένη επιβίωση των *lonp-1* στο θερμικό στρες (HS). Το θερμικό στρες έγινε σε ενήλια άτομα μίας ημέρας στους 35° C για τα χρονικά διαστήματα που ορίζονται σε κάθε γράφημα. Εμφανίζεται η επιβίωση των ατόμων N2 (wt) και *lonp-1* στο HS κατά (α) την έλλειψη του γονιδίου *pmk-1*, (β) την έλλειψη του γονιδίου *pmk-3*, (γ) την αποσίωπηση του γονιδίου *tbb-6* με RNAi σίτισης ή την έλλειψη του γονιδίου *zip-2*. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος όλων των βιολογικών επαναλήψεων και η σημαντικότητα αξιολογήθηκε με το μη συζευγμένο t-test (p-value).

Πίνακας Γ.2-1. Ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις δοκιμασίες διάρκειας ζωής.

Στέλεχος	Γονότυπος	Μέση/Μέγιστη	(°C)	Mean/SEM	Άτομα / (Total/Censored)	p-value vs control στέλεχος	p-value vs control συνθήκη
N2	Wild-type (wt)	24/29	20	23.33/0.3333	135/6	-	-
BRF336	<i>lonp-1(tm5171)</i>	19/27		19.33/0.3333	126/25	<0.0001(****)	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	20/29		20.00/0.5774	106/12	<0.0001(****)	-
BRF638	wt;rol-6(<i>su1006</i>)	23/34	20 ^a	22.67/0.8819	92/21	-	-
BRF611	<i>lonp-1(ko); rol-6(su1006)</i>	15/29		14.67/1.453	107/45	<0.0001(****)	-
BRF663	<i>lonp-1(ko); lonp-1::gfp; rol-6(su1006)</i>	20/31		19.67/1.667	94/24	0.0201(*) vs wt 0.0059(**) vs <i>lonp-1(ko)</i>	-
N2	wt	21/32	20	21.33/0.1667	92/24	-	-

Στέλεχος	Γονότυπος	Μέση/ Μέγιστη	(°C)	Mean/SEM	Άτομα / (Total/ Censored)	p-value vs control στέλεχος	p-value vs control συνθήκη
BRF336	<i>lonp-1(tm5171)</i>	16/30		16.33/ 1.667	95/41	<0.0001(****)	-
N2	wt	19/26	20	19.67/ 0.3333	110/4	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	14/24		14.00/ 0.5774	113/5	<0.0001(****)	-
N2	wt	20/27	20	19.67/ 0.3333	133/19	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	15/26		15.00/ 0.5774	125/18	<0.0001(****)	-
N2	wt	11/21	25	10.67/ 0.3333	131/2	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	8/22		8.167/ 0.1667	100/1	<0.0001(****)	-
N2	wt	14/19	25	13.33/ 0.3333	125/13	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	9/19		9.000/ 0.000	90/17	<0.0001(****)	-
N2	wt	14/21	25	13.67/ 0.3333	106/12	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	9/21		8.500/ 0.5000	77/8	0.0124(*)	-
N2 empty vector	wt	18/30	20	18.00/ 0.9129	147/8	-	-
N2 <i>atfs-1(RNAi)</i>		19/31		19.25/ 0.7500	152/5	-	0.0788(ns)
BRF791 empty vector	<i>lonp-1(ko)</i>	19/30		19.25/ 0.2500	126/8	0.8616(ns)	-
BRF791 <i>atfs-1(RNAi)</i>		16/28		16.33/ 0.3333	107/9	0.0001(***)	0.0160(*)
N2 empty vector	wt	17/27	20	17.33/ 0.3333	111/1	-	-
N2 <i>atfs-1(RNAi)</i>		17/27		16.67/ 0.6667	129/0	-	0.7433(ns)
BRF791 empty vector	<i>lonp-1(ko)</i>	19/29		19.00/ 0.5774	111/1	0.0559(ns)	-
BRF791 <i>atfs-1(RNAi)</i>		18/28		17.67/ 0.3333	105/0	0.9992(ns)	0.0276(*)
N2 empty vector	wt	20/28	20	20.00/ 0.000	116/5	-	-
N2 <i>atfs-1(RNAi)</i>		20/28		20.17/ 0.4410	124/1	-	0.5031(ns)
BRF791 empty vector		<i>lonp-1(ko)</i>		21/28	21.33/ 1.202	125/11	0.1050(ns)

Στέλεχος	Γονότυπος	Μέση/ Μέγιστη	(°C)	Mean/SEM	Άτομα / (Total/ Censored)	p-value vs control στέλεχος	p-value vs control συνθήκη
BRF791 <i>atfs-1(RNAi)</i>		20/27		20.00/ 0.5774	123/3	0.3682(ns)	0.0202(*)
N2	<i>wt</i>	21/31	20	20.67/ 0.3333	121/12	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	17/26		17.33/ 0.3333	96/16	<0.0001(****)	-
VC3056	<i>zip-2(ko)</i>	20/31		20.13/ 0,3146	146/36	0,0839(ns)	-
BRF843	<i>lonp-1(ko);zip- 2(ko)</i>	15/25		15.25/ 0,4787	161/31	<0.0001(****)	0,0034(**)
N2	<i>wt</i>	21/30		20.67/ 0.3333	138/10	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	19/25	20	18.67/ 0.3333	121/14	<0.0001(****)	-
BS3383	<i>pmk-3(ok169)</i>	20/30		20.33/ 0.3333	124/6	0,3319(ns)	-
BRF851	<i>lonp-1(ko); pmk-3(ok169)</i>	18/23		17.67/ 0.3333	126/25	<0.0001(****)	0,0005(****)
N2	<i>wt</i>	22/33		22.33/ 0.666	126/12	-	-
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	19/30	20	19.67/ 0.666	125/20	<0.0001(****)	-
KU25	<i>pmk-1(ko)</i>	23/33		23.33 0.666	108/15	0.2181(ns)	-
BRF864	<i>lonp-1(ko); pmk-1(ko)</i>	18/27		18.17/ 0.166	122/11	<0.0001(****)	0.1698(ns)
BRF791	<i>lonp-1(ko)</i>	19		19.33±0.333	128/9	-	-
BRF851	<i>lonp- 1(ko);pmk- 3(ok169)</i>	18	20	18.33±0.333	106/20	-	0.0084(**)
BRF864	<i>lonp- 1(ko);pmk- 1(km25)</i>	19		19.00±0.000	110/9	-	0.0701(ns)

Δ. Συζήτηση

Ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη και την επιβίωση όλων των οργανισμών. Η ακεραιότητα του πρωτεώματος διατηρείται από κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας και σηματοδοτικά μονοπάτια επιτήρησης, που συνήθως είναι αλληλένδετα. Τα μιτοχόνδρια ελέγχουν βασικές διεργασίες του κυττάρου, όπως ο μεταβολισμός και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην σηματοδότηση μηχανισμών που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση. Η διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης ρυθμίζεται σε διάφορα στάδια και περιλαμβάνει εσωτερικούς μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου, όπως μοριακούς συνοδούς, πρωτεάσες, σηματοδοτικά μονοπάτια ενδο- και δια- κυτταρικής σηματοδότησης, μηχανισμούς μεταφοράς των πρωτεϊνών για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα και μηχανισμούς σε επίπεδο οργανιδίου που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή μορφολογία ή απομακρύνουν τα μη επιδιορθώσιμα μιτοχόνδρια από το κύτταρο (Moehle et al., 2019). Αν και υπάρχει σημαντική γνώση σχετικά με τη ρύθμιση και τη λειτουργία κάθε μηχανισμού ή μονοπατιού, κυρίως σε κυτταρικό επίπεδο, λίγα είναι γνωστά για το πώς συντονίζονται σε επίπεδο οργανισμού και συνδέονται με την υγεία και τη γήρανση του οργανισμού. Η διαλεύκανση της επικοινωνίας των ομοιοστατικών αυτών μηχανισμών σε επίπεδο οργανισμού είναι σημαντική, για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει συσχετιστεί με πολλές ανθρώπινες ασθένειες (Bender et al., 2006; Sheng et al., 2012).

Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μιτοχονδριακής πρωτεϊνικής ομοιόστασης (πρωτεόσταση) έχει η οικογένεια των εξελικτικά συντηρημένων ATP-εξαρτώμενων πρωτεϊνών (ATPase Associated with diverse cellular Activities, AAA⁺). Μεταξύ αυτών, η μιτοχονδριακή πρωτεάση LONP1, που εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα, και συμμετέχει στον ποιοτικό έλεγχο του μιτοχονδριακού πρωτεώματος (Bezawork-Geleta et al., 2015). Η λειτουργία της επεκτείνεται στο μεταβολισμό και τη μετάφραση του μιτοχονδριακού RNA (Münch & Harper, 2016; Pareek & Pallanck, 2018; Zurita Rendón & Shoubbridge, 2018), υποστηρίζοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε στρεσογόνες συνθήκες (Venkatesh et al., 2012). Η δράση της είναι τριπλή, καθώς επιτελεί λειτουργίες μοριακού συνοδού, πρωτεάσης, αλλά και πρωτεΐνης που δεσμεύεται στο μιτοχονδριακό DNA. Η πρωτεολυτική της δράση βασίζεται στην υδρόλυση του ATP και περιορίζεται από το βαθμό αναδίπλωσης των υποστρωμάτων της, αλλά το σύνολο των υποστρωμάτων της δεν έχει ταυτοποιηθεί. Αποικοδομεί κυρίως πρωτεΐνες που φέρουν συγκεκριμένα μοτίβα αποικοδόμησης ή αποκτούν κακή αναδίπλωση ή συσσωματώνονται. Ωστόσο έχει προταθεί πως η αναγνώριση των υποστρωμάτων της LONP1 γίνεται μέσω της αμινοτελικής περιοχής της, καθώς αναγνωρίζει και συνδέεται σε υδροφοβικά κατάλοιπα πρωτεϊνών που εκτίθενται στην μη αναδιπλωμένη μορφή τους όταν οξειδωθούν ή συσσωματωθούν (Gur & Sauer, 2008; Tzeng et al., 2021). Επιπλέον, ελάχιστα είναι ακόμη γνωστά για το πώς η έλλειψη της LONP1 επηρεάζει τη φυσιολογία ή τις αποκρίσεις του οργανισμού σε διάφορες περιβαλλοντικές προσκλήσεις, καθώς ο ρόλος της είναι απαραίτητος για την επιβίωση και ανάπτυξη γνωστών οργανισμών μοντέλων όπως η δροσόφιλα και τα ποντίκια (Pinti et al., 2016). Η έλλειψη άλλων μιτοχονδριακών πρωτεασών δεν έχει βρεθεί επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση, υπογραμμίζοντας τον κρίσιμο ρόλο της LONP1 στον οργανισμό και την ανάγκη να μελετηθεί η συμμετοχή της στους παραπάνω μηχανισμούς (Pedro M. Quirós et al., 2014). Για τη διερεύνηση των επιπτώσεων της έλλειψης της πρωτεάσης LONP1 στην ανάπτυξη, επιβίωση αλλά και στους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου σε επίπεδο οργανισμού, χρησιμοποιήθηκε ο νηματώδης *C. elegans*, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο για τη μελέτη της διαδικασίας της γήρανσης. Στο *C. elegans* κωδικοποιείται από το γονίδιο *lonp-1*, που εδράζεται σε ένα οπερόνιο μαζί με άλλα τρία γονίδια που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (*sdha-2*), στο UPR^{ER} (*spsc-1*) και στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (*ttc-1*). Η έλλειψη της πρωτεάσης μελετήθηκε με τη δημιουργία

ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους που φέρει έλλειψη ολόκληρου του γονιδίου *lonp-1*, με τη μέθοδο CRISPR/Cas9. Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της πρωτεολυτικής δράσης της ανθρώπινης πρωτεάσης LONP1, CDDO-Me, και διερευνήθηκαν οι παραπάνω διεργασίες του οργανισμού.

Σε συμφωνία με το ρόλο της πρωτεάσης LONP-1 στο μιτοχονδριακό ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών, η έλλειψή της στο *C. elegans* προκαλεί ανώμαλη μιτοχονδριακή μορφολογία και διαταραγμένη δομή του μιτοχονδριακού δικτύου, που συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Ως αποτέλεσμα, τα μεταλλάγματα *lonp-1* χαρακτηρίζονται από καθυστερημένο ρυθμό ανάπτυξης, μειωμένο αριθμό απογόνων, μειωμένη κινητικότητα, αλλά και μειωμένη διάρκεια ζωής συγκριτικά με τα αγρίου τύπου σκουλήκια. Διαγονιδιακά *lonp-1* άτομα που εκφράζουν τη LONP-1 σε σύντηξη με GFP, σώζουν μερικώς αυτούς τους φαινοτύπους και επιβεβαιώνεται ο εντοπισμός της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η αυξημένη παραγωγή ROS που βιώνουν τα μεταλλάγματα *lonp-1*, οδηγούν στην ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού μηχανισμού απόκρισης στις κακώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPR^{mt}), χωρίς να είναι απαραίτητη προηγουμένως η επαγωγή του συστήματος ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες (ISR) ή η καταστολή της μετάφρασης. Η ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα μεταλλάγματα *lonp-1* δεν απαιτεί την μιτοχονδριακή πρωτεάση CLPP-1 ή τον μεταφορέα πεπτιδίων HAF-1, που δρουν ως σινιάλα ενεργοποίησής του διαταράσσοντας την μιτοχονδριακή εισαγωγή πρωτεϊνών. Είναι πιθανό η ήδη διαταραγμένη μιτοχονδριακή λειτουργία τους να επιτελεί τον ίδιο σκοπό. Η μειωμένη διάρκεια ζωής και η επαγωγή του UPR^{mt} έχει επίσης δειχθεί και κατά τη μερική απενεργοποίηση της LONP1 στη *Drosophila* (Pareek et al., 2018; Pomatto et al., 2017). Η λειτουργία του UPR^{mt} εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα ATFS-1/ATFS, που όταν ανιχνεύει εκτεταμένες βλάβες του μιτοχονδριακού δικτύου ή αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μεταφέρεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα μέσω του σινιάλου πυρηνικού εντοπισμού (NLS) του, όπου επάγει ή να περιορίζει τη μεταγραφή γονιδίων που είναι απαραίτητα για την αποκατάσταση της λειτουργίας του μιτοχονδρίου (Nargund et al., 2015). Ο ATFS-1 φέρει και μια μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχευσης (mitochondrial targeting sequence, MTS) που σε φυσιολογικές συνθήκες τον κατευθύνει στη μιτοχονδριακή μήτρα και η πλειονότητα της πρωτεΐνης αποικοδομείται από την πρωτεάση LONP-1 (Nargund et al., 2012). Πράγματι, η δράση του ATFS-1 είναι απαραίτητη όχι μόνο για την ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα μεταλλάγματα *lonp-1*, αλλά και για τη φυσιολογική ανάπτυξη και διάρκεια ζωής τους. Η απώλεια δράσης του ATFS-1 δεν έχει κάποια εμφανή επίπτωση στα αγρίου τύπου σκουλήκια, γεγονός που σημαίνει ότι είναι απαραίτητος μόνο υπό συνθήκες μιτοχονδριακού στρες, όπως αυτό που βιώνουν τα μεταλλάγματα *lonp-1*, και συμβάλλει στην επιβίωσή τους. Είναι γνωστό πως ο ATFS-1 δρα συνεργιστικά με τους παράγοντες DVE-1 και UBL-5 για την επαγωγή του κανονικού μονοπατιού UPR^{mt}, σε μια διαδικασία που απαιτεί τα πεπτίδια που παράγονται από την CLPP-1 και απελευθερώνονται μέσω του εξαγωγέα πεπτιδίων της μήτρας HAF-1 (Haynes et al., 2010). Ωστόσο στο γενετικό υπόβαθρο *lonp-1*, οι παράγοντες DVE-1 και UBL-5 δεν απαιτούνται για την ενεργοποίησή του, υποστηρίζοντας την άποψη πως το σηματοδοτικό μονοπάτι UPR^{mt} είναι στην πραγματικότητα ένα σύνολο αλληλένδετων αποκρίσεων σε πιο συγκεκριμένους μιτοχονδριακούς στρεσογόνους παράγοντες (Jensen & Jasper, 2014).

Εκτός από την ενεργοποίηση της απόκρισης του UPR^{mt}, η έλλειψη του *lonp-1*, και πιθανώς η αυξημένη παραγωγή ROS και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που βιώνουν τα στελέχη αυτά, οδηγεί στην ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών μηχανισμών απόκρισης στο στρες, που αποσκοπούν στην υποβοήθηση των σκουληκιών να αντιμετωπίσουν το εσωτερικό στρες. Αν και η ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα μεταλλάγματα *lonp-1* είναι ανεξάρτητη της συσσώρευσης ROS, η ενεργοποίηση της δράσης του ATFS-1, συνδυαστικά με τα αυξημένα επίπεδα ROS, συμβάλλουν στην επαγωγή της

αντιοξειδωτικής απόκρισης που εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα SKN-1/NRF, αυξορρυθμίζοντας τα γονίδια-στόχους του. Ο ATFS-1 ταυτοποιήθηκε επίσης ως ο μεσολαβητής για την πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα DAF-16/FOXO και την επαγωγή του μάρτυρα ενεργοποίησής του, *sod-3*, στα μεταλλάγματα *lonp-1*. Αν και η αυξημένη διάρκεια ζωής μακρόβιων μιτοχονδριακών μεταλλαγμάτων εξαρτάται από την ενεργοποίηση του DAF-16 από την υπερπαραγωγή ROS (Senchuk et al., 2018; Soo et al., 2021), ο εντοπισμός του DAF-16 στον πυρήνα των κυττάρων των μεταλλαγμάτων *lonp-1* απαιτεί την ενεργοποίηση του SKN-1 από τον ATFS-1 και είναι ανεξάρτητος της παραγωγής ROS. Επομένως, στις συνθήκες μιτοχονδριακού στρες που προκαλούνται από την έλλειψη του *lonp-1*, ο SKN-1 ενεργοποιείται από τον ATFS-1 και την συσσώρευση ROS για τη ρύθμιση της αντιοξειδωτικής απόκρισης είτε ανεξάρτητα των επιπέδων ROS για την ενεργοποίηση του DAF-16. Ακόμη, η έλλειψη του *lonp-1* προκαλεί την ενεργοποίηση ενός προσαρμοστικού κυτταροπλασματικού μηχανισμού που προστατεύει τα κύτταρα από τη συσσώρευση μετουσιωμένων ή κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, την απόκριση στο θερμικό στρες (HSR/UPR^{cyt}). Στο στέλεχος *lonp-1*, παρατηρούνται αυξημένα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των επαγόμενων από στρες *hsp* γονιδίων, αλλά όχι των γονιδίων *hsp* που εκφράζονται σταθερά, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Η ενεργοποίηση και των δύο αυτών κυτταροπλασματικών αποκρίσεων (αντιοξειδωτική και θερμικού στρες αποκρίσεις) παρατηρήθηκε σε αγρίου τύπου σκουλήκια που τους χορηγήθηκε το τριτερπενοειδές CDDO-Me, το οποίο, μεταξύ άλλων στόχων του, αναστέλλει και την πρωτεολυτική δράση της ανθρώπινης LONP1. Αυτό υποδηλώνει πως η απώλεια της δράσης της LONP-1 στο *C. elegans* προκαλεί την αλληλεπίδραση του μιτοχονδριακού και κυτταροπλασματικού UPR για την προστασία των κυττάρων από τη διαταραγμένη πρωτεϊνική ομοιόσταση. Πράγματι, σε αντίστοιχες μελέτες έχει δειχθεί πως η έλλειψη του *atfs-1* προκαλεί την ενεργοποίηση του HSR/UPR^{cyt}, ως αντισταθμιστική απόκριση στη δυσλειτουργία του UPR^{mt} (Soo et al., 2021; Wu et al., 2018). Η έλλειψη μιτοχονδριακών γονιδίων μπορεί να προκαλέσει την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στο HSR, ώστε να προστατευτεί ο οργανισμός από την κατάρρευση της πρωτεόστασης κατά τη διαδικασία της γήρανσης (Labbadia et al., 2017).

Οι παραπάνω αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων επιβεβαιώθηκαν με τις φαινοτυπικές μεταβολές των νηματωδών λόγω της δράσης αυτών των γονιδίων. Η διερεύνηση της απόκρισης των σκουληκιών με έλλειψη του *lonp-1* στο στρες, έγινε με έκθεσή τους σε διάφορους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες:

Οξειδωτικό στρες

Τα μεταλλάγματα *lonp-1* εμφανίζουν αυξημένη επιβίωση στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τους οξειδωτικούς παράγοντες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂ ή tBHP), Paraquat και Antimycin A, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου. Η επιβίωση των σκουληκιών στο tBHP εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες SKN-1 και ATFS-1 τόσο στα αγρίου τύπου όσο και στα *lonp-1* σκουλήκια, υποδεικνύοντας πως και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την απόκριση στο κυτταρικό οξειδωτικό στρες. Η επιβίωση όμως στην Antimycin A, που δημιουργεί ρίζες υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια, απαιτεί μόνο τη δράση του ATFS-1 και στα δύο στελέχη, επιβεβαιώνοντας πως ο ATFS-1 έχει κυρίαρχο ρόλο υπό μιτοχονδριακό στρες. Αν και η αυξημένη επιβίωση των σκουληκιών στο οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με την αυξημένη διάρκεια ζωής στα σκουλήκια, η επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα μεταλλάγματα *lonp-1*, μπορεί να αποσυσχετιστεί από τη διαδικασία της γήρανσης σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες σε άλλα μιτοχονδριακά μεταλλαγμένα σκουλήκια (Bennett et al., 2014; Dues et al., 2017; Wu et al., 2018). Ωστόσο, η έκθεση των σκουληκιών στους οξειδωτικούς παράγοντες Sodium Arsenite, Sodium Azide ή Rotenone μειώνει σημαντικά την επιβίωση των μεταλλαγμάτων *lonp-1* συγκριτικά με τα αγρίου

τύπου, και η επιβίωσή τους μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με την επαγωγή του μερικώς λειτουργικού διαγονιδίου *lonp-1::gfp*. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν πως η απόκριση ενός οργανισμού στο οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλεί συγκεκριμένους μηχανισμούς άμυνας, ανάλογα με τον τρόπο, τον τόπο και τη διάρκεια παραγωγής των ROS.

Οσμωτικό στρες

Η χορήγηση αυξημένης ποσότητας αλατιού κατά την καλλιέργεια των νηματωδών, δημιουργεί συνθήκες οσμωτικού/υπερτονικού στρες (HTS). Αν και τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του μάρτυρα επαγωγής της απόκρισης στο HTS (HTSR) παραμένουν σταθερά μεταξύ των στελεχών *lonp-1* και αγρίου τύπου, τα μεταλλάγματα *lonp-1* εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη επιβίωση στο οσμωτικό στρες. Η ενεργοποίηση του ATFS-1 βοηθά στην επιβίωση των σκουληκιών στο HTS (Soo et al., 2021; Wu et al., 2018), αλλά η ανθεκτικότητα των *lonp-1* στο οσμωτικό στρες δεν εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες SKN-1 και ATFS-1, υποστηρίζοντας την άποψη πως το οσμωτικό στρες προκαλεί πρωτεϊνική καταστροφή με τρόπο διαφορετικό από άλλα είδη στρες, ενεργοποιώντας συγκεκριμένα το HTSR (Urso & Lamitina, 2021). Αν και παραμένει άγνωστο αν συμμετέχουν στο HTSR συγκεκριμένα μονοπάτια αποικοδόμησης, για τη ρύθμισή του στο *C. elegans* απαιτείται η διατήρηση του πρωτεώματος, καθώς η αναστολή γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αποικοδόμησης ή της μετάφρασης οδηγούν σε μειωμένη επιβίωση στο HTS (Burkewitz et al., 2011; Burkewitz et al., 2012). Επομένως η ανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1* στο HTS πιθανώς να οφείλεται σε διαφορετικούς πρωτεοστατικούς μηχανισμούς από το UPR^{mt}, που επάγονται και του δίνουν πλεονέκτημα στο οσμωτικό στρες.

Θερμικό στρες

Τα μεταλλάγματα *lonp-1* εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες συγκριτικά με τα αγρίου τύπου σκουλήκια, πιθανώς λόγω των αυξημένων επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο HSR. Παρά το γεγονός πως οι μεταγραφικοί παράγοντες ATFS-1 και DAF-16 έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στο θερμικό στρες (Morimoto, 1998; Soo et al., 2021), η θερμοανθεκτικότητα των *lonp-1* δεν εξαρτάται από κανέναν από τους δύο. Η αποσιώπηση του *daf-16* επηρεάζει στον ίδιο μικρό βαθμό την επιβίωση των στελεχών αγρίου τύπου και *lonp-1*. Ο τρόπος με τον οποίο ο DAF-16 συνεισφέρει στην επιβίωση στο θερμικό στρες στο στέλεχος *lonp-1* δεν είναι ξεκάθαρος, καθώς οι διαφορετικές δράσεις του DAF-16 αλλά και η ρύθμισή του δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές. Η ενεργοποίησή του πάντως δεν είναι αρκετή για να προσφέρει αυξημένη διάρκεια ζωής στο στέλεχος *lonp-1*, υποδεικνύοντας πως ενεργοποιεί επιλεκτικά διαφορετικά γονίδια για την απόκριση στο στρες από αυτά που σχετίζονται με τη μακροζωΐα. Παρά το γεγονός πως η ενεργοποίηση του ATFS-1 οδηγεί σε αύξηση της ανθεκτικότητας στο θερμικό στρες συγκριτικά με τα αγρίου τύπου N2, η αποσιώπηση του *atfs-1* δεν επηρεάζει την θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1*, αλλά μειώνει την επιβίωση των αγρίου τύπου σκουληκιών. Επιπλέον, ούτε η συσσώρευση των ROS ούτε ο μεταγραφικός παράγοντας SKN-1 απαιτούνται για την επιβίωση στο θερμικό στρες στα σκουλήκια, υποδεικνύοντας πως η θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* δεν οφείλεται στην επαγωγή του UPR^{mt} ή της αντιοξειδωτικής απόκρισης στο στρες.

Επιπλέον, στα θηλαστικά, η πρωτεάση LONP1 απαιτείται για την επιβίωση των κυττάρων σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία) και τα μεταγραφικά της επίπεδα ρυθμίζονται από τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα που επάγεται από την υποξία, τον HIF-1 (Fukuda et al., 2007), ο οποίος σε συνθήκες υποξίας αυξάνει τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *hsp* (Baird et al., 2006). Η έλλειψη του *lonp-1* οδηγεί σε αυξημένα σχετικά επίπεδα έκφρασης του μάρτυρα ενεργοποίησης της υποξίας από τον HIF-1 συγκριτικά με τα αγρίου τύπου σκουλήκια, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που

δείχνουν πως η αποσιώπηση της *lonp-1* σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου μπορεί να δημιουργήσει τον σχηματισμό μιτοχονδριακών κοκκίων στρες (mitochondrial Stress Granules, mitoSGs) που επάγονται από υποξία (Sun et al., 2023). Παρόλα αυτά, φαίνεται πως η θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησης του HIF-1 αφού ούτε η έλλειψη ούτε η ενεργοποίησή του δεν επηρεάζει την επιβίωση του στελέχους *lonp-1* στο θερμικό στρες.

Για την έκφραση των γονιδίων απόκρισης στο θερμικό στρες απαιτείται η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HSF-1 (Williams et al., 2020; Wu et al., 1986; Wu, 1984). Ο κεντρικός του ρόλος στο HSR επιβεβαιώθηκε, καθώς η αποσιώπηση του μειώνει την επιβίωση και των αγρίου τύπου και των *lonp-1* στελεχών, στον ίδιο βαθμό. Έχει δειχθεί πως η υποφωσφορυλίωση του HSF-1, υπό συνθήκες ήπιου μιτοχονδριακού στρες, απαιτεί την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου LET-92 για την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων των μικρών *hsp*. Η αποσιώπηση του *let-92* μειώνει σημαντικά την επιβίωση των μεταλλαγμάτων *lonp-1* στο θερμικό στρες, αλλά όχι την επιβίωση των αγρίου τύπου σκουληκιών, υποδηλώνοντας πως η υπο-φωσφορυλιωμένη μορφή του HSF-1 είναι απαραίτητη για τη θερμοανθεκτικότητα του στελέχους *lonp-1*. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός πως η αποσιώπηση του *let-92*, μειώνει την επαγωγή των μικρών *hsp* και *hsp-70* γονιδίων υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης στο στέλεχος *lonp-1*. Αν και ο HSF-1 δένεται επιλεκτικά στα ρυθμιστικά στοιχεία θερμικού στρες (heat shock elements, HSE) γονιδίων που έχουν σχέση με την απόκριση στο θερμικό ή μιτοχονδριακό στρες αναλόγως του αν είναι υπερ- ή υπο-φωσφορυλιωμένος, αντίστοιχα (Williams et al., 2020), είναι πιθανό να επικρατεί η υπο-φωσφορυλιωμένη μορφή του HSF-1 στο στέλεχος *lonp-1* σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, λόγω του αυξημένου μιτοχονδριακού στρες.

Μόλυνση με παθογόνο

Σε συνθήκες ήπιου μιτοχονδριακού στρες, έχει δειχθεί πως ο μεταγραφικός παράγοντας ATFS-1 μπορεί να επηρεάσει την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία του νηματώδους, αυξάνοντας την επιβίωση στη μόλυνση από το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έμφυτη ανοσία στο *C. elegans* και είναι απαραίτητα για την επιβίωσή του, είναι το μονοπάτι πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα PMK-1/p38 MAPK και το μονοπάτι που εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα με μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (bZip) ZIP-2, το οποίο είναι ανεξάρτητο της σηματοδότησης PMK-1/p38 (Estes et al., 2010; Hoffmann et al., 1999; Irazoqui et al., 2010; Kimbrell & Beutler, 2001). Η έλλειψη του *lonp-1* έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων της έμφυτη ανοσίας που εξαρτώνται από την πρωτεϊνική κινάση PMK-1/p38 MAPK, αλλά αυξάνει σημαντικά τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων- στόχων του ZIP-2, συγκριτικά με τα σκουληκία αγρίου τύπου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως η έκθεση των στελεχών στο παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa* καθιστά τα μεταλλάγματα *lonp-1* εξαιρετικά ευαίσθητα στη μόλυνση συγκριτικά με τα αγρίου τύπου. Επομένως, μόνο η ενεργοποίηση της δράσης του ZIP-2, δεν επαρκεί για να προσδώσει ανθεκτικότητα στο γενετικό υπόβαθρο *lonp-1*.

Συμπερασματικά, η έλλειψη της LONP-1 οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση των σκουληκιών σε μερικά είδη οξειδωτικού στρες, στο οσμωτικό στρες και στο θερμικό στρες, λόγω της επαγωγής μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών σηματοδοτικών μονοπατιών απόκρισης στο στρες. Αυτά περιλαμβάνουν την αυξημένη ενεργότητα του ATFS-1, που έχει πολλαπλές δράσεις ανάλογα με το είδος του στρες, ενεργοποιώντας το μονοπάτι UPR^{mt} και την αντιοξειδωτική απόκριση, αλλά και την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα HSF-1 που συμβάλλει στην απόκριση στο θερμικό στρες. Αντίθετα, η επαγωγή των γονιδίων της έμφυτης ανοσίας που εξαρτώνται από τον ZIP-2, πιθανώς επηρεάζει διαφορετικές διεργασίες του οργανισμού από την επιβίωση του στελέχους *lonp-1* στο παθογόνο *P. aeruginosa*.

Επιπλέον, έχει βρεθεί πως αν και η δραστηριότητα του ATFS-1 δεν απαιτείται για την αυξημένη διάρκεια ζωής των μακρόβιων μιτοχονδριακών μεταλλαγμάτων με δυσλειτουργική αναπνευστική αλυσίδα (στέλεχος *isp-1*), η δράση του αποτρέπει την επαγωγή ενός μιτοχονδριακού σηματοδοτικού μονοπατιού πρωτεϊνικών κινασών MAPK/p38, το MAPK^{mt}, που χαρακτηρίζεται από το σηματοδοτικό καταρράκτη κινασών DLK-1 (MAPKKK) / SEK-3 (MAPKK) /PMK-3 (MAPK) (Munkacsy et al., 2016). Οι κινάσες MAPK στα θηλαστικά είναι ρυθμιστές της δυναμικής των μικροσωληνίσκων και το μονοπάτι DLK-1/ PMK-3 στο *C. elegans* μπορεί να ρυθμίσει τη δυναμική των μικροσωληνίσκων και την ενδοκυττάρωση στους νευρώνες (Bounoutas et al., 2011; van der Vaart et al., 2015). Το μονοπάτι MAPK^{mt} ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της β-τουμπουλίνης *tbb-6* στο έντερο, που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας επαγωγής του μονοπατιού, αν και ο ακριβής ρόλος του TBB-6 παραμένει άγνωστος (Munkacsy et al., 2016). Τα υπόλοιπα πέντε μέλη της οικογένειας των βήτα τουμπουλινών του *C. elegans* κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tbb-1*, *tbb-2* που εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και σε αφθονία, το *ben-1/tbb-5* που εκφράζεται στο νευρικό σύστημα και τα *mec-7/tbb-3*, *tbb-4* που εκφράζονται μόνο σε υποδοχείς νευρικών απολήξεων της αφής (touch receptor neurons, TRNs) (Hurd, 2018). Σε αυτή τη μελέτη παρουσιάζεται η επαγωγή του μονοπατιού MAPK^{mt} στα μεταλλάγματα *lonp-1*, σε συμφωνία με το διαταραγμένο μιτοχονδριακό δίκτυο και τη συσσώρευση των ROS σε αυτό το στέλεχος. Η αποσιώπηση του *atfs-1* επάγει περισσότερο την έκφραση του μάρτυρα *tbb-6*, υποστηρίζοντας πως ο ATFS-1 ρυθμίζει τη δραστηριότητα του MAPK^{mt} καταστέλλοντάς τη. Η ρύθμιση του PMK-3 από τον ATFS-1, πιθανώς επηρεάζεται από τη λειτουργία του γονιδίου *cbp-3/F40F12.7*, ένα ομόλογο ψευδογονίδιο της ακετυλοτρανσφεράσης CBP/p300 στα θηλαστικά, που απαιτείται για την επαγωγή του *tbb-6* στα μεταλλάγματα *isp-1* (Munkacsy et al., 2016). Πράγματι, το *cbp-3* επάγεται σημαντικά στα μεταλλάγματα *lonp-1* συγκριτικά με τα αγρίου τύπου και η αυξορύθμισή του καταστέλλεται από τη δράση του ATFS-1, αναρροϊκά της σηματοδότησης PMK-3/TBB-6.

Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση και αναστολή του MAPK^{mt} αποτελούν δύο αντίθετα σινιάλα ως απόκριση στο μιτοχονδριακό στρες, και πιθανώς η συνεργασία τους είναι σημαντική για τη ρύθμιση της μεταβολικής κατάστασης του κυττάρου. Για παράδειγμα, η ήπια μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να ενεργοποιήσει προσαρμοστικούς μηχανισμούς με αποτέλεσμα την αυξημένη διάρκεια ζωής στο *C. elegans*, αλλά η διατάραξη της λειτουργίας άλλων μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία της γήρανσης, απαιτώντας την ισορροπία αυτών των μηχανισμών (Butler et al., 2010; Munkacsy et al., 2016). Πράγματι, η δυσλειτουργία του MAPK^{mt} σε μακρόβια μιτοχονδριακά μεταλλάγματα (*isp-1*), μειώνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής τους (Munkacsy et al., 2016). Η διατάραξη της λειτουργίας του UPR^{mt} ή του MAPK^{mt}, μέσω της αποσιώπησης του *atfs-1* και της έλλειψη του *pmk-3*, αντίστοιχα, καθιστά τα μεταλλάγματα *lonp-1* ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες και οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση της διάρκειας ζωής τους. Επομένως, η αλληλεπίδραση των ATFS-1 και PMK-3 -εξαρτώμενων μονοπατιών υποδεικνύει την ύπαρξη συντονισμένων μηχανισμών απόκρισης στο μιτοχονδριακό στρες για τη φυσιολογική διάρκεια ζωής των *lonp-1* και για την αυξημένη επιβίωσή τους στο οξειδωτικό στρες.

Επιπλέον, τα δεδομένα αυτής της μελέτης, όπως παρουσιάζονται παρακάτω, αποκαλύπτουν μια πιθανή γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ PMK-3 και ZIP-2, η οποία θα μπορούσε να επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των μεταλλαγμένων *lonp-1*. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο *C. elegans* επάγει την απόκριση στην έμφυτη ανοσία που μεσολαβείται εν μέρει από τον ATFS-1 και τον ZIP-2 (Kirienko et al., 2015; Pellegrino et al., 2014; Tjahjono & Kirienko, 2017). Ο μεταγραφικός παράγοντας ZIP-2 έχει σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία του *C. elegans* (Dunbar et al., 2012; Estes et al., 2010; McEwan et al., 2012), αλλά η επαγωγή των στόχων του, *irg-1* και *irg-2*, στα μεταλλάγματα *lonp-1* δεν είναι επαρκής για την προστασία τους από τη μόλυνση από το παθογόνο *P. aeruginosa*. Η δραστηριότητα όμως του ZIP-2 απαιτεί την λειτουργικότητα της κινάσης PMK-3 σε σκουλήκια αγρίου

τύπου και *lonp-1*, παρά το γεγονός πως η PMK-3 δεν συμμετέχει στην έμφυτη ανοσία των μεταλλαγμάτων *lonp-1*.

Ανεξάρτητα από το ρόλο του στην ανοσία, ο ZIP-2 ενεργοποιείται επίσης λόγω της μιτοχοδριακής δυσλειτουργίας που βιώνουν τα σκουλήκια κατά τη γήρανση και καθυστερεί τους φαινότυπους της γήρανσης, διατηρώντας τη μιτοχονδριακή ομοιόσταση σε γερασμένα σκουλήκια (Hahm et al., 2020). Επιπλέον, έχει σημαντικό ρόλο στη μακροζωία που προκύπτει κατά το διαιτητικό περιορισμό (Hahm et al., 2019; Hahm et al., 2023). Η έλλειψη του *zip-2* ή του *pmk-3* μειώνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής μόνο των μεταλλαγμάτων *lonp-1*, χωρίς να επηρεάζει τη διάρκεια ζωής των αγρίου τύπου ατόμων. Αυτό υποδηλώνει, πιθανώς, πως η ενεργοποίηση του μονοπατιού της έμφυτης ανοσίας που εξαρτάται από το ZIP-2 και απαιτεί τη δράση της PMK-3, είναι σημαντική για τη ρύθμιση της γήρανσης σε συνθήκες μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Αυτή η άποψη ενισχύεται από την παρατήρηση πως η σηματοδότηση DLK-1/ PMK-3 μειώνεται με την ηλικία, αλλά είναι ένας καθοριστικός παράγοντας που ελέγχει την παράταση της ζωής των μεταλλαγμάτων με δυσλειτουργική αναπνευστική αλυσίδα (Radetskaya et al., 2019). Η μελλοντική διερεύνηση του υποκείμενου μοριακού μηχανισμού και οι μεταγραφικοί του στόχοι, αναμένεται να αποσαφηνίσει τους σχετικούς ρυθμιστές της γήρανσης.

Εκτός από το ρόλο του PMK-3 στη διάρκεια ζωής και στη διαφοροποίηση των αισθητικών νευρώνων BAG (Horowitz et al., 2019; Munkacsy et al., 2016), ελάχιστα είναι γνωστά για τη συμμετοχή του στην διασφάλιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε φυσιολογικές και μιτοχονδριακού στρες συνθήκες. Στην παρούσα μελέτη, γίνεται φανερό πως η δράση του PMK-3 είναι απαραίτητη για την επιβίωση των σκουληκιών σε οξειδωτικό και θερμικό στρες σε φυσιολογικές και μιτοχονδριακού στρες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη και των δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για τις κινάσες PMK-1 και PMK-3 μειώνουν την επιβίωση των μεταλλαγμάτων *lonp-1* στο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο κατά το οξειδωτικό στρες συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια μέσω Αντιμυκίνης A, μόνο η έλλειψη του *pmk-3*, και όχι του *pmk-1*, μειώνει την επιβίωση των σκουληκιών αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας πως η κινάση PMK-3 απαιτείται γενικά για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στα μιτοχόνδρια. Ακόμη, η έλλειψη του *pmk-3* μειώνει σημαντικά την επιβίωση και των δύο στελεχών στο θερμικό στρες. Η έλλειψη του *pmk-1* δεν έχει επίδραση στη θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1*, αλλά μειώνει την επιβίωση των αγρίου τύπου, σε συμφωνία με το γεγονός πως η κινάση PMK-1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση των σκουληκιών στο θερμικό στρες και πως η αύξηση της θερμοκρασίας επάγει τη μετατόπισή της στον πυρήνα (Mertenskötter et al., 2013). Ίσως η δράση της PMK-1 συμβάλλει στην αυξημένη έκφραση των γονιδίων *hsp* και άλλων μοριακών συνοδών μέσω της υπερφωσφορύλωσης του HSF-1, παρόμοια με την ενεργοποίηση του HSF1 των θηλαστικών από το στρες (Dayalan Naidu et al., 2016). Ο HSF-1 είναι το μοναδικό ομόλογο του σκουληκιού και οι λειτουργίες του στην απόκριση στο θερμικό στρες ρυθμίζονται στενά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Kyriakou et al., 2022). Δεδομένου ότι η μεγάλη θερμοανθεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* απαιτεί τη δραστηριότητα του HSF-1 και του PMK-3, αλλά όχι του PMK-1, ίσως η κινάση PMK-3 μεσολαβεί στη λειτουργία του HSF-1 ή των ρυθμιστών του στα μεταλλάγματα *lonp-1*, ως απόκριση στο θερμικό στρες. Πρόσφατη μελέτη στα θηλαστικά έδειξε τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης LONP1 υπό συνθήκες θερμικού στρες όπου αλληλεπιδρά με τον HSF1 και πιθανώς τον αποικοδομεί στον πυρήνα (Gibellini et al., 2022). Στα θηλαστικά υπάρχουν τέσσερις ισομορφές της p38/ MAPK, όμοιες με την PMK-1 στο *C. elegans*, αλλά παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και ενεργοποίησης, καθώς και διαφορετικούς καταρροϊκούς στόχους (Maik-Rachline et al., 2020; Melamed Kadosh et al., 2023). Μελλοντική έρευνα στα θηλαστικά, θα μπορούσε να αναδείξει αν η κάποια ισομορφή της p38/MAPK έχει παρόμοιο ρυθμιστικό ρόλο ή κυτταρικές λειτουργίες με την PMK-3, συνεισφέροντας στην γήρανση και απόκριση στο στρες του οργανισμού ή στη δράση της πρωτεΐνης LONP1 και του HSF-1.

Συμπερασματικά, το γονίδιο *lonp-1* στο *C. elegans* κωδικοποιεί για μια μιτοχονδριακή πρωτεάση AAA⁺, η οποία έχει κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών σε όλα τα είδη. Η απουσία της πρωτεάσης LONP-1 από το νηματώδη επηρεάζει πολλούς παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια, για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και την προσαρμογή του οργανισμού σε διάφορα είδη περιβαλλοντικού στρες. Μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται είναι το UPR^{mt}, η αντιοξειδωτική απόκριση, η απόκριση στο θερμικό στρες και το μιτοχονδριακό PMK-3/p38 MAPK (MAPK^{mt}). Ακόμη τα γενετικά μεταλλαγμένα σκουλήκια *lonp-1* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ορισμένες μορφές οξειδωτικού στρες, στο οσμωτικό στρες και στο θερμικό στρες, μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών μηχανισμών ελέγχου ποιότητας. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του UPR^{mt} στα μεταλλάγματα *lonp-1* εξαρτάται από την αυξημένη δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα ATFS-1, που δρα κατασταλτικά στην ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK^{mt}. Με τον τρόπο αυτό υποδεικνύεται πως η απόκριση στο μιτοχονδριακό στρες ρυθμίζεται από πολλά μονοπάτια που αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν την μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου, αναλόγως της έντασης ή του τρόπου που δημιουργείται το στρες. Πράγματι, η καταστολή του PMK-3/p38 MAPK από τον ATFS-1 είναι ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός που συντονίζει την απόκριση στο μιτοχονδριακό στρες, καθώς η ενεργοποίηση του ATFS-1 και του PMK-3 είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική διάρκεια ζωής και απόκριση στο στρες των μεταλλαγμάτων *lonp-1*. Επιπλέον, η δράση του PMK-3 απαιτείται τόσο για τη βασική μεταγραφική δραστηριότητα του bZip μεταγραφικού παράγοντα ZIP-2, όσο και την επαγόμενη από την έλλειψη του *lonp-1*. Είναι γνωστό πως ο ZIP-2 διατηρεί τη μιτοχονδριακή ομοιόσταση κατά τη διαδικασία της γήρανσης του *C. elegans*, ανεξάρτητα της δράσης του στην ανοσία, και η έλλειψή του μειώνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής των μεταλλαγμάτων *lonp-1*. Πιθανώς η γενετική αλληλεπίδραση του PMK-3 και του ZIP-2 ρυθμίζει τη διαδικασία της γήρανσης όταν υπάρχει μιτοχονδριακό στρες. Τέλος, διαπιστώθηκε πως η μεγάλη θερμοανεκτικότητα των μεταλλαγμάτων *lonp-1* απαιτεί τη δραστηριότητα της κινάσης PMK-3, αποκαλύπτοντας έναν νέο ρόλο του μονοπατιού MAPK^{mt} στην απόκριση στο θερμικό στρες.

E. Βιβλιογραφία

- Amartuvshin, O., Lin, C. H., Hsu, S. C., Kao, S. H., Chen, A., Tang, W. C., Chou, H. L., Chang, D. L., Hsu, Y. Y., Hsiao, B. S., Rastegari, E., Lin, K. Y., Wang, Y. T., Yao, C. K., Chen, G. C., Chen, B. C., & Hsu, H. J. (2020). Aging shifts mitochondrial dynamics toward fission to promote germline stem cell loss. *Aging Cell*, 19(8), e13191. <https://doi.org/10.1111/ace1.13191>
- Amorim, J. A., Coppotelli, G., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Ross, J. M., & Sinclair, D. A. (2022). Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*, 18(4), 243-258. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>
- An, J. H., & Blackwell, T. K. (2003). SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev*, 17(15), 1882-1893. <https://doi.org/10.1101/gad.1107803>
- Anderson, N. S., & Haynes, C. M. (2020). Folding the Mitochondrial UPR into the Integrated Stress Response. *Trends Cell Biol*, 30(6), 428-439. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.001>
- Andréasson, C., Ott, M., & Büttner, S. (2019). Mitochondria orchestrate proteostatic and metabolic stress responses. *EMBO Rep*, 20(10), e47865. <https://doi.org/10.15252/embr.201947865>
- Andrusiak, M. G., & Jin, Y. (2016). Context Specificity of Stress-activated Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Signaling: The Story as Told by *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 291(15), 7796-7804. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711101>
- Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., & Kenyon, C. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 295(5554), 502-505. <https://doi.org/10.1126/science.1065768>
- Armanios, M., Alder, J. K., Parry, E. M., Karim, B., Strong, M. A., & Greider, C. W. (2009). Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet*, 85(6), 823-832. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.10.028>
- Asin-Cayuela, J., & Gustafsson, C. M. (2007). Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, 32(3), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.01.003>
- Aspernig, H., Heimbucher, T., Qi, W., Gangurde, D., Curic, S., Yan, Y., Donner von Gromoff, E., Baumeister, R., & Thien, A. (2019). Mitochondrial Perturbations Couple mTORC2 to Autophagy in *C. elegans*. *Cell Rep*, 29(6), 1399-1409.e1395. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.072>
- Back, P., De Vos, W. H., Depuydt, G. G., Matthijssens, F., Vanfleteren, J. R., & Braeckman, B. P. (2012). Exploring real-time in vivo redox biology of developing and aging *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(5), 850-859. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.037>
- Bahat, A., Perlberg, S., Melamed-Book, N., Isaac, S., Eden, A., Lauria, I., Langer, T., & Orly, J. (2015). Transcriptional activation of LON Gene by a new form of mitochondrial stress: A role for the nuclear respiratory factor 2 in StAR overload response (SOR). *Mol Cell Endocrinol*, 408, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.022>
- Baird, N. A., Turnbull, D. W., & Johnson, E. A. (2006). Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*, 281(50), 38675-38681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608013200>
- Baker, B. M., Nargund, A. M., Sun, T., & Haynes, C. M. (2012). Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 α kinase GCN-2. *PLoS Genet*, 8(6), e1002760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002760>
- Barazzuol, L., Giamogante, F., Brini, M., & Cali, T. (2020). PINK1/Parkin Mediated Mitophagy, Ca(2+) Signalling, and ER-Mitochondria Contacts in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051772>
- Bárcena, C., Valdés-Mas, R., Mayoral, P., Garabaya, C., Durand, S., Rodríguez, F., Fernández-García, M. T., Salazar, N., Nogacka, A. M., Garatachea, N., Bossut, N., Aprahamian, F., Lucia, A., Kroemer, G., Freije, J. M. P., Quirós, P. M., & López-Otín, C. (2019). Healthspan and lifespan extension by

- fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat Med*, 25(8), 1234-1242. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0504-5>
- Barthelme, D., & Sauer, R. T. (2016). Origin and Functional Evolution of the Cdc48/p97/VCP AAA+ Protein Unfolding and Remodeling Machine. *J Mol Biol*, 428(9 Pt B), 1861-1869. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.015>
- Barzilai, N., Huffman, D. M., Muzumdar, R. H., & Bartke, A. (2012). The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*, 61(6), 1315-1322. <https://doi.org/10.2337/db11-1300>
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L., & Pfeifer, G. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett*, 241(1-2), 239-245. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81069-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81069-x)
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hersheson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*, 38(5), 515-517. <https://doi.org/10.1038/ng1769>
- Benedetti, C., Haynes, C. M., Yang, Y., Harding, H. P., & Ron, D. (2006). Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. *Genetics*, 174(1), 229-239. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061580>
- Bennett, C. F., & Kaerberlein, M. (2014). The mitochondrial unfolded protein response and increased longevity: cause, consequence, or correlation? *Exp Gerontol*, 56, 142-146. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.02.002>
- Bennett, C. F., Vander Wende, H., Simko, M., Klum, S., Barfield, S., Choi, H., Pineda, V. V., & Kaerberlein, M. (2014). Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*, 5, 3483. <https://doi.org/10.1038/ncomms4483>
- Berman, K., McKay, J., Avery, L., & Cobb, M. (2001). Isolation and characterization of pmk-(1-3): three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4(6), 337-344. <https://doi.org/10.1006/mcbr.2001.0300>
- Bernstein, S. H., Venkatesh, S., Li, M., Lee, J., Lu, B., Hilchey, S. P., Morse, K. M., Metcalfe, H. M., Skalska, J., Andreeff, M., Brookes, P. S., & Suzuki, C. K. (2012). The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives. *Blood*, 119(14), 3321-3329. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-340075>
- Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Jacoupy, M., Traver, S., Grenier, K., Greene, A. W., Dauphin, A., Waharte, F., Bayot, A., Salamero, J., Lombès, A., Bulteau, A. L., Fon, E. A., Brice, A., & Corti, O. (2013). The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance. *Autophagy*, 9(11), 1801-1817. <https://doi.org/10.4161/auto.25884>
- Besse, A., Brezavar, D., Hanson, J., Larson, A., & Bonnen, P. E. (2020). LONP1 de novo dominant mutation causes mitochondrial encephalopathy with loss of LONP1 chaperone activity and excessive LONP1 proteolytic activity. *Mitochondrion*, 51, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.01.004>
- Bezawork-Geleta, A., Brodie, E. J., Dougan, D. A., & Truscott, K. N. (2015). LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins. *Sci Rep*, 5, 17397. <https://doi.org/10.1038/srep17397>
- Bishop, T., Lau, K. W., Epstein, A. C., Kim, S. K., Jiang, M., O'Rourke, D., Pugh, C. W., Gleadle, J. M., Taylor, M. S., Hodgkin, J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Genetic analysis of pathways regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, 2(10), e289. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020289>
- Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 350(6265), 1193-1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>

- Blackwell, T. K., Steinbaugh, M. J., Hourihan, J. M., Ewald, C. Y., & Isik, M. (2015). SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*, *88*(Pt B), 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, *6*(8), 611-622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, *279*(5349), 349-352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>
- Borissenko, L., & Groll, M. (2007). 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev*, *107*(3), 687-717. <https://doi.org/10.1021/cr0502504>
- Bota, D. A., & Davies, K. J. (2016). Mitochondrial Lon protease in human disease and aging: Including an etiologic classification of Lon-related diseases and disorders. *Free Radic Biol Med*, *100*, 188-198. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.031>
- Bota, D. A., Ngo, J. K., & Davies, K. J. (2005). Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic Biol Med*, *38*(5), 665-677. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.017>
- Bounoutas, A., Kratz, J., Emtage, L., Ma, C., Nguyen, K. C., & Chalfie, M. (2011). Microtubule depolymerization in *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons reduces gene expression through a p38 MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(10), 3982-3987. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101360108>
- Brandt, J. P., & Ringstad, N. (2015). Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior. *Curr Biol*, *25*(17), 2228-2237. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.037>
- Bretón-Romero, R., & Lamas, S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol*, *2*, 529-534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>
- Burkewitz, K., Choe, K., & Strange, K. (2011). Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in *C. elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol*, *301*(3), C566-576. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00030.2011>
- Burkewitz, K., Choe, K. P., Lee, E. C., Deonaraine, A., & Strange, K. (2012). Characterization of the proteostasis roles of glycerol accumulation, protein degradation and protein synthesis during osmotic stress in *C. elegans*. *PLoS One*, *7*(3), e34153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034153>
- Burtner, C. R., & Kennedy, B. K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(8), 567-578. <https://doi.org/10.1038/nrm2944>
- Butler, J. A., Ventura, N., Johnson, T. E., & Rea, S. L. (2010). Long-lived mitochondrial (Mit) mutants of *Caenorhabditis elegans* utilize a novel metabolism. *Faseb j*, *24*(12), 4977-4988. <https://doi.org/10.1096/fj.10-162941>
- Byrne, J. J., Soh, M. S., Chandhok, G., Vijayaraghavan, T., Teoh, J. S., Crawford, S., Cobham, A. E., Yapa, N. M. B., Mirth, C. K., & Neumann, B. (2019). Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Life Sci*, *76*(10), 1967-1985. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03024-5>
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, *29*(3-4), 222-230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)
- Calderwood, S. K., Murshid, A., & Prince, T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology*, *55*(5), 550-558. <https://doi.org/10.1159/000225957>
- Campos, J. C., Wu, Z., Rudich, P. D., Soo, S. K., Mistry, M., Ferreira, J. C., Blackwell, T. K., & Van Raamsdonk, J. M. (2021). Mild mitochondrial impairment enhances innate immunity and longevity through ATFS-1 and p38 signaling. *EMBO Rep*, *22*(12), e52964. <https://doi.org/10.15252/embr.202152964>

- Carrasco, E., Gómez de Las Heras, M. M., Gabandé-Rodríguez, E., Desdín-Micó, G., Aranda, J. F., & Mittelbrunn, M. (2022). The role of T cells in age-related diseases. *Nat Rev Immunol*, 22(2), 97-111. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00557-4>
- Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 46(2), 326-342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)
- Cha, S. S., An, Y. J., Lee, C. R., Lee, H. S., Kim, Y. G., Kim, S. J., Kwon, K. K., De Donatis, G. M., Lee, J. H., Maurizi, M. R., & Kang, S. G. (2010). Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber. *Embo j*, 29(20), 3520-3530. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.226>
- Chan, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125(7), 1241-1252. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.010>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3), 527-605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chang, L., Fan, W., Pan, X., & Zhu, X. (2022). Stem cells to reverse aging. *Chin Med J (Engl)*, 135(8), 901-910. <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000001984>
- Chen, H., & Chan, D. C. (2004). Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol*, 59, 119-144. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(04\)59005-1](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(04)59005-1)
- Chen, S. H., Suzuki, C. K., & Wu, S. H. (2008). Thermodynamic characterization of specific interactions between the human Lon protease and G-quartet DNA. *Nucleic Acids Res*, 36(4), 1273-1287. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1140>
- Cheng, I., Mikita, N., Fishovitz, J., Frase, H., Wintrode, P., & Lee, I. (2012). Identification of a region in the N-terminus of *Escherichia coli* Lon that affects ATPase, substrate translocation and proteolytic activity. *J Mol Biol*, 418(3-4), 208-225. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.02.039>
- Chiang, Y. C., Liao, C. P., & Pan, C. L. (2022). A serotonergic circuit regulates aversive associative learning under mitochondrial stress in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(11), e2115533119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115533119>
- Chinnery, P. F., & Schon, E. A. (2003). Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(9), 1188-1199. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.9.1188>
- Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2014). Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed Res Int*, 2014, 238463. <https://doi.org/10.1155/2014/238463>
- Chondrogianni, N., Sakellari, M., Lefaki, M., Papaevgeniou, N., & Gonos, E. S. (2014). Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 71, 303-320. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.031>
- Cochemé, H. M., & Murphy, M. P. (2008). Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem*, 283(4), 1786-1798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708597200>
- Cohen, M. M., Leboucher, G. P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M. H., & Weissman, A. M. (2008). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell*, 19(6), 2457-2464. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-02-0227>
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo j*, 21(7), 1616-1627. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1616>
- Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., Kastman, E. K., Kosmatka, K. J., Beasley, T. M., Allison, D. B., Cruzen, C., Simmons, H. A., Kemnitz, J. W., & Weindruch, R. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325(5937), 201-204. <https://doi.org/10.1126/science.1173635>

- Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2012). Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle*, *11*(12), 2260-2267. <https://doi.org/10.4161/cc.20437>
- Costa-Mattioli, M., & Walter, P. (2020). The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science*, *368*(6489). <https://doi.org/10.1126/science.aat5314>
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J. F., Kohara, Y., & Ewbank, J. J. (2004). TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol*, *5*(5), 488-494. <https://doi.org/10.1038/ni1060>
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*, *6*, 472-485. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>
- Daras, G., Rigas, S., Tsitsekian, D., Zur, H., Tuller, T., & Hatzopoulos, P. (2014). Alternative transcription initiation and the AUG context configuration control dual-organellar targeting and functional competence of Arabidopsis Lon1 protease. *Mol Plant*, *7*(6), 989-1005. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu030>
- Dayalan Naidu, S., Sutherland, C., Zhang, Y., Risco, A., de la Vega, L., Caunt, C. J., Hastie, C. J., Lamont, D. J., Torrente, L., Chowdhry, S., Benjamin, I. J., Keyse, S. M., Cuenda, A., & Dinkova-Kostova, A. T. (2016). Heat Shock Factor 1 Is a Substrate for p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol Cell Biol*, *36*(18), 2403-2417. <https://doi.org/10.1128/mcb.00292-16>
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., & Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*, *22*(7), 832-853. <https://doi.org/10.1101/gad.1652708>
- Deng, P., Uma Naresh, N., Du, Y., Lamech, L. T., Yu, J., Zhu, L. J., Pukkila-Worley, R., & Haynes, C. M. (2019). Mitochondrial UPR repression during *Pseudomonas aeruginosa* infection requires the bZIP protein ZIP-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(13), 6146-6151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817259116>
- Deol, K. K., Lorenz, S., & Strieter, E. R. (2019). Enzymatic Logic of Ubiquitin Chain Assembly. *Front Physiol*, *10*, 835. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00835>
- Desdín-Micó, G., Soto-Heredero, G., Aranda, J. F., Oller, J., Carrasco, E., Gabandé-Rodríguez, E., Blanco, E. M., Alfranca, A., Cussó, L., Desco, M., Ibañez, B., Gortazar, A. R., Fernández-Marcos, P., Navarro, M. N., Hernaez, B., Alcamí, A., Baixauli, F., & Mittelbrunn, M. (2020). T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. *Science*, *368*(6497), 1371-1376. <https://doi.org/10.1126/science.aax0860>
- Deshwal, S., Fiedler, K. U., & Langer, T. (2020). Mitochondrial Proteases: Multifaceted Regulators of Mitochondrial Plasticity. *Annu Rev Biochem*, *89*, 501-528. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012739>
- Devasagayam, T. P., Boloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys*, *40*(5), 300-308.
- Dickinson, D. J., & Goldstein, B. (2016). CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. *Genetics*, *202*(3), 885-901. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182162>
- Dillin, A., Hsu, A. L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., & Kenyon, C. (2002). Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science*, *298*(5602), 2398-2401. <https://doi.org/10.1126/science.1077780>
- Dinkova-Kostova, A. T., Liby, K. T., Stephenson, K. K., Holtzclaw, W. D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G. W., Sporn, M. B., & Talalay, P. (2005). Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(12), 4584-4589. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500815102>

- Dokshin, G. A., Ghanta, K. S., Piscopo, K. M., & Mello, C. C. (2018). Robust Genome Editing with Short Single-Stranded and Long, Partially Single-Stranded DNA Donors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *210*(3), 781-787. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301532>
- Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., & Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci*, *70*(19), 3493-3511. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6>
- Dorman, J. B., Albinder, B., Shroyer, T., & Kenyon, C. (1995). The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *141*(4), 1399-1406. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.4.1399>
- Dues, D. J., Andrews, E. K., Schaar, C. E., Bergsma, A. L., Senchuk, M. M., & Van Raamsdonk, J. M. (2016). Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways. *Aging (Albany NY)*, *8*(4), 777-795. <https://doi.org/10.18632/aging.100939>
- Dues, D. J., Andrews, E. K., Senchuk, M. M., & Van Raamsdonk, J. M. (2019). Resistance to Stress Can Be Experimentally Dissociated From Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *74*(8), 1206-1214. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly213>
- Dues, D. J., Schaar, C. E., Johnson, B. K., Bowman, M. J., Winn, M. E., Senchuk, M. M., & Van Raamsdonk, J. M. (2017). Uncoupling of oxidative stress resistance and lifespan in long-lived isp-1 mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*, *108*, 362-373. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.004>
- Dunbar, T. L., Yan, Z., Balla, K. M., Smelkinson, M. G., & Troemel, E. R. (2012). *C. elegans* detects pathogen-induced translational inhibition to activate immune signaling. *Cell Host Microbe*, *11*(4), 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.008>
- Durieux, J., Wolff, S., & Dillin, A. (2011). The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*, *144*(1), 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.016>
- Edgar, D., Shabalina, I., Camara, Y., Wredenberg, A., Calvaruso, M. A., Nijtmans, L., Nedergaard, J., Cannon, B., Larsson, N. G., & Trifunovic, A. (2009). Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab*, *10*(2), 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.06.010>
- Ekstrand, M. I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C. B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C. M., & Larsson, N. G. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*, *13*(9), 935-944. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh109>
- English, J., Son, J. M., Cardamone, M. D., Lee, C., & Perissi, V. (2020). Decoding the rosetta stone of mitonuclear communication. *Pharmacol Res*, *161*, 105161. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105161>
- Erjavec, N., Bayot, A., Gareil, M., Camougrand, N., Nystrom, T., Friguet, B., & Bulteau, A. L. (2013). Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome. *Free Radic Biol Med*, *56*, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.019>
- Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*, *91*(3 Pt 2), 227s-255s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.227s>
- Estes, K. A., Dunbar, T. L., Powell, J. R., Ausubel, F. M., & Troemel, E. R. (2010). bZIP transcription factor zip-2 mediates an early response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(5), 2153-2158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914643107>
- Ewald, C. Y., Hourihan, J. M., & Blackwell, T. K. (2017). Oxidative Stress Assays (arsenite and tBHP) in *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc*, *7*(13). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2365>
- Ewbank, J. J., Barnes, T. M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H., & Hekimi, S. (1997). Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene clk-1. *Science*, *275*(5302), 980-983. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.980>
- Farboud, B., Severson, A. F., & Meyer, B. J. (2019). Strategies for Efficient Genome Editing Using CRISPR-Cas9. *Genetics*, *211*(2), 431-457. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301775>

- Feng, J., Bussi re, F., & Hekimi, S. (2001). Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell*, 1(5), 633-644. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00071-5](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00071-5)
- Fielenbach, N., & Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev*, 22(16), 2149-2165. <https://doi.org/10.1101/gad.1701508>
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 78, 477-513. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>
- Fiorese, C. J., Schulz, A. M., Lin, Y. F., Rosin, N., Pellegrino, M. W., & Haynes, C. M. (2016). The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Curr Biol*, 26(15), 2037-2043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.002>
- Flores, I., & Blasco, M. A. (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett*, 584(17), 3826-3830. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.042>
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328(5976), 321-326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Forsberg, L. A., Rasi, C., Razzaghiyan, H. R., Pakalapati, G., Waite, L., Thilbeault, K. S., Ronowicz, A., Wineinger, N. E., Tiwari, H. K., Boomsma, D., Westerman, M. P., Harris, J. R., Lyle, R., Essand, M., Eriksson, F., Assimes, T. L., Iribarren, C., Strachan, E., O'Hanlon, T. P., Rider, L. G., Miller, F. W., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Piotrowski, A., Pedersen, N. L., Absher, D., & Dumanski, J. P. (2012). Age-related somatic structural changes in the nuclear genome of human blood cells. *Am J Hum Genet*, 90(2), 217-228. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.009>
- Fraga, M. F., & Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*, 23(8), 413-418. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.008>
- Franz, A., Ackermann, L., & Hoppe, T. (2014). Create and preserve: proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP. *Biochim Biophys Acta*, 1843(1), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.031>
- Fu, G. K., & Markovitz, D. M. (1998). The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry*, 37(7), 1905-1909. <https://doi.org/10.1021/bi970928c>
- Fu, Z., Ye, J., Dean, J. W., Bostick, J. W., Weinberg, S. E., Xiong, L., Oliff, K. N., Chen, Z. E., Avram, D., Chandel, N. S., & Zhou, L. (2019). Requirement of Mitochondrial Transcription Factor A in Tissue-Resident Regulatory T Cell Maintenance and Function. *Cell Rep*, 28(1), 159-171.e154. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.024>
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J. W., Shimoda, L., Dang, C. V., & Semenza, G. L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 129(1), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.047>
- Gao, K., Li, Y., Hu, S., & Liu, Y. (2019). SUMO peptidase ULP-4 regulates mitochondrial UPR-mediated innate immunity and lifespan extension. *Elife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.41792>
- Ghosh, J. C., Seo, J. H., Agarwal, E., Wang, Y., Kossenkov, A. V., Tang, H. Y., Speicher, D. W., & Altieri, D. C. (2019). Akt phosphorylation of mitochondrial Lonp1 protease enables oxidative metabolism and advanced tumor traits. *Oncogene*, 38(43), 6926-6939. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0939-7>
- Gibellini, L., Borella, R., De Gaetano, A., Zanini, G., Tartaro, D. L., Carnevale, G., Beretti, F., Losi, L., De Biasi, S., Nasi, M., Forcato, M., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2022). Evidence for mitochondrial Lonp1 expression in the nucleus. *Sci Rep*, 12(1), 10877. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14860-0>
- Gibellini, L., De Gaetano, A., Mandrioli, M., Van Tongeren, E., Bortolotti, C. A., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2020). The biology of Lonp1: More than a mitochondrial protease. *Int Rev Cell Mol Biol*, 354, 1-61. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.02.005>
- Gibellini, L., Pinti, M., Bartolomeo, R., De Biasi, S., Cormio, A., Musicco, C., Carnevale, G., Pecorini, S., Nasi, M., De Pol, A., & Cossarizza, A. (2015). Inhibition of Lon protease by triterpenoids alters

- mitochondria and is associated to cell death in human cancer cells. *Oncotarget*, 6(28), 25466-25483. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4510>
- Gibellini, L., Pinti, M., Beretti, F., Pierri, C. L., Onofrio, A., Riccio, M., Carnevale, G., De Biasi, S., Nasi, M., Torelli, F., Boraldi, F., De Pol, A., & Cossarizza, A. (2014). Sirtuin 3 interacts with Lon protease and regulates its acetylation status. *Mitochondrion*, 18, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.08.001>
- Glover-Cutter, K. M., Lin, S., & Blackwell, T. K. (2013). Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf. *PLoS Genet*, 9(9), e1003701. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003701>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., & Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109-1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>
- Greene, A. W., Grenier, K., Aguilera, M. A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M. E., McBride, H. M., Park, D. S., & Fon, E. A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep*, 13(4), 378-385. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.14>
- Greer, E. L., Maures, T. J., Hauswirth, A. G., Green, E. M., Leeman, D. S., Maro, G. S., Han, S., Banko, M. R., Gozani, O., & Brunet, A. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature*, 466(7304), 383-387. <https://doi.org/10.1038/nature09195>
- Gruber, R., Koch, H., Doll, B. A., Tegtmeyer, F., Einhorn, T. A., & Hollinger, J. O. (2006). Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol*, 41(11), 1080-1093. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.09.008>
- Gur, E., & Sauer, R. T. (2008). Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev*, 22(16), 2267-2277. <https://doi.org/10.1101/gad.1670908>
- Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N. G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, 85, 133-160. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>
- Guzy, R. D., & Schumacker, P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*, 91(5), 807-819. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.033506>
- Hahm, J. H., Jeong, C., Lee, W., Koo, H. J., Kim, S., Hwang, D., & Nam, H. G. (2020). A cellular surveillance and defense system that delays aging phenotypes in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)*, 12(9), 8202-8220. <https://doi.org/10.18632/aging.103134>
- Hahm, J. H., Jeong, C., & Nam, H. G. (2019). Diet restriction-induced healthy aging is mediated through the immune signaling component ZIP-2 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 18(5), e12982. <https://doi.org/10.1111/acer.12982>
- Hahm, J. H., Nirmala, F. S., Choi, P. G., Seo, H. D., Ha, T. Y., Jung, C. H., & Ahn, J. (2023). The innate immune signaling component FBXC-58 mediates dietary restriction effects on healthy aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*, 15(1), 21-36. <https://doi.org/10.18632/aging.204477>
- Haigis, M. C., & Yankner, B. A. (2010). The aging stress response. *Mol Cell*, 40(2), 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.002>
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31(4), 261-272. <https://doi.org/10.1080/10715769900300841>

- Hamilton, B., Dong, Y., Shindo, M., Liu, W., Odell, I., Ruvkun, G., & Lee, S. S. (2005). A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev*, *19*(13), 1544-1555. <https://doi.org/10.1101/gad.1308205>
- Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E. M., & Bastiani, M. (2009). Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science*, *323*(5915), 802-806. <https://doi.org/10.1126/science.1165527>
- Han, S., & Brunet, A. (2012). Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol*, *22*(1), 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.001>
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, *20*(4), 145-147. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x>
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N. L., Wilkinson, J. E., Frenkel, K., Carter, C. S., Pahor, M., Javors, M. A., Fernandez, E., & Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, *460*(7253), 392-395. <https://doi.org/10.1038/nature08221>
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, *475*(7356), 324-332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hartman, P. S., Ishii, N., Kayser, E. B., Morgan, P. G., & Sedensky, M. M. (2001). Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*, *122*(11), 1187-1201. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00259-7](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00259-7)
- Haynes, C. M., & Hekimi, S. (2022). Mitochondrial dysfunction, aging, and the mitochondrial unfolded protein response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *222*(4). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac160>
- Haynes, C. M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y., & Ron, D. (2007). ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell*, *13*(4), 467-480. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.016>
- Haynes, C. M., Yang, Y., Blais, S. P., Neubert, T. A., & Ron, D. (2010). The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell*, *37*(4), 529-540. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.015>
- He, L., Luo, D., Yang, F., Li, C., Zhang, X., Deng, H., & Zhang, J. R. (2018). Multiple domains of bacterial and human Lon proteases define substrate selectivity. *Emerg Microbes Infect*, *7*(1), 149. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0148-4>
- Hekimi, S., Lapointe, J., & Wen, Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol*, *21*(10), 569-576. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.008>
- Heo, J.-M., Livnat-Levanon, N., Taylor, E. B., Jones, K. T., Dephoure, N., Ring, J., Xie, J., Brodsky, J. L., Madeo, F., Gygi, S. P., Ashrafi, K., Glickman, M. H., & Rutter, J. (2010). A Stress-Responsive System for Mitochondrial Protein Degradation. *Molecular Cell*, *40*(3), 465-480. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.021>
- Herndon, L. A., Wolkow, C. A., Driscoll, M., & Hall, D. H. (2017). Effects of Ageing on the Basic Biology and Anatomy of *C. elegans*.
- Herrmann, J. M., & Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal*, *13*(9), 1341-1358. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3063>
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem*, *83*, 779-812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S. C., Neuber, O., & Sommer, T. (2009). The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*, *458*(7237), 453-460. <https://doi.org/10.1038/nature07962>
- Hirsilä, M., Koivunen, P., Xu, L., Seeley, T., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2005). Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *Faseb j*, *19*(10), 1308-1310. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3399fje>
- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, *361*(15), 1475-1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>

- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418), 1313-1318. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>
- Honda, Y., & Honda, S. (1999). The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb j*, 13(11), 1385-1393.
- Hong, M., Kwon, J. Y., Shim, J., & Lee, J. (2004). Differential hypoxia response of hsp-16 genes in the nematode. *J Mol Biol*, 344(2), 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.077>
- Horowitz, L. B., Brandt, J. P., & Ringstad, N. (2019). Repression of an activity-dependent autocrine insulin signal is required for sensory neuron development in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 146(22), dev182873. <https://doi.org/10.1242/dev.182873>
- Houtkooper, R. H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., Williams, R. W., & Auwerx, J. (2013). Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*, 497(7450), 451-457. <https://doi.org/10.1038/nature12188>
- Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook*, 1-19. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>
- Hu, Y., Li, J., Lou, B., Wu, R., Wang, G., Lu, C., Wang, H., Pi, J., & Xu, Y. (2020). The Role of Reactive Oxygen Species in Arsenic Toxicity. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020240>
- Hurd, D. D. (2018). Tubulins in *C. elegans*. *WormBook*, 2018, 1-32. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.182.1>
- Hwang, J., & Qi, L. (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci*, 43(8), 593-605. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.005>
- Irazoqui, J. E., Urbach, J. M., & Ausubel, F. M. (2010). Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol*, 10(1), 47-58. <https://doi.org/10.1038/nri2689>
- Isaac, R. S., McShane, E., & Churchman, L. S. (2018). The Multiple Levels of Mitonuclear Coregulation. *Annu Rev Genet*, 52, 511-533. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031709>
- Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P. S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ayusawa, D., & Suzuki, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, 394(6694), 694-697. <https://doi.org/10.1038/29331>
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H. E., Saito, Y., Waring, M. T., Dombkowski, D. M., Cheng, T., DePinho, R. A., Sharpless, N. E., & Scadden, D. T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443(7110), 421-426. <https://doi.org/10.1038/nature05159>
- Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J. H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J. W., Maratos-Flier, E., & Depinho, R. A. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 469(7328), 102-106. <https://doi.org/10.1038/nature09603>
- Jensen, M. B., & Jasper, H. (2014). Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metab*, 20(2), 214-225. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.006>
- Jin, S. M., & Youle, R. J. (2013). The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy*, 9(11), 1750-1757. <https://doi.org/10.4161/auto.26122>
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*, 13, 89. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Kahn, N. W., Rea, S. L., Moyle, S., Kell, A., & Johnson, T. E. (2008). Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*, 409(1), 205-213. <https://doi.org/10.1042/bj20070521>

- Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., Bar-Joseph, Z., & Cohen, H. Y. (2012). The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*, *483*(7388), 218-221. <https://doi.org/10.1038/nature10815>
- Kao, T. Y., Chiu, Y. C., Fang, W. C., Cheng, C. W., Kuo, C. Y., Juan, H. F., Wu, S. H., & Lee, A. Y. (2015). Mitochondrial Lon regulates apoptosis through the association with Hsp60-mtHsp70 complex. *Cell Death Dis*, *6*(2), e1642. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.9>
- Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P., & Shoubridge, E. A. (2007). The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell*, *18*(9), 3225-3236. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0404>
- Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A., & Murphy, M. P. (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem*, *276*(7), 4588-4596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009093200>
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, *464*(7288), 504-512. <https://doi.org/10.1038/nature08980>
- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Tan, M.-W., & Ausubel, F. M. (2002). A Conserved p38 MAP Kinase Pathway in *Caenorhabditis elegans* Innate Immunity. *Science*, *297*(5581), 623-626. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1073759>
- Kimbrell, D. A., & Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*, *2*(4), 256-267. <https://doi.org/10.1038/35066006>
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *277*(5328), 942-946. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.942>
- Kirienko, N. V., Ausubel, F. M., & Ruvkun, G. (2015). Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(6), 1821-1826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424954112>
- Kirienko, N. V., Kirienko, D. R., Larkins-Ford, J., Wählby, C., Ruvkun, G., & Ausubel, F. M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. *Cell Host Microbe*, *13*(4), 406-416. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.003>
- Klass, M., & Hirsh, D. (1976). Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *260*(5551), 523-525. <https://doi.org/10.1038/260523a0>
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, *290*(5497), 1717-1721. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>
- Koga, H., Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev*, *10*(2), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.001>
- Kopinski, P. K., Janssen, K. A., Schaefer, P. M., Trefely, S., Perry, C. E., Potluri, P., Tintos-Hernandez, J. A., Singh, L. N., Karch, K. R., Campbell, S. L., Doan, M. T., Jiang, H., Nissim, I., Nakamaru-Ogiso, E., Wellen, K. E., Snyder, N. W., Garcia, B. A., & Wallace, D. C. (2019). Regulation of nuclear epigenome by mitochondrial DNA heteroplasmy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(32), 16028-16035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906896116>
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J. F., Saeki, Y., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, *510*(7503), 162-166. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
- Koyuncu, S., Loureiro, R., Lee, H. J., Wagle, P., Krueger, M., & Vilchez, D. (2021). Rewiring of the ubiquitinated proteome determines ageing in *C. elegans*. *Nature*, *596*(7871), 285-290. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03781-z>

- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev*, 24(22), 2463-2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spähr, H., Falkenberg, M., Larsson, N. G., & Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33), 13534-13539. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109263108>
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., & Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(10), 1928-1939. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.007>
- Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci*, 42(11), 873-886. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.002>
- Kyriakou, E., Taouktsi, E., & Syntichaki, P. (2022). The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Mol Sci*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232314907>
- Labbadia, J., Briellmann, R. M., Neto, M. F., Lin, Y. F., Haynes, C. M., & Morimoto, R. I. (2017). Mitochondrial Stress Restores the Heat Shock Response and Prevents Proteostasis Collapse during Aging. *Cell Rep*, 21(6), 1481-1494. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.038>
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). Repression of the Heat Shock Response Is a Programmed Event at the Onset of Reproduction. *Mol Cell*, 59(4), 639-650. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.027>
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A., & van der Bliek, A. M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*, 4(5), 815-826. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80391-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80391-3)
- Larsson, N. G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G. S., & Clayton, D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, 18(3), 231-236. <https://doi.org/10.1038/ng0398-231>
- Lavasani, M., Robinson, A. R., Lu, A., Song, M., Feduska, J. M., Ahani, B., Tilstra, J. S., Feldman, C. H., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., & Huard, J. (2012). Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun*, 3, 608. <https://doi.org/10.1038/ncomms1611>
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441(2), 523-540. <https://doi.org/10.1042/bj20111451>
- Lee, S. J., Hwang, A. B., & Kenyon, C. (2010). Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol*, 20(23), 2131-2136. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.057>
- Lee, S. S., Lee, R. Y., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., & Ruvkun, G. (2003). A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet*, 33(1), 40-48. <https://doi.org/10.1038/ng1056>
- Lee, Y. W., Lee, W. H., & Kim, P. H. (2010). Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium. *Cytokine*, 49(1), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.08.009>
- Leonhard, K., Guiard, B., Pellecchia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W., & Langer, T. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol Cell*, 5(4), 629-638. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80242-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80242-7)
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1-2), 11-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
- Li, L., Nelson, C., Fenske, R., Trösch, J., Pružinská, A., Millar, A. H., & Huang, S. (2017). Changes in specific protein degradation rates in *Arabidopsis thaliana* reveal multiple roles of Lon1 in mitochondrial protein homeostasis. *Plant J*, 89(3), 458-471. <https://doi.org/10.1111/tpj.13392>
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., & Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, 278(10), 8516-8525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200>

- Li, S., Armstrong, C. M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.-O., Han, J.-D. J., Chesneau, A., Hao, T., Goldberg, D. S., Li, N., Martinez, M., Rual, J.-F., Lamesch, P., Xu, L., Tewari, M., Wong, S. L., Zhang, L. V., Berriz, G. F., Jacotot, L., Vaglio, P., Reboul, J., Hirozane-Kishikawa, T., Li, Q., Gabel, H. W., Elewa, A., Baumgartner, B., Rose, D. J., Yu, H., Bosak, S., Sequerra, R., Fraser, A., Mango, S. E., Saxton, W. M., Strome, S., van den Heuvel, S., Piano, F., Vandenhaute, J., Sardet, C., Gerstein, M., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K. C., Harper, J. W., Cusick, M. E., Roth, F. P., Hill, D. E., & Vidal, M. (2004). A Map of the Interactome Network of the Metazoan *C. elegans*. *Science*, *303*(5657), 540-543. <https://doi.org/10.1126/science.1091403>
- Li, T. Y., Sleiman, M. B., Li, H., Gao, A. W., Mottis, A., Bachmann, A. M., El Alam, G., Li, X., Goeminne, L. J. E., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2021). The transcriptional coactivator CBP/p300 is an evolutionarily conserved node that promotes longevity in response to mitochondrial stress. *Nat Aging*, *1*(2), 165-178. <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00025-z>
- Liao, P. C., Wolken, D. M. A., Serrano, E., Srivastava, P., & Pon, L. A. (2020). Mitochondria-Associated Degradation Pathway (MAD) Function beyond the Outer Membrane. *Cell Rep*, *32*(2), 107902. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107902>
- Liberati, N. T., Fitzgerald, K. A., Kim, D. H., Feinbaum, R., Golenbock, D. T., & Ausubel, F. M. (2004). Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(17), 6593-6598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308625101>
- Libina, N., Berman, J. R., & Kenyon, C. (2003). Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell*, *115*(4), 489-502. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00889-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00889-4)
- Lin, K., Dorman, J. B., Rodan, A., & Kenyon, C. (1997). daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *278*(5341), 1319-1322. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1319>
- Link, C. D., Cypser, J. R., Johnson, C. J., & Johnson, T. E. (1999). Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell Stress Chaperones*, *4*(4), 235-242. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1999\)004<0235:doosri>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1999)004<0235:doosri>2.3.co;2)
- Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovicová, G., Kutejová, E., & Suzuki, C. K. (2004). DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J Biol Chem*, *279*(14), 13902-13910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309642200>
- Liu, Y., Samuel, B. S., Breen, P. C., & Ruvkun, G. (2014). *Caenorhabditis elegans* pathways that surveil and defend mitochondria. *Nature*, *508*(7496), 406-410. <https://doi.org/10.1038/nature13204>
- Logan, D. C. (2006). The mitochondrial compartment. *J Exp Bot*, *57*(6), 1225-1243. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj151>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, *186*(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- López-Otín, C., Pietrocola, F., Roiz-Valle, D., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2023). Meta-hallmarks of aging and cancer. *Cell Metab*, *35*(1), 12-35. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.11.001>
- Lu, B., Lee, J., Nie, X., Li, M., Morozov, Y. I., Venkatesh, S., Bogenhagen, D. F., Temiakov, D., & Suzuki, C. K. (2013). Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol Cell*, *49*(1), 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.023>
- Münch, C., & Harper, J. W. (2016). Mitochondrial unfolded protein response controls matrix pre-RNA processing and translation. *Nature*, *534*(7609), 710-713. <https://doi.org/10.1038/nature18302>
- Mack, H. I. D., Heimbucher, T., & Murphy, C. T. (2018). The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for aging research. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *27*, 3-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.11.001>

- Madeo, F., Zimmermann, A., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2015). Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest*, *125*(1), 85-93. <https://doi.org/10.1172/jci73946>
- Maik-Rachline, G., Lifshits, L., & Seger, R. (2020). Nuclear P38: Roles in Physiological and Pathological Processes and Regulation of Nuclear Translocation. *Int J Mol Sci*, *21*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms21176102>
- Mao, K., Ji, F., Breen, P., Sewell, A., Han, M., Sadreyev, R., & Ruvkun, G. (2019). Mitochondrial Dysfunction in *C. elegans* Activates Mitochondrial Relocalization and Nuclear Hormone Receptor-Dependent Detoxification Genes. *Cell Metab*, *29*(5), 1182-1191 e1184. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.022>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*, *11*(1), 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Matsumoto, S., Nakatsukasa, K., Kakuta, C., Tamura, Y., Esaki, M., & Endo, T. (2019). Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. *Mol Cell*, *76*(1), 191-205.e110. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.006>
- Matsushima, Y., Goto, Y., & Kaguni, L. S. (2010). Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(43), 18410-18415. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008924107>
- Matsushima, Y., & Kaguni, L. S. (2012). Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim Biophys Acta*, *1819*(9-10), 1080-1087. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.11.008>
- McEwan, D. L., Kirienko, N. V., & Ausubel, F. M. (2012). Host translational inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Triggers an immune response in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Host Microbe*, *11*(4), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.007>
- Melamed Kadosh, D., Beenstock, J., Engelberg, D., & Admon, A. (2023). Differential Modulation of the Phosphoproteome by the MAP Kinases Isoforms p38 α ; and p38 β . *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(15).
- Melber, A., & Haynes, C. M. (2018). UPR(mt) regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res*, *28*(3), 281-295. <https://doi.org/10.1038/cr.2018.16>
- Melo, J. A., & Ruvkun, G. (2012). Inactivation of conserved *C. elegans* genes engages pathogen- and xenobiotic-associated defenses. *Cell*, *149*(2), 452-466. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.050>
- Mertenskötter, A., Keshet, A., Gerke, P., & Paul, R. J. (2013). The p38 MAPK PMK-1 shows heat-induced nuclear translocation, supports chaperone expression, and affects the heat tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress Chaperones*, *18*(3), 293-306. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0382-y>
- Miller, H. A., Dean, E. S., Pletcher, S. D., & Leiser, S. F. (2020). Cell non-autonomous regulation of health and longevity. *Elife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.62659>
- Miller, K. N., Victorelli, S. G., Salmonowicz, H., Dasgupta, N., Liu, T., Passos, J. F., & Adams, P. D. (2021). Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell*, *184*(22), 5506-5526. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.034>
- Min, J. N., Whaley, R. A., Sharpless, N. E., Lockyer, P., Portbury, A. L., & Patterson, C. (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol*, *28*(12), 4018-4025. <https://doi.org/10.1128/mcb.00296-08>
- Moehle, E. A., Shen, K., & Dillin, A. (2019). Mitochondrial proteostasis in the context of cellular and organismal health and aging. *J Biol Chem*, *294*(14), 5396-5407. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000893>
- Mogilenko, D. A., Shpynov, O., Andhey, P. S., Arthur, L., Swain, A., Esaulova, E., Brioschi, S., Shchukina, I., Kerndl, M., Bambouskova, M., Yao, Z., Laha, A., Zaitsev, K., Burdess, S., Gillfilan, S., Stewart, S. A., Colonna, M., & Artyomov, M. N. (2021). Comprehensive Profiling of an Aging Immune

- System Reveals Clonal GZMK(+) CD8(+) T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging. *Immunity*, 54(1), 99-115.e112. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.005>
- Molofsky, A. V., Slutsky, S. G., Joseph, N. M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N. E., & Morrison, S. J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443(7110), 448-452. <https://doi.org/10.1038/nature05091>
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, 12(24), 3788-3796. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3788>
- Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., & Tanguay, R. M. (2004). Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends Drosophila life span and increases resistance to oxidative stress. *Faseb j*, 18(3), 598-599. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0860fje>
- Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., & Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*, 12(2), 661-684. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H. L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., Frendewey, D., Auerbach, W., Valenzuela, D., Karow, M., Hottiger, M. O., Hursting, S., Barrett, J. C., Guarente, L., Mulligan, R., Demple, B., Yancopoulos, G. D., & Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315-329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
- Mouton-Liger, F., Jacoupy, M., Corvol, J. C., & Corti, O. (2017). PINK1/Parkin-Dependent Mitochondrial Surveillance: From Pleiotropy to Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*, 10, 120. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00120>
- Munkacsy, E., Khan, M. H., Lane, R. K., Borrer, M. B., Park, J. H., Bokov, A. F., Fisher, A. L., Link, C. D., & Rea, S. L. (2016). DLK-1, SEK-3 and PMK-3 Are Required for the Life Extension Induced by Mitochondrial Bioenergetic Disruption in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 12(7), e1006133. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006133>
- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H., & Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424(6946), 277-283. <https://doi.org/10.1038/nature01789>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/bj20081386>
- Nakata, K., Abrams, B., Grill, B., Goncharov, A., Huang, X., Chisholm, A. D., & Jin, Y. (2005). Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell*, 120(3), 407-420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.017>
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183(5), 795-803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- Naresh, N. U., & Haynes, C. M. (2019). Signaling and Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033944>
- Nargund, A. M., Fiorese, C. J., Pellegrino, M. W., Deng, P., & Haynes, C. M. (2015). Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol Cell*, 58(1), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.008>
- Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M., & Haynes, C. M. (2012). Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science*, 337(6094), 587-590. <https://doi.org/10.1126/science.1223560>
- Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., & von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell*, 11(2), 345-349. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x>

- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., & Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, 9(1), 27-43.
- Ng, M. Y. W., Wai, T., & Simonsen, A. (2021). Quality control of the mitochondrion. *Dev Cell*, 56(7), 881-905. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.02.009>
- Ngo, J. K., & Davies, K. J. (2007). Importance of the Lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining Lon in aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1119, 78-87. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.015>
- Ngo, J. K., & Davies, K. J. (2009). Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radic Biol Med*, 46(8), 1042-1048. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.024>
- Ngo, J. K., Pomatto, L. C., & Davies, K. J. (2013). Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging. *Redox Biol*, 1, 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.015>
- Nouri, K., Feng, Y., & Schimmer, A. D. (2020). Mitochondrial ClpP serine protease-biological function and emerging target for cancer therapy. *Cell Death Dis*, 11(10), 841. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03062-z>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145-1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Ohkumo, T., Masutani, C., Eki, T., & Hanaoka, F. (2008). Use of RNAi in *C. elegans*. *Methods Mol Biol*, 442, 129-137. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-191-8_10
- Oliveira, R. P., Porter Abate, J., Dilks, K., Landis, J., Ashraf, J., Murphy, C. T., & Blackwell, T. K. (2009). Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell*, 8(5), 524-541. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00501.x>
- Olovnikov, A. M. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol*, 31(4), 443-448. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(96\)00005-8](https://doi.org/10.1016/0531-5565(96)00005-8)
- Ondrovicová, G., Liu, T., Singh, K., Tian, B., Li, H., Gakh, O., Perecko, D., Janata, J., Granot, Z., Orly, J., Kutejová, E., & Suzuki, C. K. (2005). Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent Lon protease. *J Biol Chem*, 280(26), 25103-25110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502796200>
- Ostersetzer, O., Kato, Y., Adam, Z., & Sakamoto, W. (2007). Multiple intracellular locations of Lon protease in *Arabidopsis*: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 48(6), 881-885. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm052>
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Müller, S., Engel, A., Hegerl, R., & Baumeister, W. (1992). Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *Embo j*, 11(4), 1607-1616. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05206.x>
- Pagano, D. J., Kingston, E. R., & Kim, D. H. (2015). Tissue expression pattern of PMK-2 p38 MAPK is established by the miR-58 family in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 11(2), e1004997. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004997>
- Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2015). Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*, 521(7553), 525-528. <https://doi.org/10.1038/nature14300>
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42, 301-334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>
- Pareek, G., & Pallanck, L. J. (2018). Inactivation of Lon protease reveals a link between mitochondrial unfolded protein stress and mitochondrial translation inhibition. *Cell Death Dis*, 9(12), 1168. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1213-6>
- Pareek, G., Thomas, R. E., Vincow, E. S., Morris, D. R., & Pallanck, L. J. (2018). Lon protease inactivation in *Drosophila* causes unfolded protein stress and inhibition of mitochondrial translation. *Cell Death Discov*, 4, 51. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0110-1>
- Park, C. B., & Larsson, N. G. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*, 193(5), 809-818. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010024>

- Pellegrino, M. W., Nargund, A. M., Kirienko, N. V., Gillis, R., Fiorese, C. J., & Haynes, C. M. (2014). Mitochondrial UPR-regulated innate immunity provides resistance to pathogen infection. *Nature*, *516*(7531), 414-417. <https://doi.org/10.1038/nature13818>
- Peterson, N. D., Cheesman, H. K., Liu, P., Anderson, S. M., Foster, K. J., Chhaya, R., Perrat, P., Thekkiniath, J., Yang, Q., Haynes, C. M., & Pukkila-Worley, R. (2019). The nuclear hormone receptor NHR-86 controls anti-pathogen responses in *C. elegans*. *PLoS Genet*, *15*(1), e1007935. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007935>
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, *85*(2), 257-273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Pinti, M., Gibellini, L., De Biasi, S., Nasi, M., Roat, E., O'Connor, J. E., & Cossarizza, A. (2011). Functional characterization of the promoter of the human Lon protease gene. *Mitochondrion*, *11*(1), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.010>
- Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bortolotti, C. A., Iannone, A., & Cossarizza, A. (2016). Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochim Biophys Acta*, *1857*(8), 1300-1306. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.025>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1813*(9), 1619-1633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Polo, M., Alegre, F., Moragrega, A. B., Gibellini, L., Marti-Rodrigo, A., Blas-Garcia, A., Esplugues, J. V., & Apostolova, N. (2017). Lon protease: a novel mitochondrial matrix protein in the interconnection between drug-induced mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Br J Pharmacol*, *174*(23), 4409-4429. <https://doi.org/10.1111/bph.14045>
- Pomatto, L. C. D., Carney, C., Shen, B., Wong, S., Halaszynski, K., Salomon, M. P., Davies, K. J. A., & Tower, J. (2017). The Mitochondrial Lon Protease Is Required for Age-Specific and Sex-Specific Adaptation to Oxidative Stress. *Curr Biol*, *27*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.044>
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, *78*, 959-991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>
- Pravda, J. (2020). Hydrogen peroxide and disease: towards a unified system of pathogenesis and therapeutics. *Mol Med*, *26*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00165-3>
- Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int J Mol Sci*, *22*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>
- Quirós, P. M. (2018). Determination of Aconitase Activity: A Substrate of the Mitochondrial Lon Protease. *Methods Mol Biol*, *1731*, 49-56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7595-2_5
- Quirós, P. M., Bárcena, C., & López-Otín, C. (2014). Lon protease: A key enzyme controlling mitochondrial bioenergetics in cancer. *Mol Cell Oncol*, *1*(4), e968505. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.968505>
- Quiros, P. M., Espanol, Y., Acin-Perez, R., Rodriguez, F., Barcena, C., Watanabe, K., Calvo, E., Loureiro, M., Fernandez-Garcia, M. S., Fueyo, A., Vazquez, J., Enriquez, J. A., & Lopez-Otin, C. (2014). ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep*, *8*(2), 542-556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.018>
- Quirós, Pedro M., Español, Y., Acín-Pérez, R., Rodríguez, F., Bárcena, C., Watanabe, K., Calvo, E., Loureiro, M., Fernández-García, M. S., Fueyo, A., Vázquez, J., Enriquez, José A., & López-Otín, C. (2014). ATP-Dependent Lon Protease Controls Tumor Bioenergetics by Reprogramming Mitochondrial Activity. *Cell Reports*, *8*(2), 542-556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.018>
- Quirós, P. M., Mottis, A., & Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(4), 213-226. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.23>

- Quirós, P. M., Prado, M. A., Zamboni, N., D'Amico, D., Williams, R. W., Finley, D., Gygi, S. P., & Auwerx, J. (2017). Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J Cell Biol*, *216*(7), 2027-2045. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702058>
- Qureshi, M. A., Haynes, C. M., & Pellegrino, M. W. (2017). The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *J Biol Chem*, *292*(33), 13500-13506. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.791061>
- Rabl, J., Smith, D. M., Yu, Y., Chang, S. C., Goldberg, A. L., & Cheng, Y. (2008). Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell*, *30*(3), 360-368. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.004>
- Radetskaya, O., Lane, R. K., Friedman, T., Garrett, A., Nguyen, M., Borrer, M. B., Russell, J., & Rea, S. L. (2019). The PMK-3 (p38) Mitochondrial Retrograde Response Functions in Intestinal Cells to Extend Life via the ESCRT Machinery. *bioRxiv*, 797308. <https://doi.org/10.1101/797308>
- Ragnauth, C. D., Warren, D. T., Liu, Y., McNair, R., Tajsic, T., Figg, N., Shroff, R., Skepper, J., & Shanahan, C. M. (2010). Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation*, *121*(20), 2200-2210. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.109.902056>
- Ragonnaud, E., & Biragyn, A. (2021). Gut microbiota as the key controllers of "healthy" aging of elderly people. *Immun Ageing*, *18*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00213-w>
- Rauthan, M., Ranji, P., Aguilera Pradenas, N., Pitot, C., & Pilon, M. (2013). The mitochondrial unfolded protein response activator ATFS-1 protects cells from inhibition of the mevalonate pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(15), 5981-5986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218778110>
- Rea, S. L., Ventura, N., & Johnson, T. E. (2007). Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, *5*(10), e259. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050259>
- Rep, M., van Dijl, J. M., Suda, K., Schatz, G., Grivell, L. A., & Suzuki, C. K. (1996). Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science*, *274*(5284), 103-106. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.103>
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C. L., Ulgherait, M., Hur, J. H., Ansari, W. S., Lo, T., Jr., Jones, D. L., & Walker, D. W. (2011). Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab*, *14*(5), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.013>
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (1997). *C. elegans II*. In D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer, & J. R. Priess (Eds.), *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riddle, D. L., Swanson, M. M., & Albert, P. S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*, *290*(5808), 668-671. <https://doi.org/10.1038/290668a0>
- Rigas, S., Daras, G., Laxa, M., Marathias, N., Fasseas, C., Sweetlove, L. J., & Hatzopoulos, P. (2009). Role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondrial function in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, *181*(3), 588-600. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02701.x>
- Rigas, S., Daras, G., Sweetlove, L. J., & Hatzopoulos, P. (2009). Mitochondria biogenesis via Lon1 selective proteolysis: who dares to live for ever? *Plant Signal Behav*, *4*(3), 221-224. <https://doi.org/10.4161/psb.4.3.7863>
- Rigas, S., Daras, G., Tsitsekian, D., & Hatzopoulos, P. (2012). The multifaceted role of Lon proteolysis in seedling establishment and maintenance of plant organelle function: living from protein destruction. *Physiol Plant*, *145*(1), 215-223. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01537.x>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(9), 566-578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Robbins, P. D., Jurk, D., Khosla, S., Kirkland, J. L., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Passos, J. F., Pignolo, R. J., Tchkonja, T., & Niedernhofer, L. J. (2021). Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability

- to Extend Health Span. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 61, 779-803. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-050120-105018>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192(4), 547-556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rolland, S. G., Schneid, S., Schwarz, M., Rackles, E., Fischer, C., Haeussler, S., Regmi, S. G., Yeroslaviz, A., Habermann, B., Mokranjac, D., Lambie, E., & Conradt, B. (2019). Compromised Mitochondrial Protein Import Acts as a Signal for UPR(mt). *Cell Rep*, 28(7), 1659-1669.e1655. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.049>
- Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*, 110(10), 1383-1388. <https://doi.org/10.1172/jci16784>
- Rossi, D. J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., & Weissman, I. L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447(7145), 725-729. <https://doi.org/10.1038/nature05862>
- Rousakis, A., Vlassis, A., Vlanti, A., Patera, S., Thireos, G., & Syntichaki, P. (2013). The general control nonderepressible-2 kinase mediates stress response and longevity induced by target of rapamycin inactivation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 12(5), 742-751. <https://doi.org/10.1111/accel.12101>
- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), 682-695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
- Runkel, E. D., Liu, S., Baumeister, R., & Schulze, E. (2013). Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet*, 9(3), e1003346. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003346>
- Russell, S. J., & Kahn, C. R. (2007). Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 681-691. <https://doi.org/10.1038/nrm2234>
- Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem*, 76, 701-722. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*, 14(3), 255-274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Sakamoto, W. (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 599-621. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105401>
- Schaar, C. E., Dues, D. J., Spielbauer, K. K., Machiela, E., Cooper, J. F., Senchuk, M., Hekimi, S., & Van Raamsdonk, J. M. (2015). Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet*, 11(2), e1004972. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004972>
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C., & Rabinovitch, P. S. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308(5730), 1909-1911. <https://doi.org/10.1126/science.1106653>
- Schulz, T. J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., & Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab*, 6(4), 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011>
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., & Korsmeyer, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00116-2)
- Senchuk, M. M., Dues, D. J., Schaar, C. E., Johnson, B. K., Madaj, Z. B., Bowman, M. J., Winn, M. E., & Van Raamsdonk, J. M. (2018). Activation of DAF-16/FOXO by reactive oxygen species contributes to longevity in long-lived mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 14(3), e1007268. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007268>
- Seo, A. Y., Joseph, A. M., Dutta, D., Hwang, J. C., Aris, J. P., & Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci*, 123(Pt 15), 2533-2542. <https://doi.org/10.1242/jcs.070490>

- Shao, L. W., Peng, Q., Dong, M., Gao, K., Li, Y., Li, Y., Li, C. Y., & Liu, Y. (2020). Histone deacetylase HDA-1 modulates mitochondrial stress response and longevity. *Nat Commun*, *11*(1), 4639. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18501-w>
- Sharpless, N. E., & DePinho, R. A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(9), 703-713. <https://doi.org/10.1038/nrm2241>
- Sheng, B., Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Casadesus, G., Perry, G., & Zhu, X. (2012). Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, *120*(3), 419-429. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x>
- Shin, M., Watson, E. R., Song, A. S., Mindrebo, J. T., Novick, S. J., Griffin, P. R., Wiseman, R. L., & Lander, G. C. (2021). Structures of the human LONP1 protease reveal regulatory steps involved in protease activation. *Nat Commun*, *12*(1), 3239. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23495-0>
- Shivers, R. P., Kooistra, T., Chu, S. W., Pagano, D. J., & Kim, D. H. (2009). Tissue-specific activities of an immune signaling module regulate physiological responses to pathogenic and nutritional bacteria in *C. elegans*. *Cell Host Microbe*, *6*(4), 321-330. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.001>
- Shivers, R. P., Pagano, D. J., Kooistra, T., Richardson, C. E., Reddy, K. C., Whitney, J. K., Kamanzi, O., Matsumoto, K., Hisamoto, N., & Kim, D. H. (2010). Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, *6*(4), e1000892. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000892>
- Shpilka, T., & Haynes, C. M. (2018). The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *19*(2), 109-120. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.110>
- Siebold, A. P., Banerjee, R., Tie, F., Kiss, D. L., Moskowitz, J., & Harte, P. J. (2010). Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(1), 169-174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907739107>
- Smiraglia, D. J., Kulawiec, M., Bistulfi, G. L., Gupta, S. G., & Singh, K. K. (2008). A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biol Ther*, *7*(8), 1182-1190. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.8.6215>
- Smith, D. M., Chang, S. C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., & Goldberg, A. L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell*, *27*(5), 731-744. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.033>
- Solheim, C., Li, L., Hatzopoulos, P., & Millar, A. H. (2012). Loss of Lon1 in *Arabidopsis* changes the mitochondrial proteome leading to altered metabolite profiles and growth retardation without an accumulation of oxidative damage. *Plant Physiol*, *160*(3), 1187-1203. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203711>
- Soo, S. K., Traa, A., Rudich, P. D., Mistry, M., & Van Raamsdonk, J. M. (2021). Activation of mitochondrial unfolded protein response protects against multiple exogenous stressors. *Life Sci Alliance*, *4*(12). <https://doi.org/10.26508/lsa.202101182>
- Sporn, M. B., Liby, K. T., Yore, M. M., Fu, L., Lopchuk, J. M., & Gribble, G. W. (2011). New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J Nat Prod*, *74*(3), 537-545. <https://doi.org/10.1021/np100826q>
- Sun, C. L., Van Gilst, M., & Crowder, C. M. (2023). Hypoxia-induced mitochondrial stress granules. *Cell Death Dis*, *14*(7), 448. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05988-6>
- Sun, J., Folk, D., Bradley, T. J., & Tower, J. (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *161*(2), 661-672. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.2.661>
- Sun, N., Youle, R. J., & Finkel, T. (2016). The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell*, *61*(5), 654-666. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.028>
- Sung, Y. J., Kao, T. Y., Kuo, C. L., Fan, C. C., Cheng, A. N., Fang, W. C., Chou, H. Y., Lo, Y. K., Chen, C. H., Jiang, S. S., Chang, I. S., Hsu, C. H., Lee, J. C., & Lee, A. Y. (2018). Mitochondrial Lon sequesters

- and stabilizes p53 in the matrix to restrain apoptosis under oxidative stress via its chaperone activity. *Cell Death Dis*, 9(6), 697. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0730-7>
- Szczepanowska, K., & Trifunovic, A. (2022). Mitochondrial matrix proteases: quality control and beyond. *Febs j*, 289(22), 7128-7146. <https://doi.org/10.1111/febs.15964>
- Szweda, P. A., Friguet, B., & Szweda, L. I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med*, 33(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00837-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00837-7)
- Talens, R. P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H. E., Slagboom, P. E., Boomsma, D. I., & Heijmans, B. T. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell*, 11(4), 694-703. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00835.x>
- Tepper, R. G., Ashraf, J., Kaletsky, R., Kleemann, G., Murphy, C. T., & Bussemaker, H. J. (2013). PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell*, 154(3), 676-690. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.006>
- Tian, Y., Garcia, G., Bian, Q., Steffen, K. K., Joe, L., Wolff, S., Meyer, B. J., & Dillin, A. (2016). Mitochondrial Stress Induces Chromatin Reorganization to Promote Longevity and UPR(mt). *Cell*, 165(5), 1197-1208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.011>
- Tjahjono, E., & Kirienko, N. V. (2017). A conserved mitochondrial surveillance pathway is required for defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*, 13(6), e1006876. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006876>
- Tjahjono, E., McAnena, A. P., & Kirienko, N. V. (2020). The evolutionarily conserved ESRE stress response network is activated by ROS and mitochondrial damage. *BMC Biol*, 18(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00812-5>
- Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., Tanaka, K., & Kasahara, M. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol*, 180(3), 963-972. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.012>
- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J. M., Viña, J., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, 135(4), 609-622. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.034>
- Troemel, E. R., Chu, S. W., Reinke, V., Lee, S. S., Ausubel, F. M., & Kim, D. H. (2006). p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 2(11), e183. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020183>
- Tsitsekian, D., Daras, G., Alatzas, A., Templalex, D., Hatzopoulos, P., & Rigas, S. (2019). Comprehensive analysis of Lon proteases in plants highlights independent gene duplication events. *J Exp Bot*, 70(7), 2185-2197. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery440>
- Tullet, J. M., Hertweck, M., An, J. H., Baker, J., Hwang, J. Y., Liu, S., Oliveira, R. P., Baumeister, R., & Blackwell, T. K. (2008). Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell*, 132(6), 1025-1038. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.030>
- Tuttle, C. S. L., Waaijjer, M. E. C., Slee-Valentijn, M. S., Stijnen, T., Westendorp, R., & Maier, A. B. (2020). Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging Cell*, 19(2), e13083. <https://doi.org/10.1111/ace1.13083>
- Tzeng, S. R., Tseng, Y. C., Lin, C. C., Hsu, C. Y., Huang, S. J., Kuo, Y. T., & Chang, C. I. (2021). Molecular insights into substrate recognition and discrimination by the N-terminal domain of Lon AAA+ protease. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.64056>
- Urano, F., Calfon, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S. G., & Ron, D. (2002). A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *J Cell Biol*, 158(4), 639-646. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203086>
- Urso, S. J., Comly, M., Hanover, J. A., & Lamitina, T. (2020). The O-GlcNAc transferase OGT is a conserved and essential regulator of the cellular and organismal response to hypertonic stress. *PLoS Genet*, 16(10), e1008821. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008821>

- Urso, S. J., & Lamitina, T. (2021). The *C. elegans* Hypertonic Stress Response: Big Insights from Shrinking Worms. *Cell Physiol Biochem*, 55(S1), 89-105. <https://doi.org/10.33594/000000332>
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(3), 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
- van der Vaart, A., Rademakers, S., & Jansen, G. (2015). DLK-1/p38 MAP Kinase Signaling Controls Cilium Length by Regulating RAB-5 Mediated Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 11(12), e1005733. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005733>
- Van Raamsdonk, J. M., & Hekimi, S. (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 5(2), e1000361. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000361>
- Vattem, K. M., & Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), 11269-11274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400541101>
- Venkatesh, S., Lee, J., Singh, K., Lee, I., & Suzuki, C. K. (2012). Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim Biophys Acta*, 1823(1), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.003>
- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A., & Loeb, L. A. (2008). DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet*, 40(4), 392-394. <https://doi.org/10.1038/ng.95>
- Vijg, J., & Dong, X. (2020). Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging. *Cell*, 182(1), 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.024>
- von Janowsky, B., Knapp, K., Major, T., Krayl, M., Guiard, B., & Voos, W. (2005). Structural properties of substrate proteins determine their proteolysis by the mitochondrial AAA+ protease Pim1. *Biol Chem*, 386(12), 1307-1317. <https://doi.org/10.1515/bc.2005.149>
- Vowels, J. J., & Thomas, J. H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 130(1), 105-123. <https://doi.org/10.1093/genetics/130.1.105>
- Walker, A. K., See, R., Batchelder, C., Kophengnavong, T., Gronniger, J. T., Shi, Y., & Blackwell, T. K. (2000). A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *Caenorhabditis elegans* SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins. *J Biol Chem*, 275(29), 22166-22171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001746200>
- Walker, G. A., & Lithgow, G. J. (2003). Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell*, 2(2), 131-139. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00045.x>
- Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet*, 43, 95-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850>
- Wang, N., Gottesman, S., Willingham, M. C., Gottesman, M. M., & Maurizi, M. R. (1993). A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11247-11251. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11247>
- Weidberg, H., & Amon, A. (2018). MitoCPR-A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress. *Science*, 360(6385). <https://doi.org/10.1126/science.aan4146>
- West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 11(6), 389-402. <https://doi.org/10.1038/nri2975>
- Whittemore, K., Vera, E., Martínez-Nevado, E., Sanpera, C., & Blasco, M. A. (2019). Telomere shortening rate predicts species life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(30), 15122-15127. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902452116>
- Williams, R., Laskovs, M., Williams, R. I., Mahadevan, A., & Labbadia, J. (2020). A Mitochondrial Stress-Specific Form of HSF1 Protects against Age-Related Proteostasis Collapse. *Dev Cell*, 54(6), 758-772.e755. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.038>

- Wolkow, C. A., Kimura, K. D., Lee, M. S., & Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science*, *290*(5489), 147-150. <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.147>
- Wong, A., Boutis, P., & Hekimi, S. (1995). Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*, *139*(3), 1247-1259. <https://doi.org/10.1093/genetics/139.3.1247>
- Wright, J. N., Benavides, G. A., Johnson, M. S., Wani, W., Ouyang, X., Zou, L., Collins, H. E., Zhang, J., Darley-Usmar, V., & Chatham, J. C. (2019). Acute increases in O-GlcNAc indirectly impair mitochondrial bioenergetics through dysregulation of LonP1-mediated mitochondrial protein complex turnover. *Am J Physiol Cell Physiol*, *316*(6), C862-c875. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00491.2018>
- Wu, B. J., Kingston, R. E., & Morimoto, R. I. (1986). Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(3), 629-633. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.3.629>
- Wu, C. (1984). Two protein-binding sites in chromatin implicated in the activation of heat-shock genes. *Nature*, *309*(5965), 229-234. <https://doi.org/10.1038/309229a0>
- Wu, X., Li, L., & Jiang, H. (2016). Doa1 targets ubiquitinated substrates for mitochondria-associated degradation. *J Cell Biol*, *213*(1), 49-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510098>
- Wu, Z., Isik, M., Moroz, N., Steinbaugh, M. J., Zhang, P., & Blackwell, T. K. (2019). Dietary Restriction Extends Lifespan through Metabolic Regulation of Innate Immunity. *Cell Metab*, *29*(5), 1192-1205.e1198. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.013>
- Wu, Z., Senchuk, M. M., Dues, D. J., Johnson, B. K., Cooper, J. F., Lew, L., Machiela, E., Schaar, C. E., DeJonge, H., Blackwell, T. K., & Van Raamsdonk, J. M. (2018). Mitochondrial unfolded protein response transcription factor ATFS-1 promotes longevity in a long-lived mitochondrial mutant through activation of stress response pathways. *BMC Biol*, *16*(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0615-3>
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M., Fraser, D. G., Onken, J. L., Johnson, K. O., Verzosa, G. C., Langhi, L. G. P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Jurk, D., Singh, R. J., Allison, D. B., Ejima, K., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Cubro, H., Garovic, V. D., Hou, X., Weroha, S. J., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., Khosla, S., Tchkonja, T., & Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*, *24*(8), 1246-1256. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Xu, S., Peng, G., Wang, Y., Fang, S., & Karbowski, M. (2011). The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol Biol Cell*, *22*(3), 291-300. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-09-0748>
- Yan, D., Wu, Z., Chisholm, A. D., & Jin, Y. (2009). The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. *Cell*, *138*(5), 1005-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.023>
- Yang, W., & Hekimi, S. (2010a). A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, *8*(12), e1000556. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000556>
- Yang, W., & Hekimi, S. (2010b). Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, *9*(3), 433-447. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00571.x>
- Yates, M. S., Tauchi, M., Katsuoka, F., Flanders, K. C., Liby, K. T., Honda, T., Gribble, G. W., Johnson, D. A., Johnson, J. A., Burton, N. C., Guilarte, T. R., Yamamoto, M., Sporn, M. B., & Kensler, T. W. (2007). Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Mol Cancer Ther*, *6*(1), 154-162. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-06-0516>

- Yee, C., Yang, W., & Hekimi, S. (2014). The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell*, 157(4), 897-909. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.055>
- Yellen, G. (2018). Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *J Cell Biol*, 217(7), 2235-2246. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803152>
- Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S. G., Harding, H. P., & Ron, D. (2004). Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci*, 117(Pt 18), 4055-4066. <https://doi.org/10.1242/jcs.01275>
- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Youngman, M. J., Rogers, Z. N., & Kim, D. H. (2011). A decline in p38 MAPK signaling underlies immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 7(5), e1002082. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002082>
- Zamponi, N., Zamponi, E., Cannas, S. A., Billoni, O. V., Helguera, P. R., & Chialvo, D. R. (2018). Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Sci Rep*, 8(1), 363. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18351-5>
- Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G., & Cai, D. (2013). Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*, 497(7448), 211-216. <https://doi.org/10.1038/nature12143>
- Zhang, T., & Ye, Y. (2016). Doa1 is a MAD adaptor for Cdc48. *J Cell Biol*, 213(1), 7-9. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603078>
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *Embo j*, 21(17), 4411-4419. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf445>
- Zhong, W., & Sternberg, P. W. (2006). Genome-Wide Prediction of *C. elegans* Genetic Interactions. *Science*, 311(5766), 1481-1484. <https://doi.org/10.1126/science.1123287>
- Zhou, D., Palam, L. R., Jiang, L., Narasimhan, J., Staschke, K. A., & Wek, R. C. (2008). Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J Biol Chem*, 283(11), 7064-7073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708530200>
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221-225. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
- Zhu, D., Li, X., & Tian, Y. (2022). Mitochondrial-to-nuclear communication in aging: an epigenetic perspective. *Trends Biochem Sci*, 47(8), 645-659. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.03.008>
- Zhu, Y., Wang, M., Lin, H., Huang, C., Shi, X., & Luo, J. (2002). Epidermal growth factor up-regulates the transcription of mouse I α homology ATP-dependent protease through extracellular signal-regulated protein kinase- and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathways. *Exp Cell Res*, 280(1), 97-106. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5621>
- Zurita Rendón, O., & Shoubridge, E. A. (2018). LONP1 Is Required for Maturation of a Subset of Mitochondrial Proteins, and Its Loss Elicits an Integrated Stress Response. *Mol Cell Biol*, 38(20). <https://doi.org/10.1128/mcb.00412-17>

Παράρτημα

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής δημοσιεύτηκε στα επιστημονικά περιοδικά

Cells υπό τον τίτλο “*Organismal and Cellular Stress Responses upon Disruption of Mitochondrial Lonp1 Protease*”, doi: 10.3390/cells11081363 και

International Journal of Molecular Sciences υπό τον τίτλο “*Mitochondrial p38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Insights into Its Regulation of and Role in LONP1-Deficient Nematodes*”, doi: 10.3390/ijms242417209.

Από τη μελέτη και επεξεργασία της σχετικής βιβλιογραφίας δημοσιεύθηκε ένα άρθρο ανασκόπησης στο επιστημονικό περιοδικό *International Journal of Molecular Sciences* υπό τον τίτλο “*The Thermal Stress Coping Network of the Nematode Caenorhabditis elegans*”, doi: 10.3390/ijms232314907.

Επισυνάπτονται ακολούθως οι δημοσιευμένες εργασίες.

Article

Organismal and Cellular Stress Responses upon Disruption of Mitochondrial Lonp1 Protease

Eirini Taouktsi ^{1,2,†}, Eleni Kyriakou ^{1,†}, Stefanos Smyrniotis ³, Fivos Borbolis ¹, Labrina Bondi ^{1,3}, Socratis Avgeris ³, Efstathios Trigazis ^{1,‡}, Stamatis Rigas ², Gerassimos E. Voutsinas ^{3,*} and Popi Syntichaki ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Molecular Genetics of Aging, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Center of Basic Research, 11527 Athens, Greece; eirinitaouktsi@gmail.com (E.T.); ekyriakou@bioacademy.gr (E.K.); fborbolis@gmail.com (F.B.); labrinabondi@gmail.com (L.B.); e.trigazis18@imperial.ac.uk (E.T.)
- ² Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, 11855 Athens, Greece; srigas@aua.gr
- ³ Laboratory of Molecular Carcinogenesis and Rare Disease Genetics, Institute of Biosciences and Applications, National Center for Scientific Research “Demokritos”, 15341 Athens, Greece; stefanos.smyrniotis@gmail.com (S.S.); savgeris@bio.demokritos.gr (S.A.)
- * Correspondence: mvoutsin@bio.demokritos.gr (G.E.V.); synticha@bioacademy.gr (P.S.); Tel.: +30-21-0650-3579 (G.E.V.); +30-21-0659-7474 (P.S.)
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ Present Address: Department of Life Sciences, Imperial College London, London SW7 2BX, UK.

Abstract: Cells engage complex surveillance mechanisms to maintain mitochondrial function and protein homeostasis. LonP1 protease is a key component of mitochondrial quality control and has been implicated in human malignancies and other pathological disorders. Here, we employed two experimental systems, the worm *Caenorhabditis elegans* and human cancer cells, to investigate and compare the effects of LONP-1/LonP1 deficiency at the molecular, cellular, and organismal levels. Deletion of the *lonp-1* gene in worms disturbed mitochondrial function, provoked reactive oxygen species accumulation, and impaired normal processes, such as growth, behavior, and lifespan. The viability of *lonp-1* mutants was dependent on the activity of the ATFS-1 transcription factor, and loss of LONP-1 evoked retrograde signaling that involved both the mitochondrial and cytoplasmic unfolded protein response (UPR^{mt} and UPR^{cyt}) pathways and ensuing diverse organismal stress responses. Exposure of worms to triterpenoid CDDO-Me, an inhibitor of human LonP1, stimulated only UPR^{cyt} responses. In cancer cells, CDDO-Me induced key components of the integrated stress response (ISR), the UPR^{mt} and UPR^{cyt} pathways, and the redox machinery. However, genetic knockdown of LonP1 revealed a genotype-specific cellular response and induced apoptosis similar to CDDO-Me treatment. Overall, the mitochondrial dysfunction ensued by disruption of LonP1 elicits adaptive cytoprotective mechanisms that can inhibit cancer cell survival but diversely modulate organismal stress response and aging.

Keywords: mitochondria; LonP1; aging; cancer; CDDO-Me; *C. elegans*



Citation: Taouktsi, E.; Kyriakou, E.; Smyrniotis, S.; Borbolis, F.; Bondi, L.; Avgeris, S.; Trigazis, E.; Rigas, S.; Voutsinas, G.E.; Syntichaki, P. Organismal and Cellular Stress Responses upon Disruption of Mitochondrial Lonp1 Protease. *Cells* **2022**, *11*, 1363. <https://doi.org/10.3390/cells11081363>

Academic Editor: David Sebastián

Received: 14 March 2022

Accepted: 14 April 2022

Published: 16 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Lon proteases belong to the highly evolutionarily conserved AAA⁺ (ATPases Associated with diverse cellular Activities) protease family and are present in all eukaryotic organelles, including mitochondria, chloroplasts, and peroxisomes [1,2]. Lon's primary function is to prevent the aggregation of unfolded/misfolded or oxidized proteins in the organelles by acting as both chaperone and protease [3,4]. In yeast and mammalian cells, loss of mitochondrial Lon protease (hereafter termed LonP1) caused mitochondrial dysfunction, accumulation of damaged proteins, and cell death via apoptosis and necrosis, supporting its central role in protein quality surveillance and maintenance of cellular homeostasis [5–9]. LonP1 forms a homohexameric ring-shaped structure in humans and protects mitochondria

against aggregation by solubilizing specifically newly imported proteins and degrading unprocessed, misfolded, and oxidized proteins in the mitochondrial matrix [10,11]. Additionally, LonP1 is implicated in a wide range of regulatory cellular processes, such as mitochondrial DNA maintenance, mitochondrial unfolded protein response, the metabolic adaptation of tumor cells, or stress adaptation of *Drosophila melanogaster* [12–15].

In humans, LonP1 mutations are associated with CODAS syndrome, a rare developmental disorder affecting multiple organs [16]. Moreover, in several types of human tumors or cancer cell lines, LonP1 levels were increased, suggesting a high level of unfolded protein (proteotoxic) stress within mitochondria [17]. Even though the function of LonP1 in tumorigenesis is still poorly understood, inhibition of the protease is likely associated with decreased rates of tumor cell growth, proliferation, and metastasis [18]. This evidence suggests that LonP1 may be a potential target for cancer therapy. In support of its role in proteostasis, the levels of LonP1 are induced during acute oxidative stress, heat shock, and hypoxia [19], whereas both the level and activity of LonP1 are decreased during chronic oxidative stress or aging [20,21]. Interestingly, deletion of mitochondrial Lon in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* or the filamentous ascomycete *Podospira anserina* accelerated aging, linking LonP1 function to cellular senescence [22,23]. In *Drosophila melanogaster*, both RNAi interference (RNAi)-mediated knockdown and constitutive overexpression of LonP1 decreased normal lifespan, indicating that dysregulation of LonP1 levels has a negative impact on longevity [15]. However, the role of mitochondrial LonP1 protease (named LONP-1) in *C. elegans* aging or organismal adaptation to stress has not been established so far.

In *C. elegans*, mitochondrial dysfunction induces defense mechanisms and adaptive responses that could lead to enhanced longevity. The mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) is a retrograde signaling pathway, well-studied in *C. elegans*, which is conserved among species and helps cells to adapt to mitochondrial stress [24–26]. Although UPR^{mt} is responsible for the long lifespan of certain mitochondrial mutants with impaired electron transport chain (ETC) activities or mitonuclear imbalance [27–30], UPR^{mt} activation can be uncoupled from longevity [31]. As a pivotal regulator of UPR^{mt}, ATFS-1 (activating transcription factor associated with stress-1) translocates to the nucleus under mitochondrial stress and coordinates a broad alteration of gene expression to ensure proteostasis, detoxification, and metabolic reprogramming [32,33]. In the absence of stress, ATFS-1 acts as a bidirectional bZIP transcription factor entering the mitochondrial matrix, where it is degraded by LONP-1 protease [32]. Remarkably, RNAi-mediated depletion of LONP-1 resulted in the accumulation of ATFS-1 in mitochondria without inducing the UPR^{mt} pathway [32]. Additional important regulators of the UPR^{mt} in *C. elegans* have been identified to act in parallel or in concert with ATFS-1 [34–38].

In mammals, the UPR^{mt} is a conserved process that induces the expression of cytoprotective genes in response to stressed mitochondria [39]. The pathway involves the activating transcription factor 5 (ATF5), which is regulated similarly to ATFS-1, as it recapitulates the UPR^{mt} in *atfs-1* loss-of-function worms [40]. Further studies have revealed the importance of the integrated stress response (ISR) and the activating transcription factor 4 (ATF4) in mounting a transcriptional response to mitochondrial dysfunction [41,42]. Moreover, ATF4 and the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), a major regulator of the cellular antioxidant defense mechanisms, can cooperatively regulate the expression of heme oxygenase 1 (HO-1) and the proapoptotic CCAAT/enhancer-binding protein homology protein (CHOP) during mitochondrial stress [43]. In human HeLa cells, depletion of LonP1 increased mitochondrial ROS production and the levels of oxidized proteins [9], though discrepancies still exist regarding the induction of stress-responsive signaling pathways, such as the UPR^{mt} [44] or the ISR pathways [41].

Herein, we have investigated the effects of LonP1 deficiency at the molecular, cellular, and organismal levels in two experimental systems, the nematode *C. elegans* and human cancer cells. Using both genetic and pharmacological techniques, we analyzed transcriptional responses to LonP1 inhibition and how they affect physiological processes and phenotypes. Mitochondrial perturbation by LonP1 deficiency seems to act via many

specific cellular mechanisms to induce distinct stress responses best suited to the cells and organism. Elucidating these adaptive homeostatic mechanisms at both the cellular and the organismal/systemic levels is important in understanding how dysregulation of LonP1 may have a pathogenic impact leading to disease.

2. Materials and Methods

2.1. *C. elegans* Strains and Culture Conditions

Standard methods of culturing and handling worms were used [45]. Worms were raised on NGM plates seeded with *Escherichia coli* OP50 and supplemented, whenever it was deemed necessary, with 40 µg/mL 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to prevent progeny growth. For CDDO-Me treatment, NGM plates with UV-killed bacteria supplemented with 5 µM and 10 µM 2-cyano-3,12-dioxo-oleana-1,9(11)-dien-28-oic acid methyl ester (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), or equivalent amount of the solvent DMSO were used. All *C. elegans* strains used in this study are presented in Supplementary Table S1. The *lonp-1(ko)* mutant was generated by the CRISPR-Cas-mediated gene-editing method in N2 (wild-type) worms [46,47], and injections/screens were provided by Invermis Limited, London, UK. The crRNAs used to delete the complete open reading frame of LONP-1, as well as all primers used in this study, are listed in Supplementary Table S2. Double mutants were generated by crossing the corresponding strains and phenotypic or PCR-based selection in F2 progeny. Transgenic *lonp-1::gfp* animals were generated by microinjection of plasmid DNAs into the gonad of N2 young adults, using *rol-6(su1006)* as a cotransformation marker. Multiple lines were obtained and screened for the representative expression pattern.

2.2. Human Cell Cultures

Normal skin fibroblast (DSF22), primary melanoma (WM115), metastatic melanoma (WM266-4), and fibrosarcoma (HT1080) cell lines were cultured in 1 × DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum, Biowest, Nuaille, France), and 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Waltham, MA, USA) at 37 °C, 5% CO₂ and ≥95% humidity. WM266-4 and HT1080 cancer cell lines were treated with 1 µM CDDO-Me for 24 h. All other cases in which different concentrations or time points were used are shown in the text.

2.3. RNA Interference

RNAi experiments in worms were performed on NGM plates seeded with *E. coli* HT115 (DE3) bacteria transformed with the indicated RNAi construct (primers listed in Supplementary Table S2) or the appropriate empty vector (plasmid L4440 or T444T purchased from Addgene, Watertown, MA, USA). All RNAi assays were performed at 20 °C, as previously described [48]. For human LonP1 small interfering RNA (siRNA) experiments, dicer-substrate RNA (DsiRNA) duplexes (5'-AAUCAGAGUGUGGCAUAGAAGCUAT-3') were purchased from Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). A pre-designed DsiRNA to be used as a negative control was also purchased from IDT. SiRNA transfections were performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2 × 10⁵ cells (WM266-4 or HT1080) were seeded in a 35 mm culture dish. The next day, 20 nM DsiRNA were transfected with 5 µL Lipofectamine2000 in Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA, USA). After 48 h, cells were subcultured (ratio 1:6) and retransfected to a final incubation period of 144 h.

2.4. Phenotypic Analysis of Worms

Eggs were synchronized by egg-lay for a 2–3 h period on NGM plates with adequate food and allowed to hatch at 20 °C. The number of progenies in each developmental stage after 72 h was counted, and the percentage of population distribution across worm genotypes was calculated. Total brood size and egg-laying time were determined at 20 °C by picking single L4 larvae onto OP50 plates and transferring them daily to new plates

until egg laying had stopped. The F1 progeny laid by each individual worm was scored on each plate after egg hatching. To examine locomotion, 1-day adults were transferred to freshly prepared NGM plates with thin lawns at room temperature. Complete body bends (every time the part of the worm just behind the pharynx reached a maximum bend in the opposite direction from the bend last counted) were counted for each individual for 20 s. Similarly, 1-day adults were placed on a plate without bacteria to crawl freely for 30 s and then were transferred to a drop of M9 buffer, where the frequency of thrashing was estimated for 30 s, under a dissecting microscope. The body bends and thrashing rate of 1 min were plotted for each worm per strain. For food avoidance assays, approximately 100 eggs from each strain were transferred to the center of mating-like plates (with small circular lawns of uniform size) and incubated at 20 °C for 48–72 h. The percentage of “runaway” worms from the lawn was scored for each plate ($N_{\text{off}}/N_{\text{total}} \times 100$).

2.5. Lifespan Analysis

C. elegans lifespan analysis was conducted at 20 °C or 25 °C as described previously [49]. Briefly, 100 to 150 animals of each strain in late L4 larvae to a young adult stage were transferred to NGM plates (30–40 per plate) seeded with OP50 or HT115 (DE3) bacteria (Day 1 of lifespan assay) and moved to fresh plates every 2–4 days. When indicated, plates supplemented with 40 µM FUdR were used. Viability was scored daily, and worms that failed to respond to stimulation by touch were considered dead. Bagged or raptured worms and animals that crawled off the plates are referred to as censored in the analysis. Statistical analysis was performed by comparing each population to the appropriate control, and *p* values were determined using the log-rank (Mantel–Cox) test. Replicates were carried out as indicated in Supplementary Table S3.

2.6. Microscopic Analysis

Synchronized eggs from transgenic worms expressing the indicated fluorescence stress reporter were grown on OP50 or RNAi plates at 20 °C. For N-acetylcysteine (NAC) and mitoquinol (MitoQ) experiments, L4 larvae were transferred on OP50 plates with UV-killed bacteria and supplemented with 10 mM NAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or 7.5 µM MitoQ (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), respectively, using the corresponding solvent in control plates. In all cases, microscopic analysis was performed in 1-day adults, considering the slight developmental delay in *lonp-1* mutants. Worms were immobilized with levamisole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and mounted on 2% agarose pads on glass microscope slides. Images were captured by fluorescent microscopy using a Leica DMRA upright fluorescent microscope equipped with a Hamamatsu ORCA-flash 4.0 camera and 10× or 40× objectives. All strains were assayed in parallel, and microscopy settings were kept stable throughout each experiment. Fluorescent reporter activity was evaluated through measurement of the average pixel intensity with ImageJ 1.52p (Fiji, <https://imagej.net/software/fiji/>, accessed on 10 December 2021) in the whole worm image captured. In all cases, approximately 50 worms per strain and condition were used in three biological replicates, and the mean of calculated values was plotted. For nuclear localization of DAF-16, approximately 30 transgenic animals of each genotype expressing *muIs71[daf-16ap::gfp::daf-16a]* were fixed with 4% paraformaldehyde in 1× PBS for 10 min and washed twice with M9 buffer prior to visualization, to avoid DAF-16 translocation as result of handling. Images were captured by confocal microscopy using a Leica TCS SP5 II laser scanning confocal imaging system on a DM6000 CFS upright microscope and a 10× objective. GFP::DAF-16α positive nuclei were counted manually using maximum intensity projections of z-stacks generated in ImageJ 1.52p (Fiji). Shown images are single optical sections.

2.7. ROS Measurement

Endogenous hydrogen peroxide levels were measured in transgenic *jrIs1[rpl-17p::HyPer]* worms expressing a HyPer probe in wt or *lonp-1(ko)* mutant background. Approximately

50 worms of the indicated genotypes at day 1 of adulthood were mounted on slides and were used as described in Back et al. [50]. The oxidized and reduced form of HyPer (circularly permuted YFP) of individual worms was excited at 490 and 405 nm, respectively, with a single emission peak at 535 nm. Hydrogen peroxide levels were measured as the ratio of oxidized to reduced HyPer intensity. For Dihydroethidium (DHE) staining, the protocol used was adapted from Aspernig et al. [51]. In brief, approximately 100 1-day adult worms of each genetic background were collected into a 1.5 mL microcentrifuge tube and washed 3 times in M9 buffer. Subsequently, they were stained in 10 μ M DHE (Cayman, Ann Arbor, MI, USA, in M9 plus 0.01% PEG) for 2 h on a shaking platform at room temperature. Each tube was wrapped with aluminum foil to prevent the oxidation of dye. After staining, worms were washed in M9 and mounted on 2% agarose pads with levamisole for immediate imaging (the DHE-derived fluorescence intensity is stable over the first 30 min). Unstained worms were imaged to assess the autofluorescence signal, which should be subtracted. Fluorescence density was measured by using ImageJ software.

2.8. MitoTracker Staining

For MitoTracker Green staining, synchronized 1-day adult worms were washed into 100 μ L M9 supplemented with boiling-killed OP50 bacteria. Subsequently, MitoTracker Green (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was added to a final concentration of 10 μ M, and worms were incubated at 20 °C overnight (the tube was wrapped with aluminum foil to prevent the oxidation of dye). The next day worms were washed with M9 and placed on NGM with OP50 plates for 1 h to remove excess dye. For Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen, Waltham, MA, USA) staining, the same method was performed with 1 h incubation to a final concentration of 4.70 μ M working solution followed by 2–3 washes with M9 for destaining. Imaging was performed with 40 \times or 63 \times magnification in muscle areas using levamisole as an anesthetic agent.

2.9. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from frozen worm pellets (200–300 worms per sample) of the indicated genetic background, age, and treatment using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). At least three biological replicate samples were harvested and analyzed independently in each experiment. The quality and quantity of RNA samples were determined using Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) before and after DNase I (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) treatment, according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription using random primers was carried out with FIREScript RT cDNA Synthesis KIT (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), and quantitative PCR was performed using KAPA SYBR FAST Universal Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) in the MJ MiniOpticon system (BioRad, Hercules, CA, USA). Total RNA was extracted from cells with TRIzol™ (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, and first-strand cDNA synthesis was performed with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) in 20- μ L reactions, using 1000 ng RNA as template and oligo-dT primers. qRT-PCR experiments were performed in 20 μ L reactions with the KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2 \times kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) in an MX3000P cycler (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Relative amounts of mRNA were determined using the comparative Ct method for quantification, and each sample was independently normalized to its endogenous reference gene (*ama-1* for worms or β -ACTIN for cells). Gene expression data are presented as the mean fold change of all biological replicates relative to control. Primer sequences used for qRT-PCR are shown in Supplementary Table S2.

2.10. Stress Sensitivity Assays

Heat shock assays were performed by shifting synchronous populations of approximately 100 adult worms from 20 °C to 35 °C for the indicated time points. For RNAi experiments, worms were grown on RNAi plates from eggs before being shifted to 35 °C

as 1-day adults. Survival was scored after 16 h of recovery at 20 °C. For the osmotic stress assay, 1-day adults were placed on plates containing 500 mM NaCl for 24 h. For oxidative stress with paraquat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or antimycin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), appropriately synchronized worms of each genotype were grown in the presence of 40 µM FUdR until the late L4 stage. The next day, 1-day adults were placed on new plates seeded with UV-killed bacteria and containing the oxidant without FUdR. Survival was monitored after 48 h on plates with 30 mM paraquat or after 24 h on plates with 40 µM antimycin A. H₂O₂ stress assays were performed in 1-day adults, washed from OP50 plates, into 1.5 mL tubes containing 10 mM H₂O₂ (from a stock solution 30% w/w in H₂O, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a total volume of 1 mL M9. Tubes were incubated for 30 min on a rotating wheel at room temperature. After centrifugation, the worm pellet was transferred to fresh OP50 seeded NGM plates and left for recovery at 20 °C for 30 min before survival was scored. For the tBHP stress tolerance assay, 1- or 2-day adult worms of the indicated genotype were placed on freshly prepared tBHP plates (according to Ewald et al. [52]) containing 7.5 or 10 mM tBHP (from a stock solution of 70% in water, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), without bacteria. Worms were continually repositioned into the center of the plate for the first two hours as they tried to “escape” from the plate and avoid tBHP, and survival was scored every hour. Exploded or damaged animals were censored from the statistics. For sodium arsenite and rotenone stress assays, 1-day adult worms of the indicated genotype were placed on NGM plates seeded with UV-killed bacteria and 7.5 mM sodium arsenite (Acros Organics, Waltham, MA, USA) or 10 µM rotenone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the percentage of worms surviving was determined after 24 h. To assay for sodium azide toxicity, 1-day adults were picked to NGM plates containing 1.5 mM sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany), where they remained anesthetized for 24 h. The number of surviving worms was counted after 20 h recovery at 20 °C. For RNAi experiments, synchronized worms grew for one generation on RNAi plates prior to picking them as 1-day adults onto new plates for each assay. All experiments were performed at least three times, and each biological replicate comprised three plates with 30–40 worms per condition and genotype. The percentage survival for each replicate was plotted, and an unpaired *t*-test was used to assess significance.

2.11. Protein Extraction and Western Blotting

Approximately 200–300 age-synchronized worms of each strain were washed in M9 buffer. 5X SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% v/v glycerol, 10% w/v SDS, 0.1% w/v bromophenol blue, and 5% v/v 2-mercaptoethanol) was added to pellets to a total volume of 30 µL and worms were frozen. Worm pellets were boiled for 5 min before loading onto 10% or 12% SDS-PAGE gels. Cells were washed twice with ice-cold 1× PBS and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.25% w/v Sodium Deoxycholate, 1% v/v Triton X-100, 0.1% w/v SDS and 1 mM PMSF). Protein concentration was measured with BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and 20 or 30 µg of cell culture protein extracts were separated in 10 or 12% SDS-PAGE gels and subsequently (electro-)transferred onto nitrocellulose blotting membranes (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). Membranes were blocked in 1XTBS-T containing 5% non-fat milk for 1 h at room temperature. Western blots were performed with the primary antibodies: Anti-LONP1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1:4000), Anti-ATF4 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:1000), Anti-HSP70 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:1000), Anti-PARP (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:500), Anti-ATP6 (Elabscience, Houston, TX, USA, 1:1000), Anti-β-ACTIN (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:1500), and the secondary antibodies Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA, 1:5000) or Anti-Mouse (Millipore, Burlington, MA, USA, 1:2000). Primary antibodies were added for overnight incubation at 4 °C. Secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature, while the immunoreacting protein bands were visualized by ECL (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA).

2.12. MTT Assays

WM266-4 and HT1080 cancer cells were seeded at a density of 7×10^3 per well into 96-well plates and treated with $1 \mu\text{M}$ CDDO-Me for 24 h or after LonP1 silencing. Cells were incubated in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution. Absorbance was measured at 550 nm, using measurement at 630 nm as a reference, by an Infinite M200 plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

2.13. Cell Cycle Analysis

CDDO-Me effect on WM266-4 and HT1080 cell cycle progression was assessed via the FACS approach. Briefly, cancer cells were plated in a 60 mm culture dish at a density of 8×10^5 cells per dish. The next day, $1 \mu\text{M}$ CDDO-Me treatment was applied for 24 h. Adherent cells were collected with trypsinization, fixed in 70% ethanol and stained with propidium iodide (PI) solution ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) containing $250 \mu\text{g}$ of DNase-free RNase A. Finally, they were analyzed using flow cytometry in a Beckton Dickinson's FACScalibur (Franklin Lakes, NJ, USA) at 542 nm, and the Modfit program.

2.14. Scratch-Wound Assays

WM266-4 and HT1080 cancer cells were plated in a 60 mm culture dish (Greiner, Kremsmünster, Austria) at a density of 8×10^5 cells per dish. When cells reached 80–90% confluency, cell monolayers were scratched using a $200 \mu\text{L}$ -tip. Cells were rinsed with warm $1 \times$ PBS and then incubated with $1 \times$ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Biowest, Nuaille, France) supplemented with 2% FBS (fetal bovine serum, Biowest, Nuaille, France) and 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) with 500 nM CDDO-Me (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Cell images were taken under an inverted Nikon Eclipse microscope Ts2 equipped with a Basler Microscopy ace 2.3 MP camera at 0 and 24 h after incubation, using the $4 \times$ objective lens. Images were acquired using the Basler Microscopy Software 2.1 (Build 17017).

2.15. Statistics

Graphs and statistical analysis were performed with GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com/scientificsoftware/prism, accessed on 10 December 2021). Statistical analysis was performed by comparing each sample to the appropriate control in the same condition and p values were determined by Student's t -test (unpaired or paired as indicated) and depicted as follows: **** $p < 0.0001$; *** $p = 0.0001$ – 0.001 ; ** $p = 0.001$ – 0.01 ; * $p = 0.01$ – 0.05 ; ns indicates not significant with p value ≥ 0.05 . For analyses involving multiple strains and conditions, a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons analysis was used to assess the significance and differences between groups.

3. Results

3.1. Mitochondrial Lon Protease Supports Normal Development, Fecundity, and Lifespan of *C. elegans*

The worm homolog of human LonP1 is encoded by the *lonp-1* (C34B2.6) gene, which lies within an operon containing four genes in a row, namely *sdha-2*(C34B2.7), *spsc-1*(C34B2.10), *lonp-1*(C34B2.6) and *ttc-1*(C34B2.5) (Figure 1A, <https://www.wormbase.org>, last accessed on 10 December 2021). The *C. elegans* LONP-1 protein consists of 971 amino acids and shares 47.6% identity and 62.1% similarity with the human protein (Supplementary Figure S1A). The worm homolog has a typical Lon protease structure with an N-terminal mitochondrial targeting sequence (MTS), the central AAA⁺ domain, and the C-terminal proteolytic domain bearing the Serine-Lysine catalytic dyad (Figure 1B; [1]). While the central core domain with the ATPase motif and the sensor- and substrate-discrimination (SSD) domain is highly diverse among the Lon homologs from distinct species, the human (HsLonP1), bacterial (EcLon), Arabidopsis (AtLon1), and worm (CeLonP1) proteases showed similar structure, suggesting conserved functions (Figure 1B; [2]). An uncharacterized *lonp-1(tm5171)* mutant,

with a 5 bp insertion and a 490 bp deletion encompassing the third exon and part of the fourth exon of the *lonp-1* gene (Figure 1B), was found to generate a low-abundance truncated transcript that could lead to a mitochondrial peptide carrying only the first 108 residues of the full-length LONP-1 protein (Supplementary Figure S1B). While *tm5171* is a *lonp-1* null allele, to avoid possible secondary effects on mitochondrial homeostasis, CRISPR/Cas9 was applied to generate *lonp-1(ko)* for further analysis. The absence of LONP-1 protein in this strain was verified by Western blot using antibodies against human LonP1 (Figure 1A).

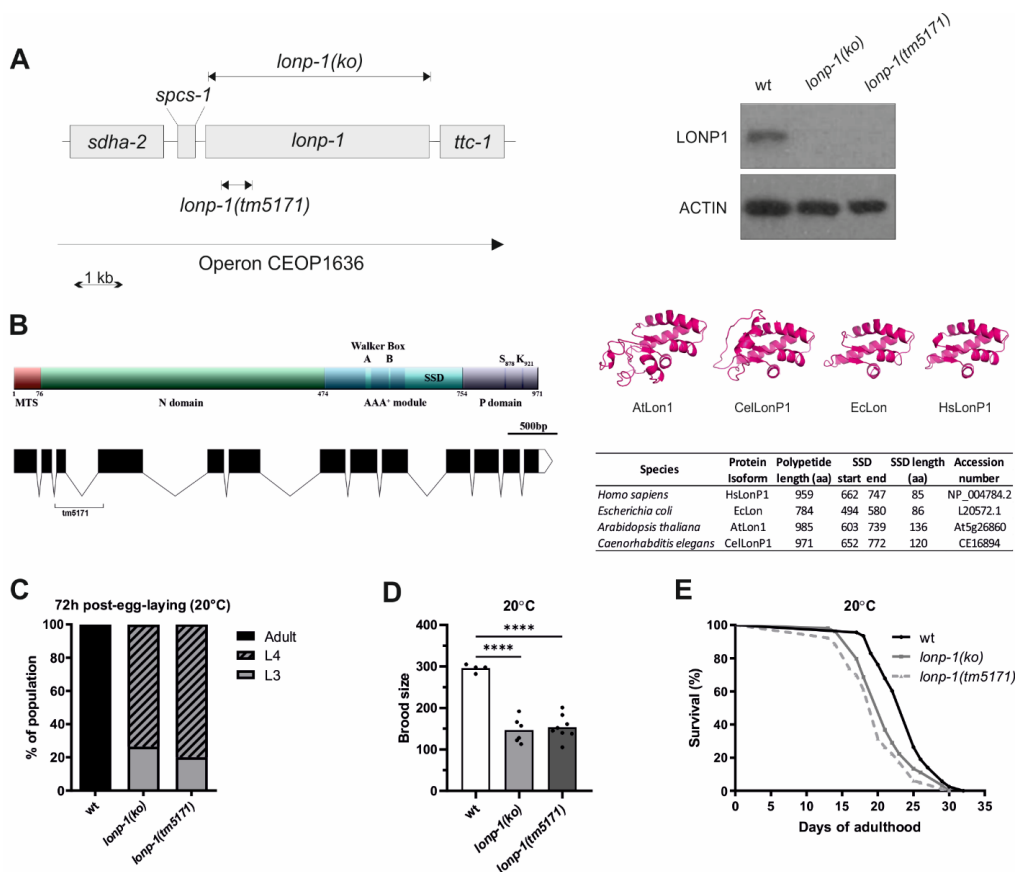


Figure 1. Disruption of *C. elegans* LONP-1 activity impairs normal development, fecundity, and lifespan. **(A)** Schematic of the operon CEOP1636, the CRISPR/Cas9-generating *lonp-1(ko)* null allele, and the *lonp-1(tm5171)* loss-of-function allele. Western blot analysis, using an antibody against human LonP1 and anti-β-ACTIN as a loading control, showed the absence of LONP-1 protein in both *lonp-1* mutant strains. **(B)** Domain structure and functional regions of LONP-1 protein. The mitochondrial target sequence (MTS) directs the translocation of the precursor protein across the mitochondrial membranes; the N domain is involved in substrate recognition, along with the central AAA⁺ module, which contains the Walker Box A and B motifs for ATP-hydrolysis and the sensor- and substrate-discrimination (SSD) domain. The C-terminal proteolytic domain (P domain) contains the serine (S) and lysine (K) catalytic dyad residues. The graphic showing the gene structure of LONP-1 was created using the Exon-Intron Graphic Maker (<http://wormweb.org/exonintron>, last accessed on 10 December 2021). Black boxes represent exons linked by lines corresponding to introns. The bracket points to the sequences deleted in the *tm5171* allele. In the right panel, the molecular modeling of the SSD domain of human (HsLonP1), bacterial (EcLon), Arabidopsis (AtLon1), and worm (CellonP1) proteases is presented. **(C)** The growth rate of *lonp-1* mutants 72 h post-egg-laying at 20 °C versus the wild-type N2 animals (wt). At this time point, wt worms have reached the adult stage, while *lonp-1* mutants were at the larval stage 3 or 4 (L3, L4). **(D)** Fertility assays of *lonp-1* mutants showing the mean number of viable progenies per individual in all biological replicates. An unpaired *t*-test was used to assess significance (**** *p* value < 0.0001). **(E)** Lifespan assays of *lonp-1* mutants at 20 °C. Replicates and statistical analysis of lifespan assays are shown in Supplementary Table S3.

Although in *Drosophila* and mouse, disruption of LonP1 results in embryonic lethality [14,53], both *C. elegans lonp-1(ko)* and *lonp-1(tm5171)* mutants were viable but displayed poor synchrony in development and a delayed pace of larval development, compared with wild-type (wt) animals (Figures 1C and S2A). Furthermore, the mutants showed reduced total brood size, with a slightly extended egg-laying period (Figures 1D and S2B). Mitochondrial mutants with defects in respiration and metabolic activity often exhibit low rates of growth and proliferation, while they are frequently associated with lifespan extension. However, both *lonp-1* mutants had significantly shorter mean lifespan than wt worms, at 20 °C (Figure 1E) and 25 °C, on OP50 *E. coli* diet, regardless of the presence of 5'-fluorodeoxyuridine (FUDR) that is commonly used to prevent egg hatching or progeny growth (Supplementary Table S3). These phenotypes were attributed to *lonp-1* deletion, given that expression of a *lonp-1::gfp* fusion transgene, driven by the internal promoter of *lonp-1* within the operon, could partially rescue the impaired growth rate and short lifespan of *lonp-1* mutants (Supplementary Figure S2C and Supplementary Table S3). The expression of the *lonp-1::gfp* transgene was low but ubiquitous, and the subcellular localization of the produced LONP-1::GFP protein was typical of mitochondrial proteins, as confirmed by staining of transgenic worms with vital dye MitoTracker Red CMXRos (Supplementary Figure S2D).

3.2. Mitochondrial and ROS Homeostasis Are Distorted in *Lonp-1* Mutants

Mammalian cells lacking mitochondrial LonP1 protease exhibit impaired mitochondrial respiration and reduced membrane potential [7,54]. To evaluate the effects of *lonp-1* disruption on the mitochondrial network, worms were stained with MitoTracker Green, a vital dye that labels all mitochondria, versus MitoTracker Red CMXRos, which depends on mitochondrial membrane dynamics and binds to internal mitochondrial components. In *lonp-1(ko)* mutants MitoTracker Green revealed the disturbed morphology of mitochondria that were slightly swollen, disorganized, and fragmented. Likewise, staining of mitochondria with MitoTracker Red CMXRos was significantly decreased compared with wt animals (Figure 2A), suggesting impairment of membrane potential in *lonp-1* mitochondria. In addition, *lonp-1* mutants had reduced mitochondrial mass as assessed by the *myo-3p::GFP^{mt}* reporter (Figure 2C). While in wt animals this reporter detected the normal network of mitochondria, usually aligned with the myofibrils [55] and colocalized with MitoTracker Red CMXRos, this pattern was distorted in *lonp-1* young adults (Figure 2B). Consistent with the disruption of mitochondrial dynamics known to affect animal behavior [56,57], the *lonp-1* worms showed considerably reduced sinusoidal body bends and thrashing rates, together with bacterial-aversive behavior (Supplementary Figure S3). Mitochondrial dysfunction in *lonp-1(ko)* mutants was further confirmed (Figure 2D) by using a xenobiotic *cyp-14A4p::gfp* reporter that portrays the induction of a *C. elegans* cytochrome P450 gene in response to mitochondrial damage [58].

Impaired folding or degradation of matrix proteins in *lonp-1* mutants could be associated with increased ROS production, which would further exacerbate mitochondrial morphology and function [59]. In support of this hypothesis, staining of worms with the ROS-sensitive dye dihydroethidium (DHE) [60,61] demonstrated increased cytosolic superoxide levels in *lonp-1* versus wt animals (Figure 2E). In addition, to monitor hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in vivo, the fluorescent H₂O₂ redox sensor HyPer, under the control of a ubiquitous promoter, was used [50]. In fact, an increased ratio of oxidized to reduced HyPer in *lonp-1* compared with wt adults was assessed, indicating higher endogenous peroxide levels in mutant animals (Figure 2F).

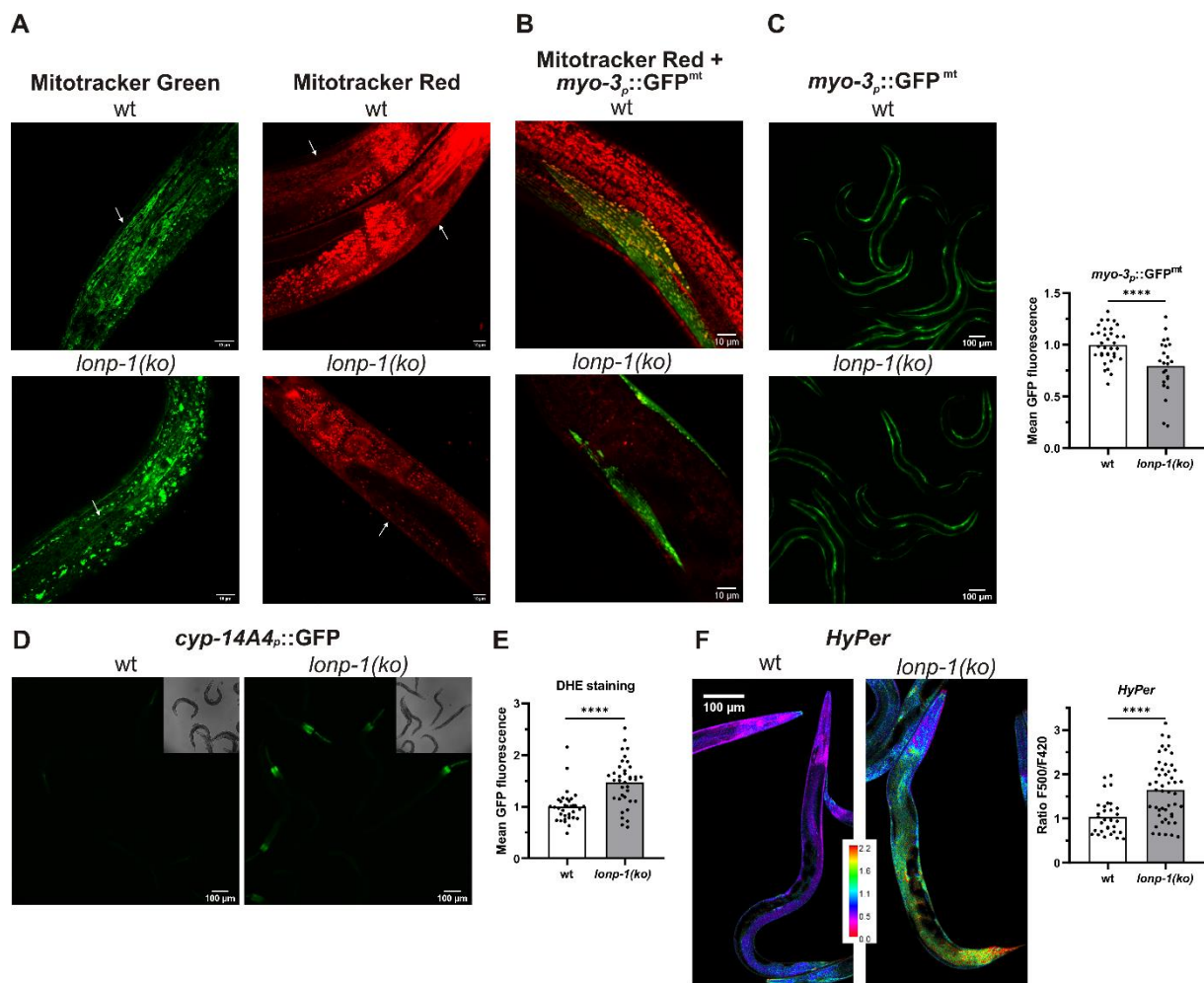


Figure 2. Disturbed mitochondrial network and increased ROS production in *lonp-1* mutants. (A) Representative confocal images of vitally stained *C. elegans* mitochondria using fluorescent dye Mitotracker Green and Mitotracker Red CMXRos in N2 (wt) and *lonp-1(ko)* animals. Scale bar, 10 μ m. (B) Representative confocal images of the *myo-3_p::GFP^{mt}* transgenic animals that express GFP localized to muscle mitochondria, stained with Mitotracker Red CMXRos. Scale bar, 10 μ m. (C) Representative microscopy images and quantification of fluorescence of the *myo-3_p::GFP^{mt}* reporter in wt and *lonp-1(ko)* mutants. Scale bar, 100 μ m. (D) Representative microscopy images of transgenic animals expressing a *cyp-14A4_p::gfp* fusion gene that is induced by mitochondrial dysfunction in wt and *lonp-1(ko)* mutants. Scale bar, 100 μ m. (E) Quantification of fluorescence in wt and *lonp-1(ko)* animals stained with the ROS-sensitive dye dihydroethidium (DHE). (F) Representative confocal images and quantification of the ratio of oxidized to reduced ratiometric reporter HyPer in wt and *lonp-1(ko)* worms expressing *jrIs1[rpl-17p::HyPer]*. Scale bar, 100 μ m. All experiments were performed on 1-day adults, and an unpaired *t*-test was used to assess significance (**** *p* value < 0.0001).

3.3. Activation of ATFS-1-Mediated Retrograde Response in *Lonp-1* Mutants

Increases in endogenous levels of ROS have been shown to evoke the UPR^{mt} signaling through the activity of the ATFS-1 transcription factor [62]. In addition to this, stress conditions that alter mitochondrial function promote cytosolic accumulation and nuclear import of ATFS-1, whereas, under unstressed conditions, mitochondrial ATFS-1 turnover has been linked to LONP-1 protease activity [32]. However, RNAi-mediated knockdown of *lonp-1* in wt animals was not able to activate UPR^{mt} or impair worm development [32]. Using two well-established UPR^{mt} markers, the nuclear-encoded mitochondrial chaperone *hsp-60/mtHSP60* and the *hsp-6/mtHSP70* [26], we evidenced that both were constitutively upregulated in *lonp-1* mutants. Expression levels of the endogenous *hsp-6* and *hsp-60*

genes, together with the fluorescence levels of the corresponding *hsp-6p::gfp* and *hsp-60p::gfp* reporters, were significantly induced in *lonp-1* compared with wt animals (Figure 3A,B). The discrepancy in the induction of the UPR^{mt} markers or worm development between *lonp-1* deletion and *lonp-1(RNAi)* possibly arises from the inefficient RNAi-mediated silencing of the *lonp-1* gene, which is not adequate to induce UPR^{mt}. We confirmed this using a *lonp-1(RNAi)* clone in wt worms carrying the *hsp-6p::gfp* reporter (data not shown).

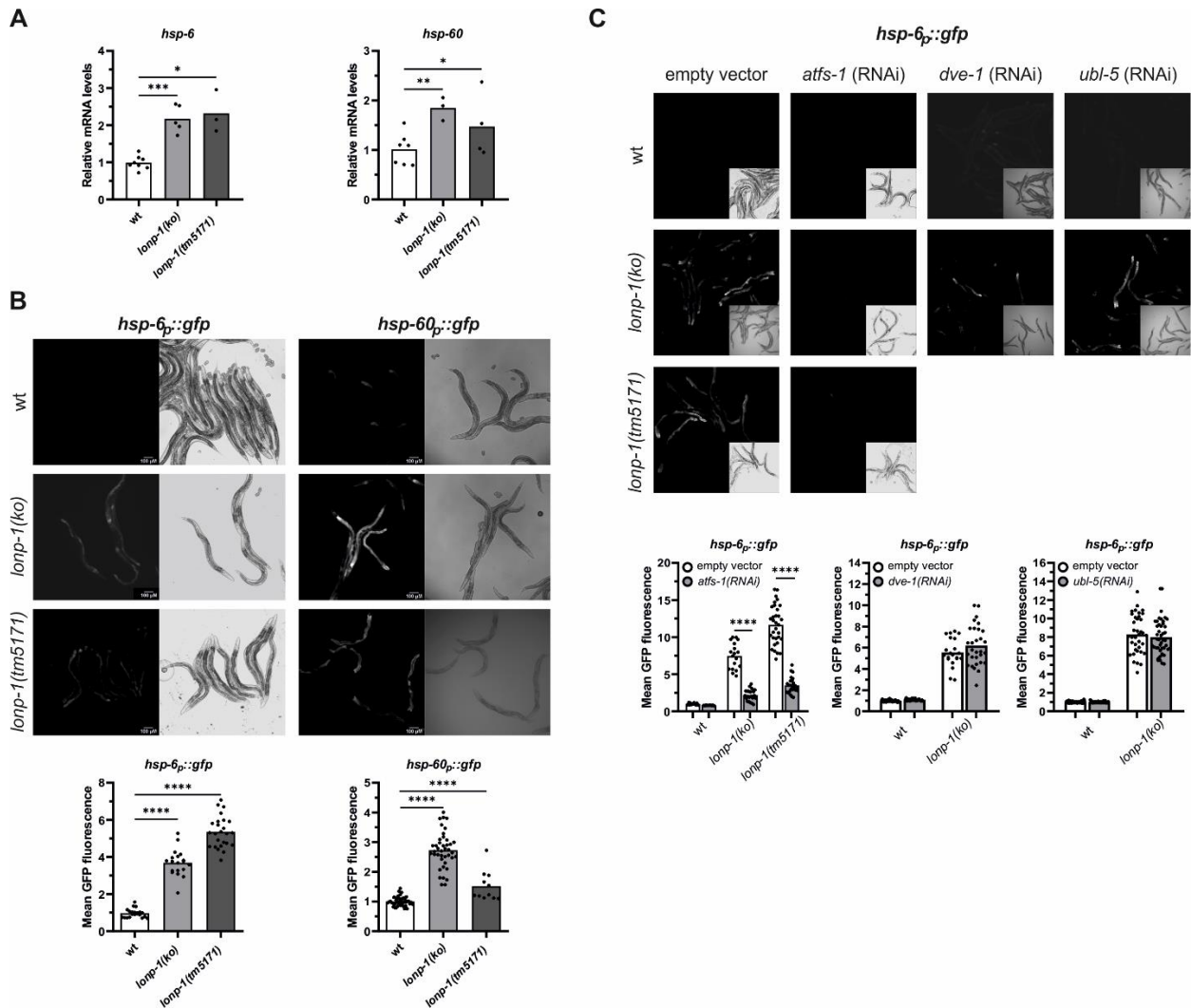


Figure 3. Deletion of *lonp-1* induces UPR^{mt} in *C. elegans*. **(A)** Quantification of the relative mRNA levels of endogenous *hsp-6* and *hsp-60* genes in wt and *lonp-1* worms on the first day of adulthood. The normalized mean fold-change of all biological replicates relative to control strain is shown, and significance was assessed by paired *t*-test. **(B)** Representative microscopy images and GFP fluorescence quantification of the UPR^{mt} reporters *hsp-6p::gfp* and *hsp-60p::gfp* in wt and *lonp-1* adults. In both graphs, an unpaired *t*-test was used to assess significance (*p* value). **(C)** Representative microscopy images and GFP quantification of the UPR^{mt} reporter *hsp-6p::gfp* in 1-day adult wt and *lonp-1* mutants, subjected throughout their life to RNAi against *atfs-1*, *dve-1*, or *ubl-5*, compared with animals fed the empty vector. Two-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test was used to assess the significance of treatment in each strain (showed as asterisks in each graph) and the interaction between genotype and RNAi treatment ($p < 0.0001$ for *atfs-1(RNAi)* in both *lonp-1* mutants, $p = 0.2510$ for *dve-1(RNAi)* and $p = 0.4728$ for *ubl-5(RNAi)* in *lonp-1(ko)* worms). In all panels, asterisks denote statistical significance: * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 , *** $p = 0.0001$ – 0.001 , **** $p < 0.0001$.

Induction of the fluorescence levels of *hsp-6p::gfp* in *lonp-1* mutant strains was dependent on ATFS-1 transcriptional activity, as feeding worms with *atfs-1(RNAi)* suppressed

this induction (Figure 3C). However, the homeodomain-containing transcription factor DVE-1 and the small ubiquitin-like protein UBL-5, both of which are known to work in parallel to *atfs-1* in the nucleus to activate UPR^{mt} [24], did not disrupt the induction of *hsp-6p::gfp* in *lonp-1* worms (Figure 3C). The mitochondrial matrix protease CLPP-1/ClpP and the mitochondrial inner-membrane localized peptide transporter HAF-1 have also been linked to UPR^{mt} signaling [24]. Nevertheless, the *lonp-1* deficiency was sufficient to induce the activation of *hsp-6p::gfp* by a *lonp-1* deletion in a *clpp-1*- and *haf-1*-independent manner (Supplementary Figure S4A,B). The integrated stress response pathway (ISR) is required for UPR^{mt} induction upon mitochondrial dysfunction in mammals but is dispensable for induction of the UPR^{mt} in worms [42]. The *atf-4* (T04C10.4) gene (previously named *atf-5*, [63]) encodes for the single worm homolog of ATF4 and ATF5 bZIP transcription factors that are induced when translation is suppressed in mammalian ISR. Using an established ISR marker that expresses the intact *atf-4* gene, including the upstream ORFs, fused with *gfp* [63], we showed the lack of reporter's induction in *lonp-1(ko)* worms (Supplementary Figure S4C), excluding global translation suppression in these mutants.

To evaluate the impact of *atfs-1* deletion on *lonp-1* physiology and lifespan, we made many attempts to combine the loss-of-function *atfs-1(gk3094)* allele with each *lonp-1* mutant allele. Although the two genes are located in different chromosomes, we were unable to obtain fertile homozygous *atfs-1;lonp-1* offspring in crosses and only sterile double mutant animals were generated. Likewise, sustained (for two or more generations) RNAi-mediated knocking down of *atfs-1* in *lonp-1* mutants resulted in embryonic lethality and few progenies with delayed larval development, in contrast to wt worms where *atfs-1(RNAi)* had no discernible effect (Supplementary Figure S4D). Importantly, mutants of *lonp-1* displayed elevated mRNA levels of *atfs-1* (Supplementary Figure S4E), perhaps due to positive self-regulation of *atfs-1* expression by ATFS-1 itself [33]. RNAi of *atfs-1* post-developmentally (at L4 stage or young adult stage) shortened the lifespan of *lonp-1* but did not impact the lifespan of wt (Supplementary Table S3). These data support an essential role of *atfs-1* in the development and lifespan determination of *lonp-1* mutants, with ATFS-1 activity being important for worms to encounter mitochondrial proteotoxic stress induced by loss of *lonp-1* protease.

3.4. LONP-1 Deficiency Induces Cytosolic Oxidative Stress Responses

Increased levels of ROS have also been demonstrated to elicit activation of cytosolic stress signaling pathways and transcription factors that regulate the expression of ROS-detoxifying and protective systems. In *C. elegans*, SKN-1, the worm ortholog of the mammalian NRF1/2 transcription factor, coordinates a Phase II-like cellular antioxidant response [64–67] and is a transcriptional target of ATFS-1 under mitochondrial stress [33]. In agreement with this, 1-day adult *lonp-1* mutants exhibited elevated mRNA levels of *skn-1* and of two SKN-1 target genes, the glutathione S-transferases *gst-4* and *gst-13* [68,69] (Figure 4A). Using a *gst-4p::gfp* reporter [70], we confirmed the induction of *gst-4* in *lonp-1* deficient worms and treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂), a known ROS-generator substantially enhanced fluorescence in mutant compared with wt animals (Figure 4B). Depletion of *skn-1* diminished the *gst-4p::gfp* signal in both *lonp-1* and wt backgrounds; depletion of *atfs-1* mitigated the signal only in *lonp-1* mutants (Figure 4C), whereas RNAi against *dve-1* or *ubl-1* UPR^{mt} factors rather increased the levels of the *gst-4::gfp* reporter (Supplementary Figure S5A). Furthermore, treatment of worms with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), which quenches all types of ROS [71], interfered with the induction of *gst-4p::gfp* to a greater extent in *lonp-1* compared with its effect in wt animals (Supplementary Figure S5B). Likewise, the application of a mitochondrial-targeted antioxidant mitoquinol (MitoQ) completely abolished the induction of reporter in *lonp-1* mutants, reaching the levels of untreated wt worms (Supplementary Figure S5B). Taken together, our data point to an interaction of ATFS-1 activation and ROS production in *lonp-1* mutants for upregulation of *skn-1* and its target genes. In stark contrast, RNAi against *skn-1* and NAC or MitoQ supplement had no

effect on the fluorescence intensity of *hsp-6p::gfp* reporter, indicating that ATFS-1 induces *hsp-6* independently of ROS levels (Supplementary Figure S5C).

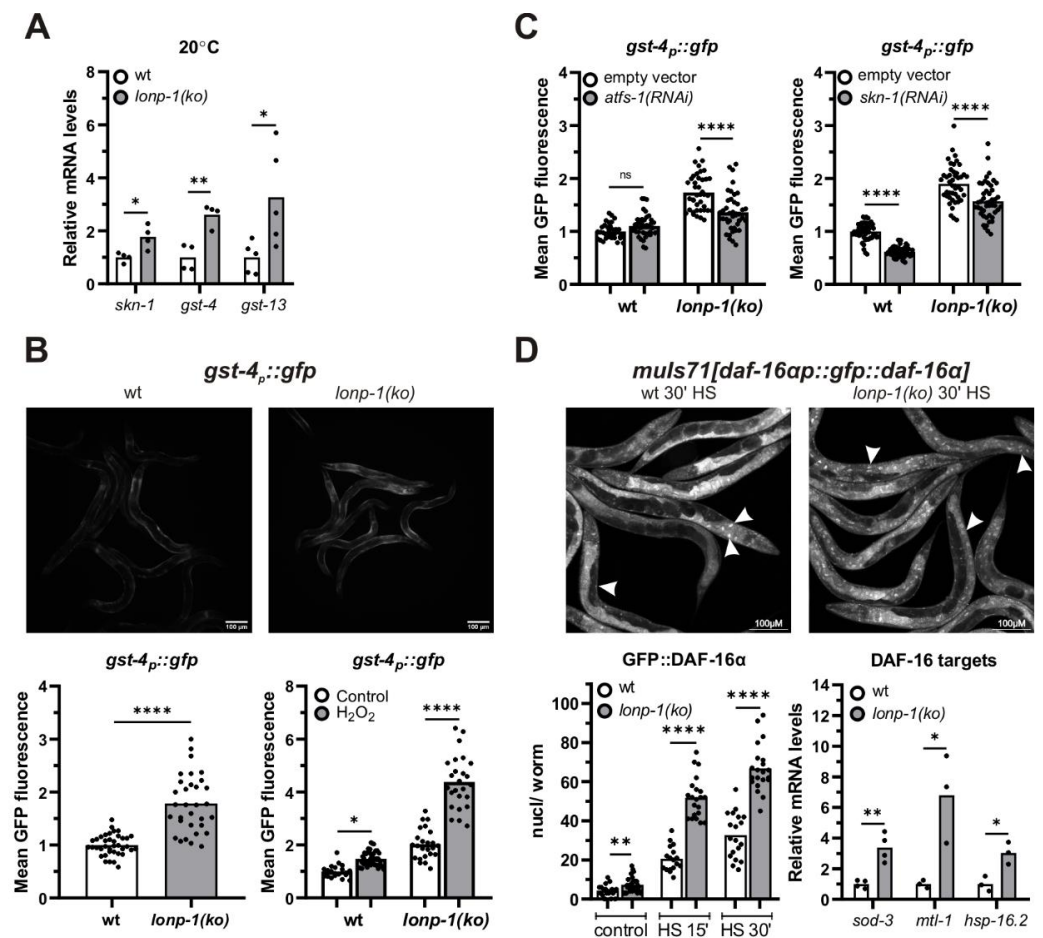


Figure 4. Activation of antioxidant and stress response mechanisms in *lonp-1* mutants. (A) Quantification of the relative mRNA levels of endogenous *skn-1* and its target genes, *gst-4* and *gst-13*, in 1-day adult wt and *lonp-1(ko)* worms grown at 20 °C. The normalized mean fold-change of all biological replicates relative to control strain is shown, and significance was assessed by paired *t*-test. (B) Representative microscopy images of *gst-4p::gfp* reporter in wt and *lonp-1(ko)* 1-day adults, under normal conditions and GFP fluorescence quantification in these animals as well as following exposure to ROS-generator H₂O₂ (10 mM for 30 min, followed by 30 min recovery before visualization). To assess significance, an unpaired *t*-test was used for worms under normal conditions, while two-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test was used to assess the significance of H₂O₂ treatment in each strain (showed as asterisks in the graph) and the interaction between genotype and treatment ($p < 0.0001$). (C) GFP quantification of the *gst-4p::gfp* reporter in wt and *lonp-1(ko)* 1-day adults subjected from eggs to RNAi against *atfs-1* or *skn-1*. Two-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test was used to assess the significance of treatment in each strain (showed as asterisks in graphs) and the interaction between genotype and each RNAi ($p < 0.0001$ for *atfs-1(RNAi)* and $p = 0.4774$ for *skn-1(RNAi)* treatment). (D) Representative microscopy images and quantification of fluorescent nuclei in wt and *lonp-1(ko)* young adults expressing the *muls71[daf-16ap::gfp::daf-16a(bKO)]* translational reporter, under normal or mild heat-shock conditions (HS for 15 or 30 min at 35 °C), with white arrows to indicate localization of the reporter in intestinal and epidermal nuclei. In the right graph, quantification of the relative mRNA levels of endogenous DAF-16 target genes in 1-day adult wt and *lonp-1(ko)* worms grown at 20 °C is shown. The normalized mean fold-change of all biological replicates is shown, and significance was assessed by paired *t*-test. In all panels, asterisks denote statistical significance: * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 , *** $p = 0.0001$ – 0.001 , **** $p < 0.0001$.

In several mitochondrial mutants, ROS accumulation can activate the forkhead transcription factor DAF-16/FOXO of the Insulin/IGF signaling pathway, and ATFS-1 has been shown to affect the expression of DAF-16 target genes, at least partially through the nuclear translocation of DAF-16 [28,72]. To monitor *in vivo* the localization of DAF-16 in *lonp-1(ko)* mutants, transgenic worms expressing the reporter *mulIs71[daf-16ap::gfp::daf-16a]* were examined under normal growth conditions and in response to mild heat stress, which triggers nuclear translocation of DAF-16. In all conditions, loss of *lonp-1* increased GFP::DAF-16 α nuclear accumulation (Figure 4D), and this was evident even though endogenous DAF-16 protein was present, as we were unable to generate a *lonp-1;daf-16* deletion strain due to the close linkage (0.02 mu) of these two genes on chromosome I. Mitochondrial Mn-SOD *sod-3*, metalloproteinase *mtl-1*, and small heat-shock protein *hsp-16.2* are *bona fide* DAF-16 target genes [73–75]. Consistent with the enhanced nuclear import of DAF-16, all three genes were upregulated in *lonp-1* mutants compared with wt animals (Figure 4D). Accordingly, in worms expressing a *sod-3p::gfp* transgene, increased fluorescence was observed upon loss of *lonp-1* (Supplementary Figure S5D). This induction was attenuated upon *atfs-1(RNAi)*, but decreasing ROS with NAC did not compromise activation of the reporter (Supplementary Figure S5E,F), supporting a role of ATFS-1 in DAF-16 activation in *lonp-1* mutants.

3.5. Induction of the Heat Shock Response (HSR) in *Lonp-1* Mutants

The heat shock response (HSR) is an adaptive mechanism in eukaryotes, activated by various stressors, such as high temperature, oxidative stress, and heavy metals, and protect cells from protein denaturation, misfolding, and aggregation. Heat shock transcription factor 1 (HSF1) induces the expression of a group of molecular chaperones, known as heat-shock proteins (*hsp*), which assist in cytosolic protein folding during stress. In the *lonp-1* mutant background, we measured transcriptional upregulation of the small *hsp-16.2* and *hsp-16.1*, as well as the two HSP70 family members *hsp-70(C12C8.1)*, and *hsp-70(F44E5.4)*, under normal growth temperature (Figure 5A). On the contrary, there was no transcriptional induction of *hsf-1*, *hsp-1/HSC70*, *daf-21/HSP90*, or the *hsp-3* and *hsp-4* chaperones, the two homologs of the mammalian HSP70 member BiP that are associated with endoplasmic reticulum UPR (UPR^{ER}) (Figure 5A). Using an *hsp-16.2p::gfp* reporter as a readout of cytosolic HSR, an enhanced signal in the *lonp-1* worm, compared with wt, was observed under mild heat stress where fluorescence of the reporter is measurable (Figure 5B). As showed by NAC supplementation, this effect is mediated, at least in part, by excessive ROS production in *lonp-1* mutants and requires heat-shock factor 1 (HSF-1) activity but not DAF-16 or ATFS-1 (Supplementary Figure S6). However, it was not possible to assess the requirement of *atfs-1* in the absence of heat stress, as *atfs-1(RNAi)*-treated wild-type worms exhibit enhanced expression of both *hsp-16.2p::gfp* reporter and endogenous *hsp-16.2* gene [28,76,77], most likely caused by enhanced mitochondrial stress. Nevertheless, activation of the HSR under unstressed conditions indicates an accumulation of misfolded and damaged proteins in the cytoplasm of *lonp-1* deficient cells.

3.6. Specific Responses of *Lonp-1* Mutants to Exogenous Stresses

LonP1 is a crucial stress-responsive protein, vital for cell survival [78], but a *lonp-1* loss in worms is able to induce the activity of key transcription factors and genes involved in stress defense and adaptation. Therefore, we explored the effects of *lonp-1* absence in counteracting various forms of stress. Following exposure to acute heat shock (HS), *lonp-1* mutants were far more resistant to heat stress compared with wt controls at day 1 of adulthood (Figure 5C). Because heat stress response in *C. elegans* is attenuated at the onset of egg laying [79], the enhanced thermotolerance of *lonp-1* mutants was further confirmed at day 3 of adulthood (Figure 5C). Additionally, *lonp-1* animals displayed extreme resistance to the high osmolarity of NaCl (Figure 5D) and increased tolerance to toxicity induced by the pro-oxidant paraquat or antimycin A, which induce superoxide anion generation in mitochondria [26,57,62,80] (Figure 5E). Also, *lonp-1* adults exhibited increased survival

compared with their wt counterparts after acute treatment with H₂O₂ or an organic peroxide named tert-butyl hydroperoxide (tBHP) (Figure 5F). Intriguingly, *lonp-1* mutants were sensitive to three other inhibitors that can induce ROS levels by several mechanisms, sodium arsenite [81], rotenone [82], and sodium azide [83] (Figure 5G), suggesting that additional stresses or metabolic changes [84] take place following exposure to these chemicals, which *lonp-1* mutants cannot overcome. The expression of the *lonp-1::gfp* transgene in *lonp-1* mutants was sufficient to alleviate the sensitivity of mutants in all these oxidants (Supplementary Figure S7A). Thus, our data unveil specific *lonp-1*-environment interactions, with a *lonp-1* deficiency affecting condition-specific defenses during the organismal oxidative stress response. Indeed, RNAi-mediated knockdown of *skn-1* or *atfs-1* significantly compromised the tolerance of wt and *lonp-1* adults to tBHP, but only *atfs-1*(RNAi) diminished the resistance of *lonp-1* to antimycin A (Supplementary Figure S7B). Finally, the extreme heat and hypertonic stress resistance were found to be independent of *atfs-1*, and *skn-1* transcription factors and NAC treatment did not compromise thermotolerance of *lonp-1* mutants (Supplementary Figure S7C).

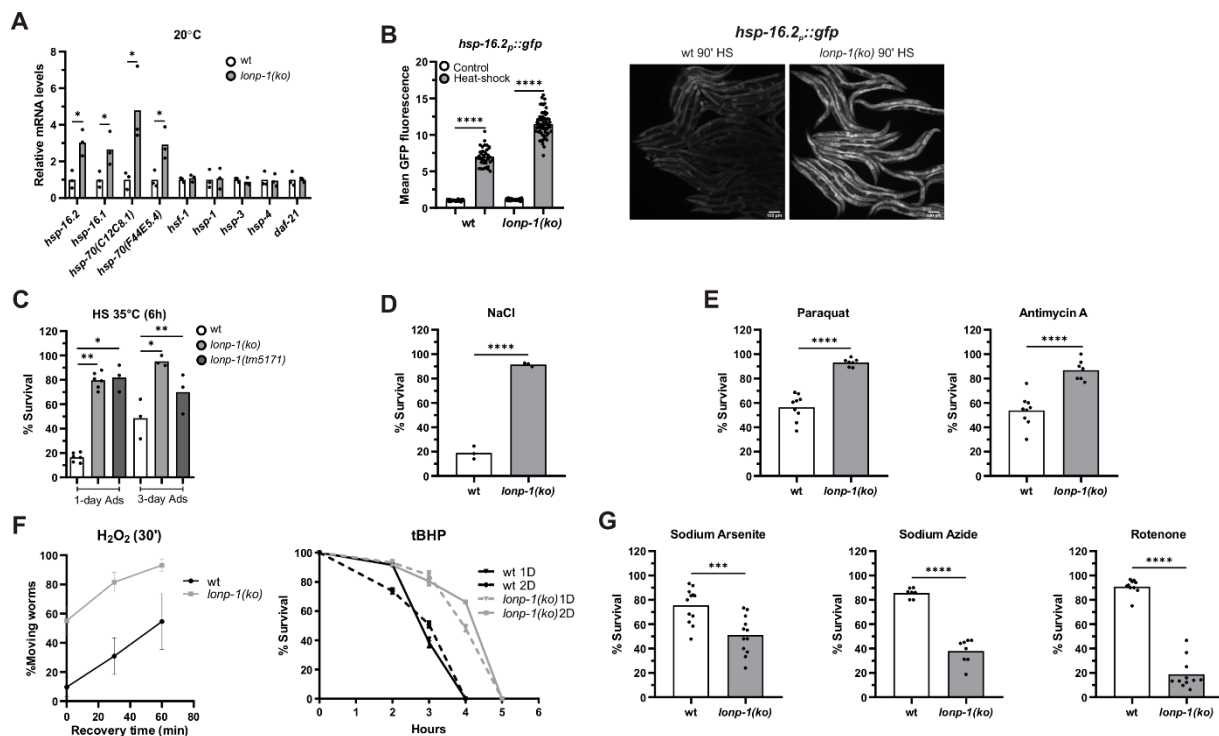


Figure 5. Loss of *lonp-1* enhances heat shock response (HSR) and induces diverse organismal responses to various stresses. (A) Quantification of the relative mRNA levels of endogenous HSR genes, and UPR^{ER}-related genes, in *lonp-1* worms under normal growth temperature (20 °C). The normalized mean fold-change of all biological replicates relative to control strain is shown, and significance was assessed by paired *t*-test. (B) Representative microscopy images and GFP fluorescence quantification of the *hsp-16.2_p::gfp* reporter in wt and *lonp-1(ko)* worms subjected to heat shock (HS at 35 °C for 90 min). Two-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test was used to assess the significance of treatment in each strain (showed as asterisks in the graph) and the interaction between genotype and HS ($p < 0.0001$). Scale bar, 100 μm. Resistance to (C) HS (35 °C for 6 h), (D) osmotic stress (500 mM NaCl for 24 h), (E) paraquat (30 mM for 48 h) or antimycin A (40 μM for 24 h) and (F) H₂O₂ (10 mM for 30 min) or tBHP (10 mM), of *lonp-1* mutants at day 1 or 2 of adulthood, at the indicated time periods. (G) On the contrary, *lonp-1* mutants exhibit increased sensitivity to oxidants sodium arsenite (7.5 mM), sodium azide (1.5 mM), and rotenone (10 μM) after 24 h exposure on day 1 of adulthood. The percentage survival for all biological replicates was plotted, and an unpaired *t*-test was used to assess significance (*p* value). In all panels, asterisks denote statistical significance: * $p = 0.01$ –0.05, ** $p = 0.001$ –0.01, *** $p = 0.0001$ –0.001, **** $p < 0.0001$.

3.7. Treatment of Worms with CDDO-Me Induced *Lonp-1*-Specific Responses

CDDO-Me, the methyl ester derivative of CDDO triterpenoid, has been shown to bind and selectively inhibit the protease activity of LON in human cells [85], inducing mitochondrial protein aggregation, fragmentation of mitochondria, and apoptosis in colon cancer cells [86]. We first treated *C. elegans* with this triterpenoid and observed dose-dependent retardation in the growth of both wt and *lonp-1* mutants, indicating that both can take up the compound from the plates' surface (Supplementary Figure S8A). Next, we analyzed the expression of the stress-responsive genes in wt worms treated with CDDO-Me either from eggs (long-term) or at the end of the L4 stage for 24 h (short-term). In both conditions, there was a robust induction of cytosolic small *hsp* and *hsp-70* genes, but not of ER-specific *hsp-3* chaperone, compared with DMSO-treated controls (Figure 6A). Long-term treatment of wt worms with CDDO-Me led to further up-regulation of antioxidant genes, such as *gst-4* and *gst-13* (*skn-1*-target) or *mtl-1* (*daf-16*-target), without affecting the expression levels of *skn-1* or *atfs-1* (Figure 6B). Interestingly, this up-regulation of antioxidant genes was not observed in the *lonp-1* mutant background, where a significantly smaller induction of *hsp* genes occurred (Figure 6C). Although the cellular mechanism of action and the specificity of CDDO-Me are ambiguous, our data support a hypothesis in which these responses could have been triggered by a possible inhibitory function of CDDO-Me on LONP-1.

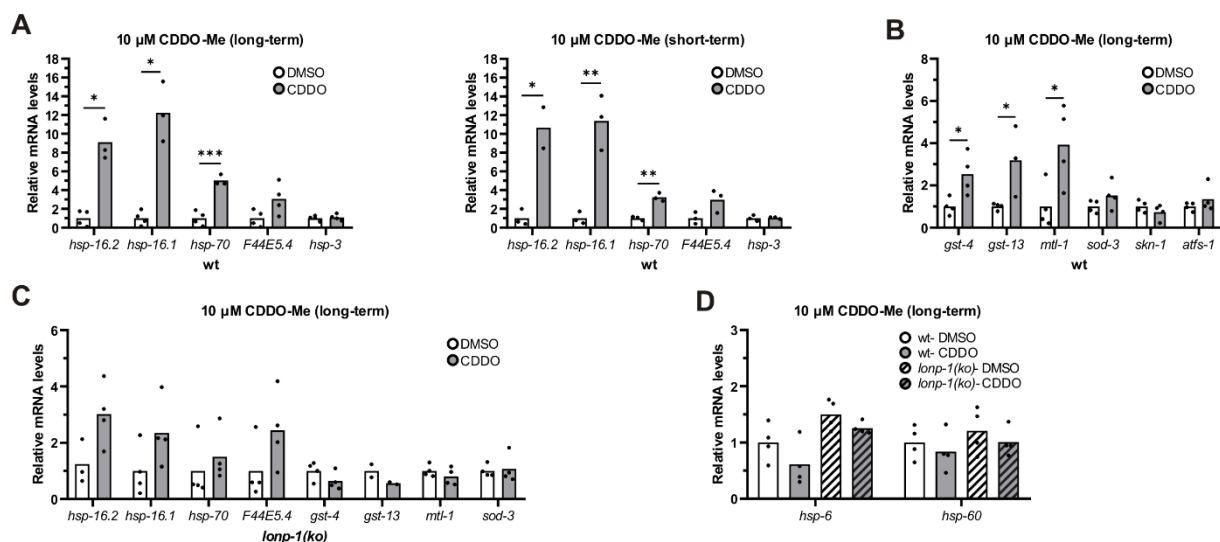


Figure 6. CCDO-Me induces specific stress-responsive genes in wt worms. (A) Quantification of the relative mRNA levels of endogenous HSR genes in wt 1-day adult worms, treated with 10 μ m CDDO-Me from eggs (long-term) or at the L4 stage for 24 h (short-term), under normal growth temperature (20 $^{\circ}$ C). (B) Quantification of the relative mRNA levels of endogenous oxidative stress genes in wt 1-day adult worms, treated with 10 μ m CDDO-Me from eggs (long-term), under normal growth temperature (20 $^{\circ}$ C). (C) Quantification of the relative mRNA levels of all tested stress genes in *lonp-1(ko)* 1-day adults, treated with 10 μ m CDDO-Me from eggs (long-term), under normal growth temperature (20 $^{\circ}$ C). (D) Quantification of the relative mRNA levels of endogenous UPR^{mt} genes in wt and *lonp-1(ko)* 1-day adult worms, treated with 10 μ m CDDO-Me from eggs (long-term), under normal growth temperature (20 $^{\circ}$ C). In all graphs, the normalized mean fold-change of all biological replicates relative to control strain is shown, and significance was assessed by paired *t*-test (* $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 , *** $p = 0.0001$ – 0.001).

Compatible with the induced HSR genes, CDDO-Me profoundly improved the tolerance of 1-day wt adults to heat stress and did not further enhance the heat resistance of *lonp-1* mutants (Supplementary Figure S8B). The enhanced thermotolerance of CDDO-Me-treated worms was *atfs-1*-independent, as handling a loss-of-function *atfs-1(gk3094)* mutant strain with CDDO-Me resulted in HS resistance as well (Supplementary Figure S8B). In

addition, treatment with CDDO-Me increased survival of wt but not of *lonp-1* mutants to oxidative stress induced by tBHP (Supplementary Figure S8C). Intriguingly, exposure of wt and *lonp-1* worms to CDDO-Me was not able to induce the UPR^{mt}, as measured by the mRNA levels of *hsp-6* and *hsp-60* chaperones (Figure 6D). In support of this, treatment of wt worms with CDDO-Me did not induce alterations in mitochondria morphology and dynamics, as assessed by MitoTracker Red staining (Supplementary Figure S8D). Combined, these data indicate that CDDO-Me, contrary to *lonp-1* gene deletion, is not able to activate UPR^{mt} in worms. Even though treatment with CDDO-Me did not alter the endogenous levels of LONP-1 protein (Supplementary Figure S8E), the fact that the transcriptional stress responses are not evident when LONP-1 is missing indicates a possible role of CDDO-Me in the induction of mito-cytosolic proteostasis mechanisms in cross talk between LONP-1 activity in the mitochondrial matrix and the cytoplasm.

3.8. Effects of LONP1-Deficiency and CDDO-Me Treatment in Human Cancer Cells

To corroborate our results from gene expression analysis in *lonp-1* mutant worms, we surveyed a number of changes in response to mitochondrial LonP1 downregulation in human cancer cells. Due to their altered proliferation rate, metabolism levels, signaling pathways activities, etc., cancer cells are under permanent stress. In order to survive, they need to somehow balance the constant presence of stress through the activation of a variety of response mechanisms. These include the mitochondrial and endoplasmic reticulum unfolded protein responses (UPR^{mt}, UPR^{ER}), the integrated stress response (ISR), the heat shock response (HSR), the antioxidant response (AR), etc. To study the effect of LonP1 disruption in cancer cells, we tested the types of responses generated by LonP1 downregulation, first by genetic knockdown and then using CDDO-Me to pharmacologically inhibit the protease. To this end, we have used two cell lines belonging to different types of cancer bearing-unlike characteristics, but both overexpressing LonP1 (Supplementary Figure S9A). HT1080 fibrosarcoma cells are known to be homozygous for CDKN2A deletion, to have an activated N-ras oncoprotein (p.Gln61Lys), and carry a p.Arg132Cys IDH1 mutation, whereas WM266-4 metastatic melanoma bear a PTEN hemizygous deletion and a BRAF p.Val600Asp mutation (<https://web.expasy.org/cellosaurus/>, last accessed on 1 December 2021).

Genetic knockdown of LonP1 (Figure 7A) was found to elicit transcriptional changes in a number of genes belonging to ISR, UPR^{mt}, HSR, and antioxidant response in HT1080 cells (Figure 7B). Intriguingly, WM266-4 melanoma cells exhibited a different general pattern of expression, displaying activation of ATF5 but no activation of the other pathways (Figure 7C). On the other hand, pharmacological inhibition of LonP1 with the use of CDDO-Me caused an evident transcriptional activation of all stress response mechanisms studied here in both cancer cell lines (Figure 8A,B). Similarly, upregulation of the ISR-related transcription factor ATF4 and the HSR-specific cytoplasmic chaperone HSP70 was confirmed in both cell lines after CDDO-Me treatment (Figure 8C), whereas, after LonP1 siRNA, only ATF4 in HT1080 cells was found to be upregulated at the protein level (Supplementary Figure S9B). Nevertheless, taken together, these findings suggest the existence of tight communication events between mitochondrial and cytoplasmic stress response in cancer cells, caused by CDDO-Me-induced LonP1 inhibition, but also after LonP1 disruption by siRNA-induced knockdown, although here the response was less prominent.

On top of the above, siRNA-mediated as well as pharmacological inhibition of LonP1 were found to interfere with the metabolic activity rate of mitochondria of both lines, as shown by the decreased relative percentages in the MTT assays, known to be based on measurements of the mitochondrial metabolic activity of cells (Figure 9A). Moreover, Western blots performed against ATP6 have shown that this alpha subunit of the ATP synthase complex, known to be essential for normal mitochondrial function, and found to be mutant or downregulated in a variety of human diseases of mitochondrial origin, was significantly downregulated in CDDO-Me- and siLonP1-treated cells of both lines (Figure 9B). The above results reflect the presence of mitochondrial dysfunction in both cell

lines after LonP1 disruption. In addition, CDDO-Me treatment (at 1 μ M) was shown to cause mild apoptotic cell death as evidenced by PARP (poly adenosine diphosphate-ribose polymerase) cleavage in both cell lines, whereas, after LonP1 siRNA, PARP cleavage could be detected only in HT1080 fibrosarcoma cells (Supplementary Figure S9C). Nevertheless, PI/FACS experiments suggested that the levels of apoptosis of CDDO-Me-treated cells were only slightly higher than the controls (Supplementary Figure S9D). Finally, we questioned the effect of LonP1 disruption on cancer cell motility. We found that although LonP1 siRNA was not able to interfere with cell movement, pharmacological inhibition of LonP1 was able to negatively affect the motility of both fibrosarcoma and melanoma cells (Figure 9C).

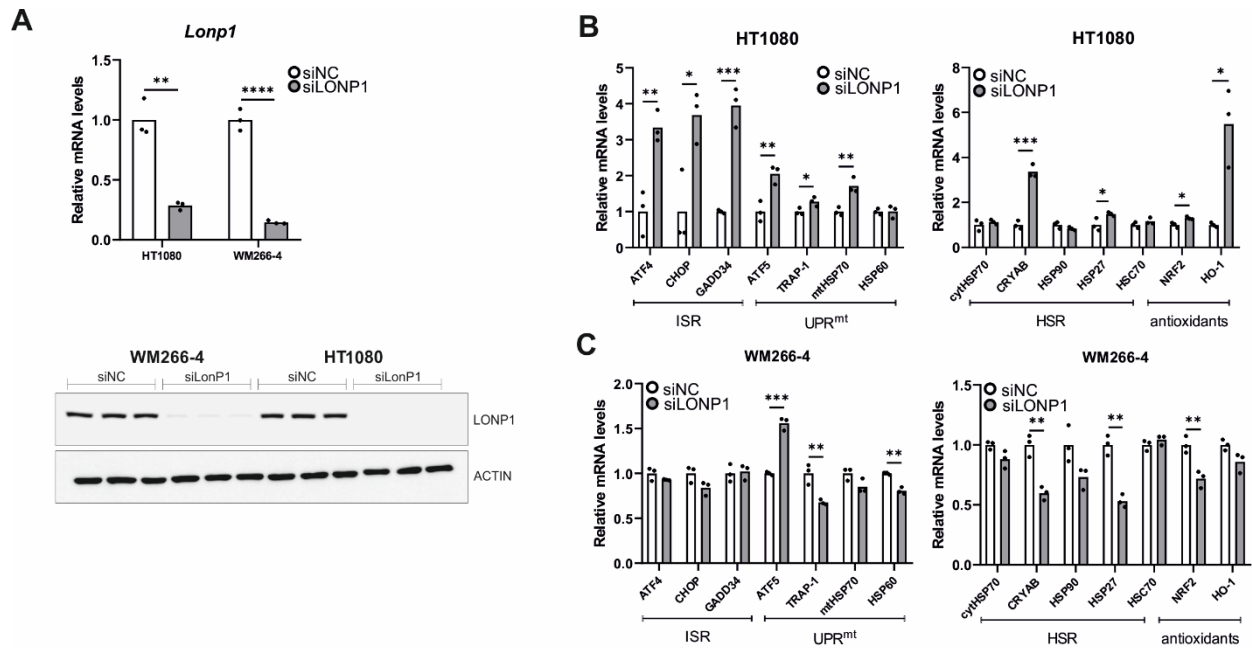


Figure 7. Effects of LonP1 silencing on stress-related gene expression in cancer cells. (A) Quantification of LonP1 relative mRNA levels and Western blot analysis presenting LonP1 versus β -ACTIN protein levels upon LonP1 silencing. Three biological replicates are represented in the blot. Quantification of relative mRNA levels of genes related to ISR (Integrated Stress Response), UPR^{mt} (mitochondrial Unfolded Protein Response), HSR (Heat Shock Response), and antioxidant responses in (B) fibrosarcoma (HT1080) and (C) metastatic melanoma (WM266-4) cell lines upon LonP1 silencing. In all graphs, the normalized mean fold-change of three biological replicates relative to the control is shown. Statistical significance was assessed by paired *t*-test. In all panels, asterisks denote statistical significance: * *p* = 0.01–0.05, ** *p* = 0.001–0.01, *** *p* = 0.0001–0.001, **** *p* < 0.0001.

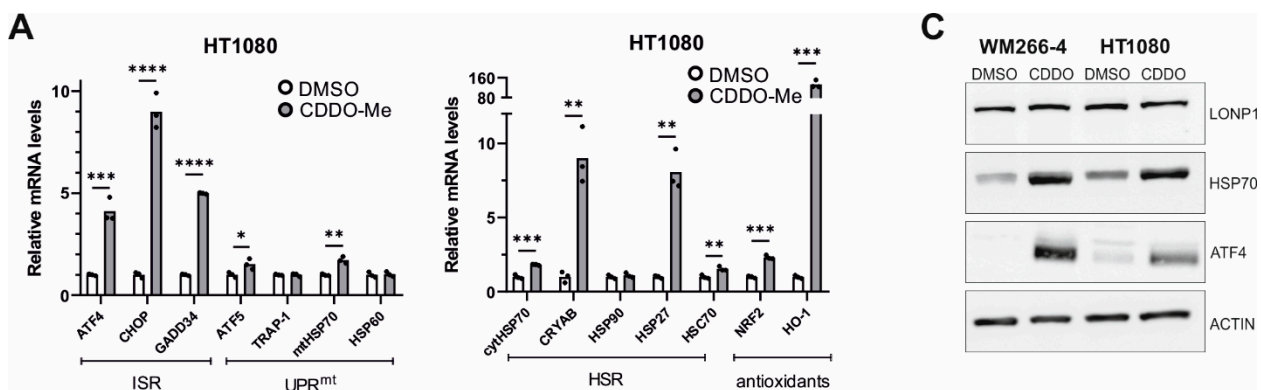


Figure 8. Cont.

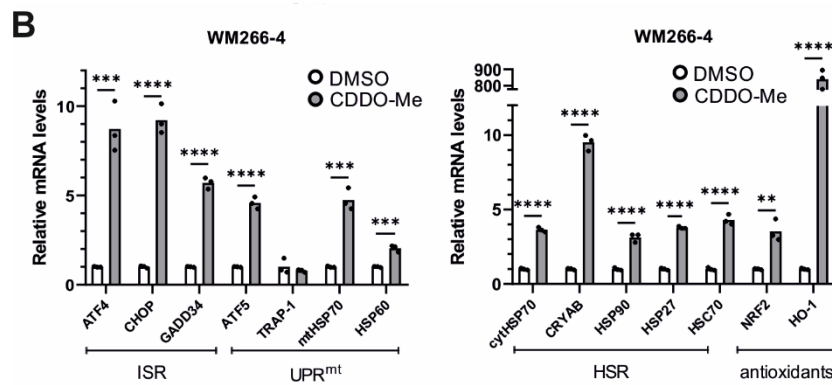


Figure 8. Effects of LonP1 pharmacological inhibition with CDDO-Me on stress-related gene expression. Quantification of relative mRNA levels after CDDO-Me treatment (1 μ M, 24 h) of genes related to ISR (Integrated Stress Response), UPR^{mt} (mitochondrial Unfolded Protein Response), HSR (Heat Shock Response), and antioxidant responses in (A) fibrosarcoma (HT1080) and (B) metastatic melanoma (WM266-4) cell lines. In all graphs, the normalized mean fold-change of three biological replicates relative to the control is shown. Statistical significance was assessed by paired *t*-test (* $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 , *** $p = 0.0001$ – 0.001 , **** $p < 0.0001$). (C) Western blot analysis of LonP1, HSP70, ATF4, and β -ACTIN from total protein extracts, in WM266-4 and HT1080 cancer cell lines, upon 1 μ M CDDO-Me treatment for 24 h. Experiments were repeated three times, while here, one representative blot is shown.

Overall, genetic, and pharmacological deactivation of LonP1 was demonstrated to impede physiological processes in both experimental systems (*C. elegans* and cancer cells) and induced similar stress-responsive transcriptional changes to adapt mitochondrial dysfunction to specific cell stresses or metabolic demands.

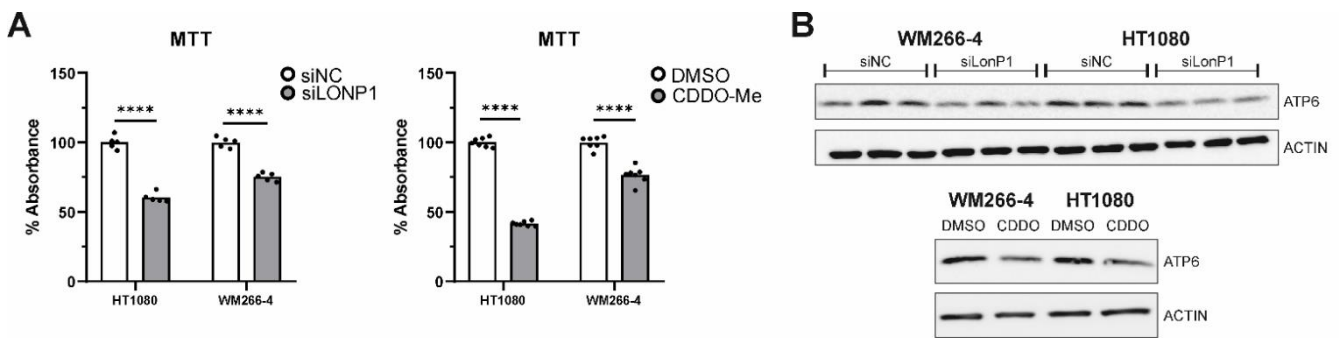


Figure 9. Cont.

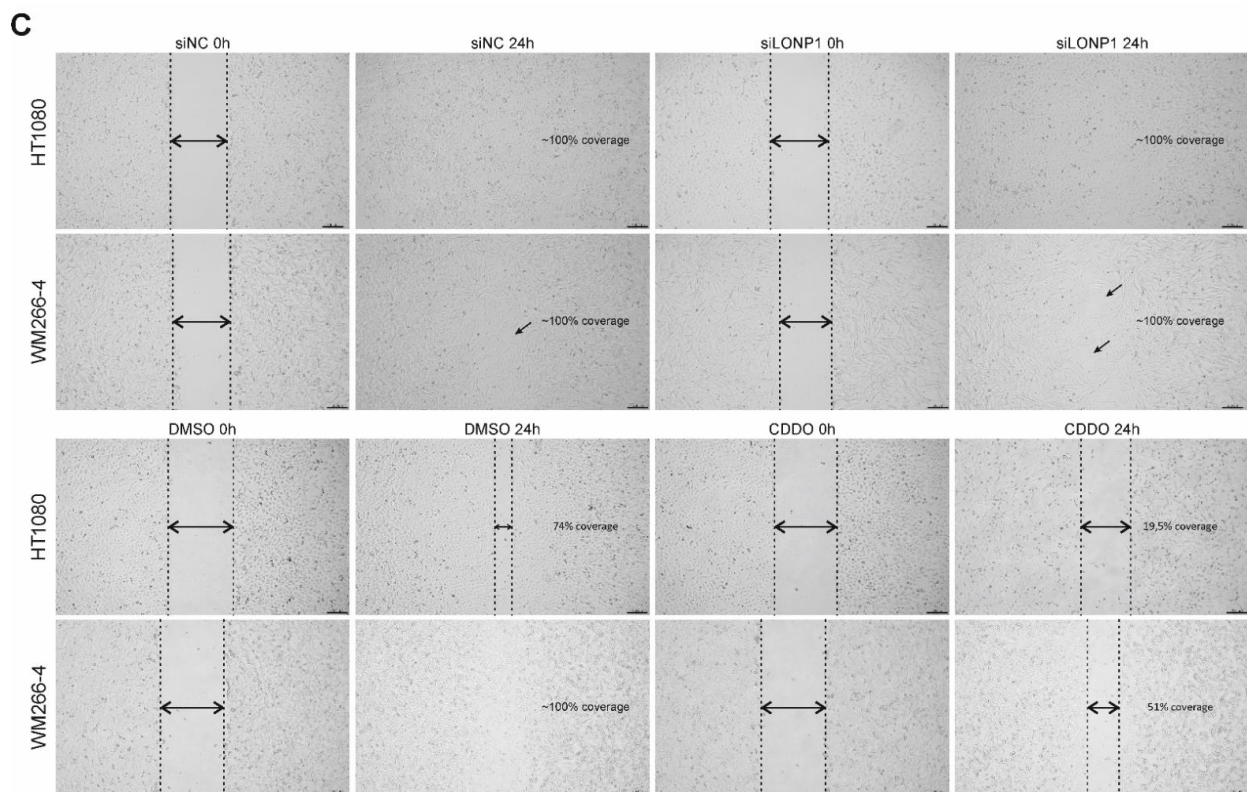


Figure 9. Effects of LonP1 disruption on mitochondrial function and motility in cancer cells. (A) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays were performed in fibrosarcoma (HT1080) and metastatic melanoma (WM266-4) cell lines after LonP1 silencing (left) or 1 μ M CDDO-Me treatment for 24 h (right). MTT assays were carried out at least three times, whereas significance was assessed by paired *t*-test (**** $p < 0.0001$). (B) Western blotting of ATP6 (25 kDa) upon LonP1 silencing (above) or 1 μ M CDDO-Me treatment for 24 h (below) in WM266-4 and HT1080 cancer cells. β -ACTIN was used as a protein of reference. (C) Scratch-wound assays were carried out for 24 h using HT1080 and WM266-4 cancer cells under control conditions versus LonP1 silencing or treatment with 500 nM of CDDO-Me. Observations were made under an inverted microscope, and pictures were taken at 4 \times magnification. Experiments were repeated three times, while here, one representative experiment is shown.

4. Discussion

Protein quality control is fundamental for the development and survival of all organisms, and proteomic integrity is preserved by a number of protein defense mechanisms and surveillance pathways that are typically intertwined. Mitochondria are a central hub of cellular metabolism and play crucial roles in integrating signals regulating cell survival. Maintenance of mitochondrial homeostasis involves several mechanisms, such as mitochondria-localized chaperones and proteases, organelle degradation, inter-organellar communication, or intra- and trans-cellular signaling [87]. Although there is significant knowledge on the regulation and function of each mechanism or pathway, mostly at the cellular level, little is known about how they are coordinated at the organismal level and connected to organismal health and aging. Moreover, mitochondrial dysfunction has been implicated in multiple human diseases [88,89].

The ATP-dependent protease LonP1 of the mitochondrial matrix is a highly conserved Serine–Lysine peptidase that plays a major role in mitochondrial protein quality control [90]. It can also regulate mitochondrial RNA metabolism and translation [44,53,91] while supporting cell viability under stress [3]. LonP1 is considered to perform various functions as a chaperone, a DNA-binding protein, and a peptidase with both nonspecific and specific proteolytic activity, even though its overall substrate repertoire remains unclear [92].

Moreover, little is yet known about how LonP1 deficiency affects cellular and organismal physiology or responses to a broad range of challenges. Such aspects still remain obscure, mainly because of the indispensable role of LonP1 in cell survival, as its deletion in *Drosophila* and the mouse causes embryonic lethality [14,53]. The fact that constitutive knockout of other mitochondrial proteases in mice results in normal embryo development and viability emphasizes the crucial role of LonP1 [14] and justifies the growing interest in elucidating its involvement in the above mechanisms. Using two experimental systems, the nematode *C. elegans* and human cancer cells, we analyzed the cellular and organismal transcriptomic stress responses to Lonp1 deficiency caused by genetic and pharmacological approaches and how these affect physiological processes and phenotypes.

Consistent with the well-described role of Lonp1 protease in mitochondrial quality control surveillance, deletion of LONP-1 protease in worms caused mitochondrial structure damage and dysfunction, accompanied by increased levels of ROS. As a result, *lonp-1* null mutants displayed a slower rate of development, smaller brood size, altered behavior, and shorter lifespan than wt animals. Additionally, loss of *lonp-1* was sufficient to induce a retrograde stress response known as UPR^{mt}, bypassing the need for CLPP-1 and HAF-1 activities, but was insufficient to induce ISR in worms. Partial inactivation of LonP1 in *Drosophila* also led to behavioral deficits, shortened lifespan, and induction of UPR^{mt} [15,53]. It is known that induction of UPR^{mt} leads to epigenetic modifications and transcriptional changes in a plethora of genes in order to restore mitochondrial function [33]. The activity of the ATFS-1 transcription factor, a critical activator in UPR^{mt}, is not essential for worms' normal growth and lifespan, but it was found to be essential for the viability of *lonp-1* null mutants. Post-developmental downregulation of *atfs-1* could also reduce the lifespan of *lonp-1* animals, signifying that the induction of UPR^{mt} contributes to the lifespan regulation of these mutants.

Besides the induction of UPR^{mt}, deletion of *lonp-1* in *C. elegans* initiated a range of cytoplasmic stress-response mechanisms to help worms cope with dysfunctional mitochondria. The activity of ATFS-1 was required for induction of UPR^{mt} in *lonp-1* mutants, independently of ROS accumulation, whereas both ATFS-1 and elevated ROS contributed to SKN-1-dependent oxidative stress response. ATFS-1 was also found to be responsible for nuclear translocation of DAF-16/FOXO transcription factor and the induction of *sod-3p::gfp* reporter in *lonp-1* adults. Although activation of DAF-16 by ROS has been observed in several long-lived mitochondrial mutants and contributes to lifespan extension [72,93], NAC treatment of *lonp-1* mutants rather increased than suppressed the induction of *sod-3p::gfp* reporter, suggesting different mechanisms of DAF-16 activation. Moreover, loss of *lonp-1* significantly enhanced basal expression of HSR genes, such as members of the HSP70 family and small HSPs. This upregulation of HSP genes and antioxidant genes was also observed upon treatment of wt worms with CDDO-Me, a triterpenoid that inhibits, among others, LonP1 in human cells. These results suggest a cross talk between the mitochondrial and cytosolic UPR mechanisms to protect cells from proteotoxic stress. Indeed, deletion of *atfs-1* was previously reported to activate the cytosolic UPR, possibly as a compensatory response for the disruption of UPR^{mt} [28,93].

Enhanced HSR, induced by disruption of several mitochondrial genes, was also shown to prevent the age-dependent collapse of cytosolic proteostasis [94]. Consistent with this, deletion of *lonp-1* significantly increased resistance to heat and other forms of stress, such as high osmolarity induced by high NaCl concentrations or acute oxidative stress induced by paraquat, antimycin, H₂O₂, or tBHP. However, *lonp-1* adults exposed to rotenone, sodium arsenite, or sodium azide were more sensitive than wt adults, indicating condition-specific defenses in organismal stress response. It has been reported that pharmacological treatment of worms with various drugs, including paraquat, antimycin A, rotenone, and sodium azide, strongly induce UPR^{mt} [95,96], whereas arsenite activates the mitochondrial antioxidant response but not the UPR^{mt} [96]. Our data demonstrate that the mechanisms which underpin stress resistance in *lonp-1* mutants can be distinct, inducing specific transcriptional programs and metabolic changes. Moreover, even though the ability to cope with stress can

have a positive impact on lifespan regulation, these can be uncoupled in *lonp-1* mutants, in agreement with previous studies on other mitochondrial mutants [28,31,97].

In human cancer cells, genetic downregulation of LonP1 by siRNA in HT1080 fibrosarcoma cells was found to cause a variety of transcriptional changes in genes belonging to a wide spectrum of cellular stress–response mechanisms, such as the mitochondrial unfolded protein response, but also the cytoplasm-based pathways of the integrated stress response, heat shock response, and antioxidant response. This suggests that complementary mechanisms are activated upon LonP1 disruption to combat mitochondrial stress. Indeed, LonP1 downregulation in HeLa cells was found to induce effects reminiscent of oxidative stress-related mitochondrial dysfunction, mainly through impairment of energy metabolic functions, such as the glycolytic and the respiratory capacity of mitochondria, and also to cause enhanced NRF2 expression and decreased cell proliferation [98]. However, siRNA-induced LonP1 disruption did not induce any of the above stress response pathways in WM266-4 metastatic melanoma cells, advocating in favor of the presence of additional compensatory mechanisms, owing to specific cellular demands. Similarly, a stable genetic LONP1 knockdown (gKD) in HeLa cells, with a significant reduction in cellular protein levels, did not cause severe alterations in mitochondrial structure and function or strong defects in mitochondrial protein degradation efficiency, at least under normal conditions [99].

On the other hand, pharmacological inhibition of LonP1 using CDDO-Me was found to transcriptionally upregulate almost all genes involved in the mitochondrial and the cytoplasmic stress response pathways described above in both cancer cell lines. The differential effect of CDDO-Me, compared with siLonP1, particularly on WM266-4 cells, indicates the existence of possible additional cellular functions targeted by CDDO-Me [100] or, alternatively, LonP1-independent regulation of mitochondrial function by CDDO-Me [101]. Furthermore, disruption of LonP1 by genetic or pharmacological knockdown caused clear mitochondrial dysfunction in both cell lines, activating an apoptotic cell suicide program. Finally, while LonP1 siRNA was not possible to significantly interfere with cell movement, treatment with CDDO-Me was found to decrease the motility of fibrosarcoma and metastatic melanoma cells, suggesting that LonP1 could be a potential target for cancer therapy in these cells. LonP1 is often overexpressed in aggressive tumors, and LonP1 deficiency has been associated with protection against other cancer types [102].

To conclude, this work highlights the crucial role of LonP1 in cellular and organismal stress response and how disruption of LonP1 activity could influence multiple signaling pathways and factors, to support the adaptation of mitochondrial function to diverse insults. Genetic and pharmacological inhibition of LonP1 has led to experimental system-specific phenotypes but also activation of similar stress responses through retrograde signaling triggered in mitochondria, which diversely modulate organismal stress response, aging, and apoptosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11081363/s1>, Figure S1: Molecular characterization of *lonp-1(tm5171)* allele; Figure S2: Phenotypic analysis of *lonp-1* mutants and partial rescue of mutant phenotypes by *lonp-1::gfp* transgenes; Figure S3: Impaired motility and induction of food-avoidance behavior in *lonp-1* mutants; Figure S4: Activation of the UPR^{mt} reporter *hsp-6p::gfp* in *lonp-1* mutant backgrounds are independent of CLPP-1 and HAF-1 factors; Figure S5: Effect of antioxidant and RNAi treatments on the activation of stress response reporters in *lonp-1* mutants; Figure S6: Effect of antioxidant and RNAi treatments on the activation of *hsp-16.2p::gfp* reporter under HS in *lonp-1* mutants; Figure S7: LONP-1 loss induces condition-specific defenses during the organismal oxidative stress response; Figure S8: Treatment of wt worms with CDDO-Me impedes growth and enhances stress resistance without affecting mitochondrial network or LONP-1 protein levels; Figure S9: LonP1 protein levels are elevated in cancer cell lines and LonP1 disruption increases ATF4 protein levels in a cell line-specific manner; Table S1: List of *C. elegans* strains used in this study; Table S2: List of primers used in this study; Table S3: Analysis of lifespan assay results.

Author Contributions: Conceptualization, G.E.V. and P.S.; data curation, S.R., G.E.V. and P.S.; formal analysis, E.T. (Eirini Taouktsi), E.K., F.B., G.E.V. and P.S.; funding acquisition, P.S.; investigation, E.T. (Eirini Taouktsi), E.K., S.S., F.B., L.B., S.A., E.T. (Efstathios Trigazis), G.E.V. and P.S.; methodology, E.T. (Eirini Taouktsi), E.K., S.S., F.B., S.R. and G.E.V.; project administration, P.S.; resources, S.R., G.E.V. and P.S.; supervision, G.E.V. and P.S.; validation, E.T. (Eirini Taouktsi), E.K., S.S., F.B., L.B., S.A., G.E.V. and P.S.; visualization, E.T. (Eirini Taouktsi) and E.K.; writing—original draft, P.S.; writing—review & editing, E.T. (Eirini Taouktsi), E.K., S.S., F.B., E.T. (Efstathios Trigazis), S.R., G.E.V. and P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research work was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (H.F.R.I.) under the “First Call for H.F.R.I. Research Projects to support Faculty members and Researchers and the procurement of high-cost research equipment grant” (Project Number: 1611).

Acknowledgments: Worm strains were provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC, University of Minnesota), which is supported by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440) and the Mitani Laboratory through the National Bio-Resource of the MEXT, Japan. We would like to acknowledge Michael Fasseas (Invermis, Magnitude Biosciences) for plasmid injections and screening of CRISPR-Cas9 generated *lonp-1(ko)* lines. We would like to thank Harris Pratsinis (Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, NCSR “Demokritos”, Athens, Greece) for his assistance in cell cycle analysis. Normal skin fibroblast cell line DSF22 was a kind gift from Dimitris Kletsas (Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, NCSR “Demokritos”, Athens, Greece). We also acknowledge BRFAA Imaging Unit. We are grateful to all members of the PS and GEV laboratories for their help and input. The authors apologize to the colleagues whose work could not be cited in this article because of space limitations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rigas, S.; Daras, G.; Tsitsekan, D.; Hatzopoulos, P. The multifaceted role of Lon proteolysis in seedling establishment and maintenance of plant organelle function: Living from protein destruction. *Physiol. Plant.* **2012**, *145*, 215–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tsitsekan, D.; Daras, G.; Alatzas, A.; Templalexis, D.; Hatzopoulos, P.; Rigas, S. Comprehensive analysis of Lon proteases in plants highlights independent gene duplication events. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2185–2197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Venkatesh, S.; Lee, J.; Singh, K.; Lee, I.; Suzuki, C.K. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 56–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yang, J.; Chen, W.; Zhang, B.; Tian, F.; Zhou, Z.; Liao, X.; Li, C.; Zhang, Y.; Han, Y.; Wang, Y.; et al. Lon in maintaining mitochondrial and endoplasmic reticulum homeostasis. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 1913–1923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Suzuki, C.K.; Suda, K.; Wang, N.; Schatz, G. Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **1994**, *264*, 273–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Van Dyck, L.; Pearce, D.A.; Sherman, F. PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 238–242. [[CrossRef](#)]
7. Bota, D.A.; Ngo, J.K.; Davies, K.J. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 665–677. [[CrossRef](#)]
8. Bayot, A.; Gareil, M.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Roepstorff, P.; Friguet, B.; Bulteau, A.L. Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11445–11457. [[CrossRef](#)]
9. Bayot, A.; Gareil, M.; Chavatte, L.; Hamon, M.P.; L’Hermitte-Stead, C.; Beaumatin, F.; Priault, M.; Rustin, P.; Lombès, A.; Friguet, B.; et al. Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. *Biochimie* **2014**, *100*, 38–47. [[CrossRef](#)]
10. Voos, W.; Pollecker, K. The mitochondrial Lon protease: Novel functions off the beaten track? *Biomolecules* **2020**, *10*, 253. [[CrossRef](#)]
11. Matsushima, Y.; Takahashi, K.; Yue, S.; Fujiyoshi, Y.; Yoshioka, H.; Aihara, M.; Setoyama, D.; Uchiumi, T.; Fukuchi, S.; Kang, D. Mitochondrial Lon protease is a gatekeeper for proteins newly imported into the matrix. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lu, B.; Lee, J.; Nie, X.; Li, M.; Morozov, Y.I.; Venkatesh, S.; Bogenhagen, D.F.; Temiakov, D.; Suzuki, C.K. Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 121–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Haynes, C.M.; Fiorese, C.J.; Lin, Y.F. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: The mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 311–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Quiros, P.M.; Espanol, Y.; Acin-Perez, R.; Rodriguez, F.; Barcena, C.; Watanabe, K.; Calvo, E.; Loureiro, M.; Fernandez-Garcia, M.S.; Fueyo, A.; et al. ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 542–556. [[CrossRef](#)]

15. Pomatto, L.C.D.; Carney, C.; Shen, B.; Wong, S.; Halaszynski, K.; Salomon, M.P.; Davies, K.J.A.; Tower, J. The mitochondrial Lon protease is required for age-specific and sex-specific adaptation to oxidative stress. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 1–15. [[CrossRef](#)]
16. Strauss, K.A.; Jinks, R.N.; Puffenberger, E.G.; Venkatesh, S.; Singh, K.; Cheng, I.; Mikita, N.; Thilagavathi, J.; Lee, J.; Sarafianos, S.; et al. CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA+ Lon protease. *Am. J. Hum. Genet.* **2015**, *96*, 121–135. [[CrossRef](#)]
17. Quirós, P.M.; Langer, T.; López-Otín, C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 345–359. [[CrossRef](#)]
18. Gibellini, L.; Losi, L.; De Biasi, S.; Nasi, M.; Lo Tartaro, D.; Pecorini, S.; Patergnani, S.; Pinton, P.; De Gaetano, A.; Carnevale, G.; et al. LonP1 differently modulates mitochondrial function and bioenergetics of primary versus metastatic colon cancer cells. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 254. [[CrossRef](#)]
19. Ngo, J.K.; Pomatto, L.C.; Davies, K.J. Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 258–264. [[CrossRef](#)]
20. Bota, D.A.; Van Remmen, H.; Davies, K.J. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett.* **2002**, *532*, 103–106. [[CrossRef](#)]
21. Bakala, H.; Delaval, E.; Hamelin, M.; Bismuth, J.; Borot-Laloi, C.; Corman, B.; Friguet, B. Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2295–2302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Erjavec, N.; Bayot, A.; Gareil, M.; Camougrand, N.; Nystrom, T.; Friguet, B.; Bulteau, A.L. Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *56*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Luce, K.; Osiewacz, H.D. Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 852–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Haynes, C.M.; Yang, Y.; Blais, S.P.; Neubert, T.A.; Ron, D. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol. Cell* **2010**, *37*, 529–540. [[CrossRef](#)]
25. Qureshi, M.A.; Haynes, C.M.; Pellegrino, M.W. The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 13500–13506. [[CrossRef](#)]
26. Yoneda, T.; Benedetti, C.; Urano, F.; Clark, S.G.; Harding, H.P.; Ron, D. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4055–4066. [[CrossRef](#)]
27. Durieux, J.; Wolff, S.; Dillin, A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* **2011**, *144*, 79–91. [[CrossRef](#)]
28. Wu, Z.; Senchuk, M.M.; Dues, D.J.; Johnson, B.K.; Cooper, J.F.; Lew, L.; Machiela, E.; Schaar, C.E.; DeJonge, H.; Blackwell, T.K.; et al. Mitochondrial unfolded protein response transcription factor ATFS-1 promotes longevity in a long-lived mitochondrial mutant through activation of stress response pathways. *BMC Biol.* **2018**, *16*, 147. [[CrossRef](#)]
29. Sun, N.; Youle, R.J.; Finkel, T. The mitochondrial basis of aging. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 654–666. [[CrossRef](#)]
30. Houtkooper, R.H.; Mouchiroud, L.; Ryu, D.; Moullan, N.; Katsyuba, E.; Knott, G.; Williams, R.W.; Auwerx, J. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* **2013**, *497*, 451–457. [[CrossRef](#)]
31. Bennett, C.F.; Vander Wende, H.; Simko, M.; Klum, S.; Barfield, S.; Choi, H.; Pineda, V.V.; Kaeberlein, M. Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Nargund, A.M.; Pellegrino, M.W.; Fiorese, C.J.; Baker, B.M.; Haynes, C.M. Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* **2012**, *337*, 587–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nargund, A.M.; Fiorese, C.J.; Pellegrino, M.W.; Deng, P.; Haynes, C.M. Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol. Cell* **2015**, *58*, 123–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Haynes, C.M.; Petrova, K.; Benedetti, C.; Yang, Y.; Ron, D. ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev. Cell* **2007**, *13*, 467–480. [[CrossRef](#)]
35. Baker, B.M.; Nargund, A.M.; Sun, T.; Haynes, C.M. Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 α kinase GCN-2. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002760. [[CrossRef](#)]
36. Tian, Y.; Garcia, G.; Bian, Q.; Steffen, K.K.; Joe, L.; Wolff, S.; Meyer, B.J.; Dillin, A. Mitochondrial stress induces chromatin reorganization to promote longevity and UPR(mt). *Cell* **2016**, *165*, 1197–1208. [[CrossRef](#)]
37. Gao, K.; Li, Y.; Hu, S.; Liu, Y. SUMO peptidase ULP-4 regulates mitochondrial UPR-mediated innate immunity and lifespan extension. *Elife* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)]
38. Kim, S.; Sieburth, D. FSHR-1/GPCR regulates the mitochondrial unfolded protein response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2020**, *214*, 409–418. [[CrossRef](#)]
39. Zhao, Q.; Wang, J.; Levichkin, I.V.; Stasinopoulos, S.; Ryan, M.T.; Hoogenraad, N.J. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *Embo J.* **2002**, *21*, 4411–4419. [[CrossRef](#)]
40. Fiorese, C.J.; Schulz, A.M.; Lin, Y.F.; Rosin, N.; Pellegrino, M.W.; Haynes, C.M. The transcription factor ATF5 mediates a mammalian mitochondrial UPR. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 2037–2043. [[CrossRef](#)]

41. Quirós, P.M.; Prado, M.A.; Zamboni, N.; D'Amico, D.; Williams, R.W.; Finley, D.; Gygi, S.P.; Auwerx, J. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 2027–2045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Anderson, N.S.; Haynes, C.M. Folding the mitochondrial UPR into the integrated stress response. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30*, 428–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kasai, S.; Yamazaki, H.; Tanji, K.; Engler, M.J.; Matsumiya, T.; Itoh, K. Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2019**, *64*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Münch, C.; Harper, J.W. Mitochondrial unfolded protein response controls matrix pre-RNA processing and translation. *Nature* **2016**, *534*, 710–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *77*, 71–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Dokshin, G.A.; Ghanta, K.S.; Piscopo, K.M.; Mello, C.C. Robust Genome Editing with Short Single-Stranded and Long, Partially Single-Stranded DNA Donors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2018**, *210*, 781–787. [[CrossRef](#)]
47. Farboud, B.; Severson, A.F.; Meyer, B.J. Strategies for efficient genome editing using CRISPR-Cas9. *Genetics* **2019**, *211*, 431–457. [[CrossRef](#)]
48. Borbolis, F.; Rallis, J.; Kanatouris, G.; Kokla, N.; Karamalegkos, A.; Vasileiou, C.; Vakaloglou, K.M.; Diallinas, G.; Stravopodis, D.J.; Zervas, C.G.; et al. mRNA decapping is an evolutionarily conserved modulator of neuroendocrine signaling that controls development and ageing. *Elife* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]
49. Syntichaki, P.; Troulinaki, K.; Tavernarakis, N. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2007**, *445*, 922–926. [[CrossRef](#)]
50. Back, P.; De Vos, W.H.; Depuydt, G.G.; Matthijssens, F.; Vanfleteren, J.R.; Braeckman, B.P. Exploring real-time in vivo redox biology of developing and aging *Caenorhabditis elegans*. *Free. Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 850–859. [[CrossRef](#)]
51. Aspernig, H.; Heimbucher, T.; Qi, W.; Gangurde, D.; Curic, S.; Yan, Y.; Donner von Gromoff, E.; Baumeister, R.; Thien, A. Mitochondrial Perturbations Couple mTORC2 to Autophagy in *C. elegans*. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 1399–1409.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ewald, C.Y.; Hourihan, J.M.; Blackwell, T.K. Oxidative stress assays (arsenite and tBHP) in *Caenorhabditis elegans*. *Bio. Protoc.* **2017**, *7*, e2365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Pareek, G.; Pallanck, L.J. Inactivation of Lon protease reveals a link between mitochondrial unfolded protein stress and mitochondrial translation inhibition. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1168. [[CrossRef](#)]
54. Lee, I.; Suzuki, C.K. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease—lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 727–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Labrousse, A.M.; Zappaterra, M.D.; Rube, D.A.; van der Bliek, A.M.C. *elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* **1999**, *4*, 815–826. [[CrossRef](#)]
56. Byrne, J.J.; Soh, M.S.; Chandhok, G.; Vijayaraghavan, T.; Teoh, J.S.; Crawford, S.; Cobham, A.E.; Yapa, N.M.B.; Mirth, C.K.; Neumann, B. Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 1967–1985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Liu, R.; Jin, P.; Yu, L.; Wang, Y.; Han, L.; Shi, T.; Li, X. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92810. [[CrossRef](#)]
58. Mao, K.; Ji, F.; Breen, P.; Sewell, A.; Han, M.; Sadreyev, R.; Ruvkun, G. Mitochondrial dysfunction in *C. elegans* activates mitochondrial relocation and nuclear hormone receptor-dependent detoxification genes. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 1182–1191.e4. [[CrossRef](#)]
59. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1–13. [[CrossRef](#)]
60. Lee, Y.W.; Lee, W.H.; Kim, P.H. Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium. *Cytokine* **2010**, *49*, 73–79. [[CrossRef](#)]
61. Schaar, C.E.; Dues, D.J.; Spielbauer, K.K.; Machiela, E.; Cooper, J.F.; Senchuk, M.; Hekimi, S.; Van Raamsdonk, J.M. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1004972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Runkel, E.D.; Liu, S.; Baumeister, R.; Schulze, E. Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Rousakis, A.; Vlassis, A.; Vlanti, A.; Patera, S.; Thireos, G.; Syntichaki, P. The general control nonderepressible-2 kinase mediates stress response and longevity induced by target of rapamycin inactivation in *Caenorhabditis elegans*. *Ageing Cell* **2013**, *12*, 742–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Walker, A.K.; See, R.; Batchelder, C.; Kophengnavong, T.; Gronniger, J.T.; Shi, Y.; Blackwell, T.K. A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *Caenorhabditis elegans* SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22166–22171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Oliveira, R.P.; Porter Abate, J.; Dilks, K.; Landis, J.; Ashraf, J.; Murphy, C.T.; Blackwell, T.K. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Ageing Cell* **2009**, *8*, 524–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. An, J.H.; Blackwell, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1882–1893. [[CrossRef](#)]
67. Blackwell, T.K.; Steinbaugh, M.J.; Hourihan, J.M.; Ewald, C.Y.; Isik, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *88*, 290–301. [[CrossRef](#)]

68. Kahn, N.W.; Rea, S.L.; Moyle, S.; Kell, A.; Johnson, T.E. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 205–213. [[CrossRef](#)]
69. Hartwig, K.; Heidler, T.; Moch, J.; Daniel, H.; Wenzel, U. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *Genes Nutr.* **2009**, *4*, 59–67. [[CrossRef](#)]
70. Glover-Cutter, K.M.; Lin, S.; Blackwell, T.K. Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003701. [[CrossRef](#)]
71. Schulz, T.J.; Zarse, K.; Voigt, A.; Urban, N.; Birringer, M.; Ristow, M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* **2007**, *6*, 280–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Senchuk, M.M.; Dues, D.J.; Schaar, C.E.; Johnson, B.K.; Madaj, Z.B.; Bowman, M.J.; Winn, M.E.; Van Raamsdonk, J.M. Activation of DAF-16/FOXO by reactive oxygen species contributes to longevity in long-lived mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Libina, N.; Berman, J.R.; Kenyon, C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* **2003**, *115*, 489–502. [[CrossRef](#)]
74. Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2003**, *424*, 277–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Tepper, R.G.; Ashraf, J.; Kaletsky, R.; Kleemann, G.; Murphy, C.T.; Bussemaker, H.J. PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell* **2013**, *154*, 676–690. [[CrossRef](#)]
76. Sorrentino, V.; Romani, M.; Mouchiroud, L.; Beck, J.S.; Zhang, H.; D’Amico, D.; Moullan, N.; Potenza, F.; Schmid, A.W.; Rietsch, S.; et al. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature* **2017**, *552*, 187–193. [[CrossRef](#)]
77. Williams, R.; Laskovs, M.; Williams, R.I.; Mahadevan, A.; Labbadia, J. A Mitochondrial Stress-Specific Form of HSF1 Protects against Age-Related Proteostasis Collapse. *Dev. Cell* **2020**, *54*, 758–772.e5. [[CrossRef](#)]
78. Ngo, J.K.; Davies, K.J. Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 1042–1048. [[CrossRef](#)]
79. Labbadia, J.; Morimoto, R.I. Repression of the heat shock response is a programmed event at the onset of reproduction. *Mol. Cell* **2015**, *59*, 639–650. [[CrossRef](#)]
80. Cochemé, H.M.; Murphy, M.P. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1786–1798. [[CrossRef](#)]
81. Hu, Y.; Li, J.; Lou, B.; Wu, R.; Wang, G.; Lu, C.; Wang, H.; Pi, J.; Xu, Y. The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules* **2020**, *10*, 240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Li, N.; Ragheb, K.; Lawler, G.; Sturgis, J.; Rajwa, B.; Melendez, J.A.; Robinson, J.P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8516–8525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Hong, M.; Kwon, J.Y.; Shim, J.; Lee, J. Differential hypoxia response of hsp-16 genes in the nematode. *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 369–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gonzalez-Hunt, C.P.; Luz, A.L.; Ryde, I.T.; Turner, E.A.; Ilkayeva, O.R.; Bhatt, D.P.; Hirschey, M.D.; Meyer, J.N. Multiple metabolic changes mediate the response of *Caenorhabditis elegans* to the complex I inhibitor rotenone. *Toxicology* **2021**, *447*, 152630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Bernstein, S.H.; Venkatesh, S.; Li, M.; Lee, J.; Lu, B.; Hilchey, S.P.; Morse, K.M.; Metcalfe, H.M.; Skalska, J.; Andreeff, M.; et al. The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: A novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives. *Blood* **2012**, *119*, 3321–3329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Gibellini, L.; Pinti, M.; Bartolomeo, R.; De Biasi, S.; Cormio, A.; Musicco, C.; Carnevale, G.; Pecorini, S.; Nasi, M.; De Pol, A.; et al. Inhibition of Lon protease by triterpenoids alters mitochondria and is associated to cell death in human cancer cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 25466–25483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Moehle, E.A.; Shen, K.; Dillin, A. Mitochondrial proteostasis in the context of cellular and organismal health and aging. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 5396–5407. [[CrossRef](#)]
88. Bender, A.; Krishnan, K.J.; Morris, C.M.; Taylor, G.A.; Reeve, A.K.; Perry, R.H.; Jaros, E.; Hersheson, J.S.; Betts, J.; Klopstock, T.; et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 515–517. [[CrossRef](#)]
89. Sheng, B.; Wang, X.; Su, B.; Lee, H.G.; Casadesus, G.; Perry, G.; Zhu, X. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 419–429. [[CrossRef](#)]
90. Bezawork-Geleta, A.; Brodie, E.J.; Dougan, D.A.; Truscott, K.N. LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17397. [[CrossRef](#)]
91. Zurita Rendón, O.; Shoubridge, E.A. LONP1 Is required for maturation of a subset of mitochondrial proteins, and its loss elicits an integrated stress response. *Mol. Cell Biol.* **2018**, *38*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Pinti, M.; Gibellini, L.; Nasi, M.; De Biasi, S.; Bortolotti, C.A.; Iannone, A.; Cossarizza, A. Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1857*, 1300–1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Soo, S.K.; Traa, A.; Rudich, P.D.; Mistry, M.; Van Raamsdonk, J.M. Activation of mitochondrial unfolded protein response protects against multiple exogenous stressors. *Life Sci. Alliance* **2021**, *4*, e202101182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Labbadia, J.; Briemann, R.M.; Neto, M.F.; Lin, Y.F.; Haynes, C.M.; Morimoto, R.I. Mitochondrial stress restores the heat shock response and prevents proteostasis collapse during aging. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 1481–1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Tjahjono, E.; McAnena, A.P.; Kirienko, N.V. The evolutionarily conserved ESRE stress response network is activated by ROS and mitochondrial damage. *BMC Biol.* **2020**, *18*, 74. [[CrossRef](#)]
96. Kim, S.; Sieburth, D. Sphingosine kinase activates the mitochondrial unfolded protein response and is targeted to mitochondria by stress. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 2932–2945.e4. [[CrossRef](#)]
97. Dues, D.J.; Schaar, C.E.; Johnson, B.K.; Bowman, M.J.; Winn, M.E.; Senchuk, M.M.; Van Raamsdonk, J.M. Uncoupling of oxidative stress resistance and lifespan in long-lived isp-1 mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108*, 362–373. [[CrossRef](#)]
98. Hamon, M.P.; Gergondey, R.; L'Honoré, A.; Friguet, B. Mitochondrial Lon protease-depleted HeLa cells exhibit proteome modifications related to protein quality control, stress response and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *148*, 83–95. [[CrossRef](#)]
99. Pollecker, K.; Sylvester, M.; Voos, W. Proteomic analysis demonstrates the role of the quality control protease LONP1 in mitochondrial protein aggregation. *JBC* **2021**, *297*, 101134. [[CrossRef](#)]
100. Borella, R.; Fonti, L.; Gibellini, L.; De Gaetano, A.; De Biasi, S.; Nasi, M.; Cossarizza, A.; Pinti, M. Synthesis and anticancer activity of CDDO and CDDO-Me, two derivatives of natural triterpenoids. *Molecules* **2019**, *24*, 4097. [[CrossRef](#)]
101. Kim, J.E.; Park, H.; Choi, S.H.; Kong, M.J.; Kang, T.C. CDDO-Me selectively attenuates CA1 neuronal death induced by status epilepticus via facilitating mitochondrial fission independent of LONP1. *Cells* **2019**, *8*, 833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Bota, D.A.; Davies, K.J. Mitochondrial Lon protease in human disease and aging: Including an etiologic classification of Lon-related diseases and disorders. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *100*, 188–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Mitochondrial p38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Insights into Its Regulation and Role in LONP1-Deficient Nematodes

Eirini Taouktsi ^{1,2}, Eleni Kyriakou ^{1,†}, Evangelia Voulgaraki ¹, Dimitris Verganelakis ^{1,3}, Stefania Krokou ¹, Stamatis Rigas ² , Gerassimos E. Voutsinas ⁴ and Popi Syntichaki ^{1,*}

¹ Laboratory of Molecular Genetics of Aging, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Center of Basic Research, 11527 Athens, Greece; eirinitaouktsi@gmail.com (E.T.); ekyriakou@biol.uoa.gr (E.K.); evageliavoulgaraki123@gmail.com (E.V.); dimitrisvrgnlks@gmail.com (D.V.); krokoustefania@gmail.com (S.K.)

² Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, 11855 Athens, Greece; srigas@aua.gr

³ Department of Biological Applications & Technology, University of Ioannina, 45500 Ioannina, Greece

⁴ Laboratory of Molecular Carcinogenesis and Rare Disease Genetics, Institute of Biosciences and Applications, National Center for Scientific Research “Demokritos”, Aghia Paraskevi Attikis, 15341 Athens, Greece; mvoutsin@bio.demokritos.gr

* Correspondence: synticha@bioacademy.gr; Tel.: +30-2106597474

† Present Address: Department of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece.

Abstract: p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) cascades are central regulators of numerous physiological cellular processes, including stress response signaling. In *C. elegans*, mitochondrial dysfunction activates a PMK-3/p38 MAPK signaling pathway (MAPK^{mt}), but its functional role still remains elusive. Here, we demonstrate the induction of MAPK^{mt} in worms deficient in the *lonp-1* gene, which encodes the worm ortholog of mammalian mitochondrial LonP1. This induction is subjected to negative regulation by the ATFS-1 transcription factor through the CREB-binding protein (CBP) ortholog CBP-3, indicating an interplay between both activated MAPK^{mt} and mitochondrial Unfolded Protein Response (UPR^{mt}) surveillance pathways. Our results also reveal a genetic interaction in *lonp-1* mutants between PMK-3 kinase and the ZIP-2 transcription factor. ZIP-2 has an established role in innate immunity but can also modulate the lifespan by maintaining mitochondrial homeostasis during ageing. We show that in *lonp-1* animals, ZIP-2 is activated in a PMK-3-dependent manner but does not confer increased survival to pathogenic bacteria. However, deletion of *zip-2* or *pmk-3* shortens the lifespan of *lonp-1* mutants, suggesting a possible crosstalk under conditions of mitochondrial perturbation that influences the ageing process. Furthermore, loss of *pmk-3* specifically diminished the extreme heat tolerance of *lonp-1* worms, highlighting the crucial role of PMK-3 in the heat shock response upon mitochondrial LONP-1 inactivation.

Keywords: mitochondria; ageing; heat stress response; *C. elegans*; LONP-1; PMK-3; ZIP-2



Citation: Taouktsi, E.; Kyriakou, E.; Voulgaraki, E.; Verganelakis, D.; Krokou, S.; Rigas, S.; Voutsinas, G.E.; Syntichaki, P. Mitochondrial p38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Insights into Its Regulation and Role in LONP1-Deficient Nematodes. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 17209. <https://doi.org/10.3390/ijms242417209>

Academic Editor: Anna-Maria Psarra

Received: 23 October 2023

Revised: 30 November 2023

Accepted: 5 December 2023

Published: 7 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The evolutionarily conserved p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling cascade transmits diverse extracellular cues to intracellular targets, regulating mainly stress responses, but also other vital cellular processes, such as cell proliferation, differentiation, immune responses, tumorigenesis and apoptosis [1,2]. The *C. elegans* genome contains three p38 MAPK homologs, PMK-1, PMK-2 and PMK-3, which are encoded by one polycistronic transcript of an operon under the activity of a broadly expressed promoter [3]. PMK-1 and PMK-2 function redundantly in the nervous system during development [4]. The neuronal functions of PMK-1 and PMK-2 are regulated by a signaling cascade consisting of the adaptor protein TIR-1, which is orthologous to mammalian Sterile α and Armadillo Motif (SARM), and the upstream kinases NSY-1 (MAP3K) and SEK-1 (MAPKK),

which are orthologous to mammalian Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3/6 (MKK3/6), respectively [5]. In contrast, PMK-3 and its upstream kinases DLK-1 (MAP3K) and MKK-4 or MLK-1 (MAPKKs) act in a cascade that regulates synapse formation [6] or axon regrowth after injury [7,8]. PMK-3 also promotes the differentiation of chemosensory BAG neurons, which sense microbe-derived carbon dioxide (CO₂) in worms [9,10].

Several studies in *C. elegans* have uncovered additional roles of PMK-1/p38 MAPK in environmental and cellular stress responses. For example, the PMK-1 pathway has a key role in regulating the expression of innate immune genes in response to various pathogens [11,12]. PMK-1 is the sole effector of the TIR-1/NSY-1/SEK-1 cascade, functioning in the intestines of worms to promote host pathogen resistance [13–16]. The PMK-1 signaling pathway is also activated in response to abiotic stressors such as cadmium [17,18] and cholesterol deprivation [19]. Additionally, during oxidative stress, it acts in the intestine to phosphorylate SKN-1, the worm ortholog of mammalian Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor (NRF) transcription factors, mainly regulating transcription of phase II detoxification genes [20–22]. Furthermore, PMK-1 and SKN-1 activities have been linked to the heat tolerance of *C. elegans*, as heat stress induces nuclear translocation of PMK-1 in intestinal cells and depletion of *pmk-1* reduces the survival rate of worms at high temperatures [23].

In contrast to PMK-1, there is little knowledge about the role of the PMK-3 signaling pathway in stress responses. A mitochondrial MAPK (MAPK^{mt}) cascade defined by DLK-1 (MAP3K), SEK-3 (MAPKK) and PMK-3 kinases was identified to be required for lifespan extension of *C. elegans* mutants with disrupted mitochondrial activity [24]. It seems that the PMK-3 pathway defines another cellular retrograde response that is activated in complement to the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}), a conserved surveillance mechanism by which metazoans respond to mitochondrial stress [25]. During UPR^{mt} activation, an increased unfolded/misfolded protein load inside the mitochondria redirects the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor ATFS-1 from the matrix to the nucleus, regulating the expression of both mitochondrial protective genes and metabolism-related genes [25,26]. In the absence of mitochondrial stress, ATFS-1 is trafficked to the mitochondrial matrix and rapidly degraded by the ATP-dependent protease LONP-1, the ortholog of mammalian LonP1 [25].

LonP1 protease belongs to the ATPase associated with diverse cellular activities (AAA⁺) family with major roles in mitochondrial protein quality control [27–29]. We have previously shown that deletion of the *lonp-1* gene in *C. elegans* increases endogenous levels of ROS, impacts the mitochondrial function and impairs physiological processes, such as growth, behavior and lifespan [30]. Loss of LONP-1 induces the UPR^{mt}, while the accompanied activation of several cytoplasmic UPR (UPR^{cyt}) responses was shown to increase the resistance of mutants to heat and other forms of stress. In addition to worms, genetic or pharmacological inhibition of human LonP1 in cancer cells induces similar mitochondrial and cytoplasmic UPR mechanisms [30]. Although the induction of such UPR pathways could result in lifespan extension of *C. elegans*, the short-lived phenotype of the *lonp-1* mutants implies the existence of additional factors/mechanisms that modulate their lifespan and possibly their viability under adverse environmental conditions. In this study, we demonstrated the induction of the MAPK^{mt} signaling pathway in *lonp-1* mutants and we examined its relationship with other mitochondrial surveillance mechanisms, in addition to the effects of its disruption on physiological functions of *lonp-1*-deficient animals. The described relationships and effects might be evolutionarily conserved, thus shedding some light on human health and mitochondrial dysfunction-related diseases.

2. Results

2.1. The MAPK^{mt} Pathway Is Active in *Lonp-1*-Deficient Mutants

Mitochondrial dysfunction caused by disruption of the mitochondrial electron transport chain, such as mutations in the Rieske iron-sulfur polypeptide 1 (*isp-1*) of complex

III, has previously been shown to activate the MAPK^{mt} pathway, which consists of DLK-1, SEK-3, and PMK-3 kinases and induces transcription of the *tbb-6* gene [24] (Figure 1A).

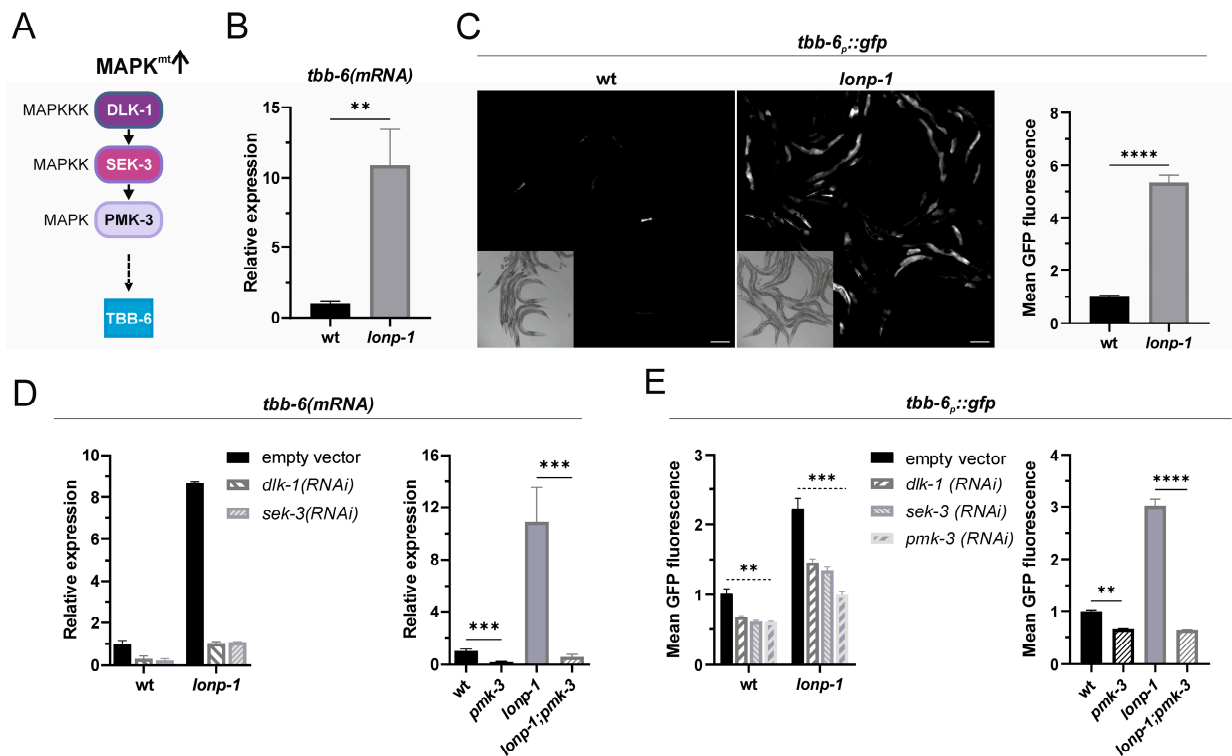


Figure 1. Activation of the mitochondrial MAPK (MAPK^{mt}) signaling pathway in *lonp-1*-deficient worms. (A) Schematic representation of the MAPK^{mt} pathway consisting of the DLK-1/SEK-3/PMK-3 kinase cascade and the downstream target gene, *tbb-6*. (B) Relative mRNA quantification of endogenous *tbb-6* gene expression levels in wt and *lonp-1*-knockout (ko) mutants. (C) Representative microscopy images and GFP fluorescence quantification of the *tbb-6_p::gfp* reporter in wt and *lonp-1*(ko) worms. (D,E) Quantification of endogenous *tbb-6* gene expression or the *tbb-6_p::gfp* reporter in wt and *lonp-1*(ko) mutants upon disruption of the MAPK^{mt} signaling components. Experiments were performed on 1-day-old adult worms grown on NGM plates, seeded with *E. coli* OP50 or with *E. coli* HT115 bacteria transformed with the indicated RNAi construct (and empty vector as a control) at 20 °C. Scale bar indicates 100 μ m. Values are presented as means \pm SEM, and asterisks denote statistical significance assessed with an unpaired Student's *t*-test or with a two-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

tbb-6 encodes for a structurally diverged member of the beta-tubulin family in *C. elegans* [31], with no reported specific functions or overt mutant phenotypes. We examined the expression levels of *tbb-6* in synchronized young adults of wild-type (wt) and *lonp-1* knockout strains and we observed elevated mRNA levels of the endogenous *tbb-6* gene (Figure 1B), as well as a strong induction of a transcriptional reporter *tbb-6_p::gfp* (Figure 1C) in the intestine and pharyngeal muscles of *lonp-1* compared to wt animals. Mild exposure to *isp-1*(RNAi) further increased the fluorescence of the reporter in *lonp-1*, indicating a strong additive mitochondrial dysfunction in *lonp-1;isp-1*(RNAi) adults (interaction $p < 0.0005$ in a two-way ANOVA; Figure S1A). In addition to *tbb-6*, the *C. elegans* beta-tubulin family comprises five more members, of which *tbb-1* and *tbb-2* are ubiquitously expressed and partially redundant, *ben-1/tbb-5* is broadly expressed in the nervous system, and *mec-7/tbb-3* and *tbb-4* are expressed only in touch receptor neurons [31]. The expressions of all three major beta-tubulins, *tbb-1*, *tbb-2*, and *ben-1*, were not changed in *lonp-1* mutant animals (Figure S1B), confirming a specific, yet unidentified, role of TBB-6 in mitochondrial dysfunction. However, the expression levels of the *tbb-6* gene and reporter were found to

severely drop upon RNAi-mediated disruption of DLK-1 and SEK-3 or deletion of PMK-3 in both wt and *lonp-1* mutants (Figures 1D,E and S2). Thus, we concluded that MAPK^{mt} signaling regulates both the basal and the *lonp-1*-induced expression of the *tbb-6* gene.

2.2. ATFS-1 Counteracts Activation of the MAPK^{mt} Pathway upon Lonp-1 Inactivation

Mitochondrial perturbation by LONP-1 deficiency has been demonstrated to elicit activation of several stress-responsive transcription factors, including SKN-1 and DAF-16, the worm orthologs of the mammalian NRF and Forkhead Box O (FOXO) factors, respectively [30]. Since the promoter of *tbb-6* contains putative binding sites for SKN-1 and DAF-16 transcription factors (WormBase version WS289), we tested their requirement for *tbb-6* induction in *lonp-1* mutants. RNAi targeting SKN-1 or DAF-16 did not reduce fluorescence of the *tbb-6_p::gfp* reporter or *tbb-6* mRNA levels (Figure S3), suggesting that these factors are not involved in the expression of *tbb-6* in *lonp-1* adults. Interestingly, genetic loss of *atfs-1* by the *gk3094* allele led to high *tbb-6* mRNA levels in an otherwise wt background (Figure 2A), and RNAi-induced depletion of *atfs-1* in a *lonp-1* background further increased the expression of the *tbb-6* gene or the *tbb-6_p::gfp* reporter (Figure 2A,B).

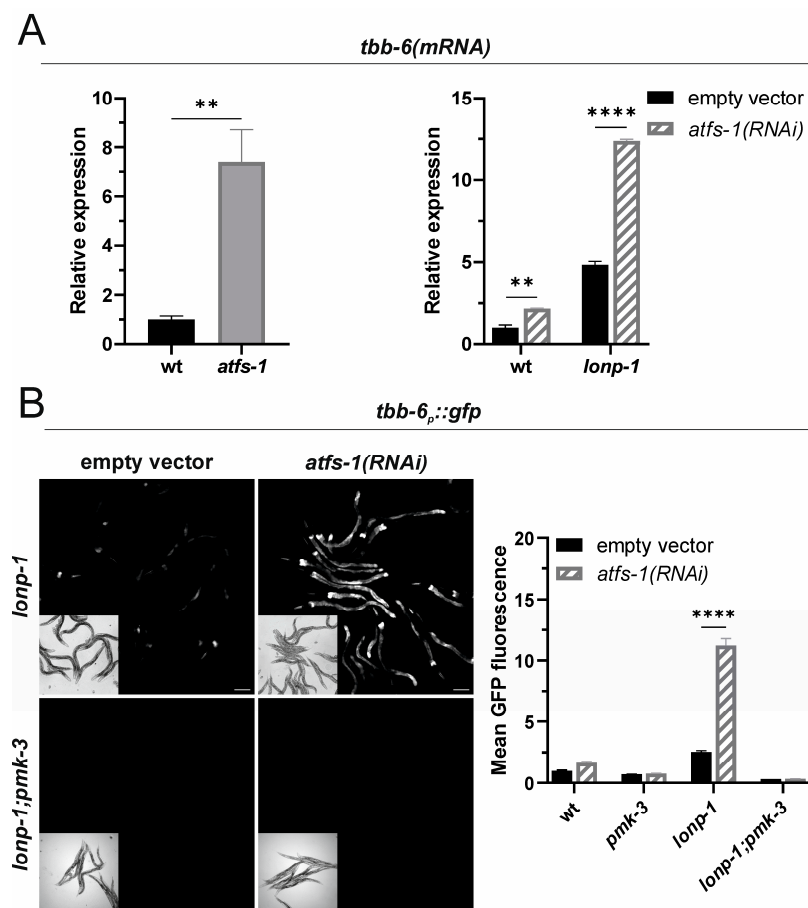


Figure 2. ATFS-1 inhibits activation of the MAPK^{mt} pathway upstream of PMK-3. (A) Relative mRNA quantification of endogenous *tbb-6* gene expression levels in wt and *atfs-1(gk3094)* loss-of-function mutants, or in wt and *lonp-1(ko)* animals subjected to RNAi against *atfs-1*. (B) Representative microscopy images and GFP fluorescence quantification of the *tbb-6_p::gfp* reporter in wt, *lonp-1(ko)*, *pmk-3(ok169)* and *lonp-1(ko);pmk-3(ok169)* worms subjected to *atfs-1(RNAi)*. Experiments were performed on 1-day-old adult worms grown on NGM plates seeded with *E. coli* OP50 or with *E. coli* HT115 bacteria transformed with the indicated RNAi construct (and empty vector as a control) at 20 °C. Scale bar indicates 100 μ m. Values are presented as means \pm SEM, and asterisks denote statistical significance assessed with an unpaired Student's *t*-test or with a two-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

These results support the notion that ATFS-1 counteracts the activity of the MAPK^{mt} pathway, as has been previously suggested for *isp-1(qm150)* mutants [24]. However, when two other UPR^{mt}-associated factors, namely DVE-1 and UBL-5 [32], were knocked down by RNAi, no difference in the signal of the *tbb-6* reporter was detected (Figure S4), suggesting that ATFS-1 exerts a repressive function independently of the canonical UPR^{mt} signaling branch. The repressive function of ATFS-1 on *tbb-6* expression occurs upstream of PMK-3, as *atfs-1(RNAi)* was not able to increase the *tbb-6_p::gfp* fluorescence in *lonp-1;pmk-3* double mutants (Figure 2B).

2.3. ATFS-1 Suppresses the Induction of *cbp-3* in *Lonp-1* Mutants

It has been reported that *tbb-6* induction in *isp-1* mutant worms depends on *cbp-3/F40F12.7*, a homolog of the mammalian acetyltransferase CBP/p300 [24]. However, *cbp-3* is probably a pseudogene of *cbp-1*, bearing only the kinase-inducible domain interacting domain (KIX) and missing the histone acetyltransferase (HAT) domain of CBP-1 [33]. Thus, in contrast to *cbp-1(RNAi)*, we showed that RNAi against *cbp-3* does not cause developmental defects and arrest in worms, possibly due to lack of the HAT domain. When *lonp-1* mutant adults were subjected to *cbp-3(RNAi)*, the expression levels of *tbb-6_p::gfp* or the endogenous *tbb-6* gene were significantly decreased (Figure 3A,B), supporting the role of *cbp-3* in the induction of *tbb-6* in a *lonp-1* background.

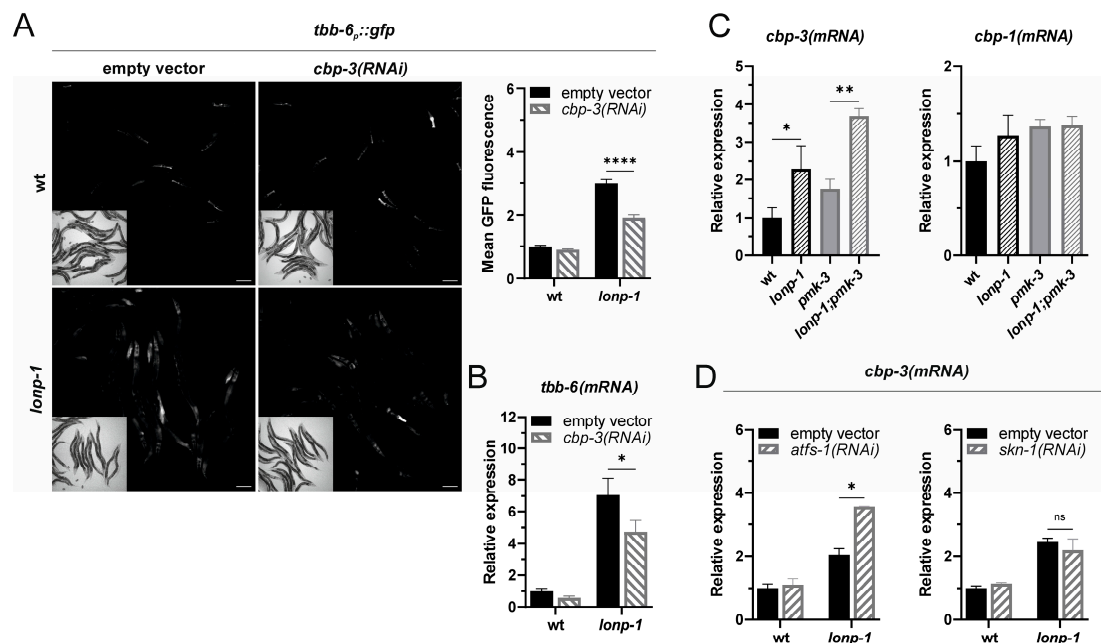


Figure 3. CBP-3 positively regulates MAPK^{mt} signaling and ATFS-1 suppresses *cbp-3* induction in *lonp-1* mutants. (A) Representative microscopy images and GFP fluorescence quantification of the *tbb-6_p::gfp* reporter in wt and *lonp-1(ko)* worms subjected to RNAi against *cbp-3*. (B) Relative mRNA quantification of endogenous *tbb-6* gene expression levels in wt and *lonp-1(ko)* worms subjected to RNAi against *cbp-3*. (C) Relative mRNA quantification of *cbp-3* and *cbp-1* gene expression levels in wt, *lonp-1(ko)*, *pmk-3(ok169)* and *lonp-1(ko);pmk-3(ok169)* worms. (D) Relative mRNA quantification of *cbp-3* gene expression levels in wt and *lonp-1(ko)* animals subjected to RNAi against *atfs-1* or *skn-1*. Experiments were performed on 1-day-old adult worms grown on NGM plates seeded with *E. coli* OP50 or with *E. coli* HT115 bacteria transformed with the indicated RNAi construct (and empty vector as control) at 20 °C. Scale bar indicates 100 μm. Values are presented as means ± SEM, and asterisks denote statistical significance assessed with a two-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

We further showed that the mRNA levels of *cbp-3*, and not those of *cbp-1*, were up-regulated in *lonp-1* mutants, independently of PMK-3 function (Figure 3C). Although the

expression of *cbp-3* has been previously shown to increase upon induction of UPR^{mt} in an ATFS-1-dependent manner [25], we found that depletion of *atfs-1* enhances, rather than decreases, the expression of *cbp-3* in *lonp-1* mutants (Figure 3D), similarly to *tbb-6*. Depletion of SKN-1 had no effect on *cbp-3* transcript levels (Figure 3D), which is consistent with the lack of effects of *skn-1(RNAi)* in *tbb-6* mRNA levels. Thus, our data suggest that ATFS-1 suppresses the induction of *cbp-3* in *lonp-1* mutants and imply a role of the KIX domain of CBP-3 in the activation of the MAPK^{mt} pathway, placing it upstream of PMK-3/TBB-6 signaling.

2.4. Induction of the MAPK^{mt} Pathway in *Lonp-1* Mutants Is Not MAD Pathway-Dependent

Mitochondrial dysfunction in yeast strongly activates the mitochondria-associated degradation (MAD) pathway [34], and inhibition of MAD components could block *tbb-6_p::gfp* induction in *isp-1* mutants [24]. The MAD pathway mediates ubiquitination and degradation of misfolded or damaged mitochondrial proteins under mitochondrial stress, analogously to the endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation pathway (ERAD). Physical interaction of CBP-3 with proteins involved in protein ubiquitination, such as F57C12.2 [35,36] and *ubq-1* [37], has been reported; thus, we wondered whether CBP-3 functions with the MAD pathway to enable induction of MAPK^{mt} in *lonp-1* mutants. *C. elegans* has two orthologs of a highly conserved AAA⁺ ATPase, named p97/VCP/CDC48 in mammals, which direct ubiquitinated proteins from cellular membranes to the 26S proteasome for degradation [38–40]. The worm orthologs, CDC-48.1 and CDC-48.2, share 88% identity over the entire p97 protein, and both have essential and redundant functions [41]. We introduced a null mutation of *cdc-48.2* into *lonp-1* worms, but did not find a significant change in fluorescence of the reporter *tbb-6_p::gfp* or the mRNA levels of *tbb-6* gene (Figure 4A). In a similar manner, depletion of *cdc-48.1* through RNAi, alone or in combination with *cdc-48.2(tm659)*, did not reduce the expression of *tbb-6* in *lonp-1* mutants (Figure 4B). These results indicate that the activity of the MAD pathway is not a prerequisite for MAPK^{mt} induction, at least in *lonp-1*-deficient worms, and *cbp-3* possibly influences PMK-3 activity through mechanisms independent of MAD signaling.

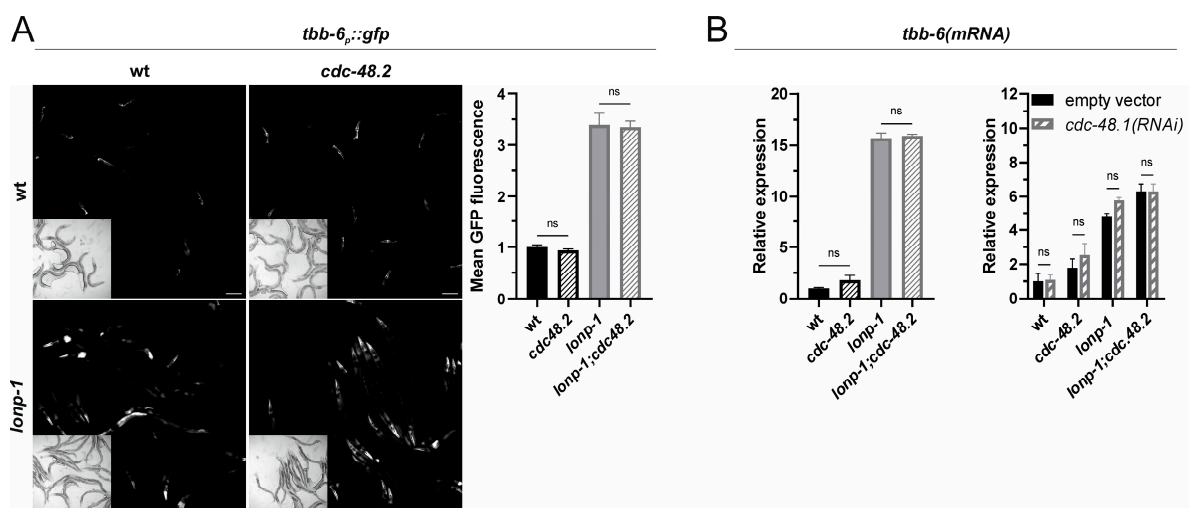


Figure 4. The MAD pathway does not mediate activation of the MAPK^{mt} pathway in *lonp-1* mutants. (A) Representative microscopy images and GFP fluorescence quantification of the *tbb-6_p::gfp* reporter in 1-day adults of wt, *cdc-48.2(tm659)*, *lonp-1(ko)* and *lonp-1(ko);cdc-48.2(tm659)*, at 20 °C. (B) Relative mRNA quantification of endogenous *tbb-6* gene expression levels in 1-day adults of the aforementioned strains, grown on NGM plates seeded with *E. coli* OP50 or with *E. coli* HT115 bacteria transformed with the *cdc-48.1(RNAi)* construct (and empty vector as control), at 20 °C. Scale bar indicate 100 μm. Values were presented as mean ± SEM, and numeric data were analyzed with a two-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test, showing no significant (ns) differences.

2.5. Loss of *Lonp-1* Induces the ZIP-2 Innate Immune Response Effector

Several studies of *C. elegans* have established that disruption of essential core processes, including mitochondrial function, can induce innate immune responses in worms [42,43]. In particular, UPR^{mt} has been shown to induce a subset of ATFS-1-dependent innate immunity genes, providing resistance to pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, independently of PMK-1/p38 MAPK [44]. One such gene is the infection response gene-1 (*irg-1*), a target of the bZIP transcription factor ZIP-2 [42,45,46], which was reported to be upregulated by ATFS-1 upon UPR^{mt} [25,44]. The expression of *irg-1* and *zip-2* was examined and was found to be significantly induced in *lonp-1* mutants compared to wt animals (Figure 5A). In addition to *irg-1*, the infection response gene-2 (*irg-2*), another ZIP-2 target [42,45], was upregulated upon *lonp-1* deletion (Figure 5A). Using a *zip-2(ok3730)* loss-of-function allele, we verified that ZIP-2 was required for basal expression of both *irg-1* and *irg-2*, whereas in a *lonp-1* mutant background, ZIP-2 was necessary only for *irg-2* induction (Figure 5A). Instead, *irg-1* could be upregulated in *lonp-1* worms by ZIP-2-independent mechanisms, as was previously reported for other conditions, e.g., suppression of translation [42].

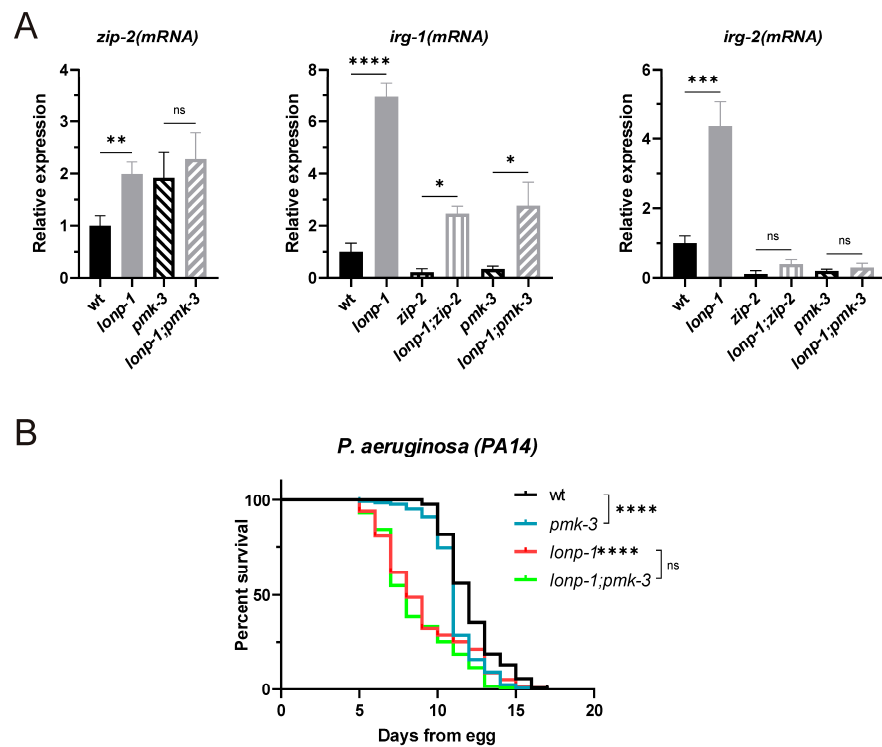


Figure 5. PMK-3-dependent activation of the bZIP transcription factor ZIP-2 does not confer resistance to pathogen infection. (A) Relative mRNA quantification of *zip-2*, *irg-1* and *irg-2* gene expression levels in 1-day-old adults of wt, *lonp-1(ko)*, *zip-2(ok3730)*, *lonp-1(ko);zip-2(ok3730)*, *pmk-3(ok169)* and *lonp-1(ko);pmk-3(ok169)* at 20 °C. Values are presented as means \pm SEM and statistical significance was assessed with an unpaired Student's *t*-test, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$. (B) Survival of slow killing *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogen infection assay in 1-day-old adults of wt, *lonp-1(ko)*, *pmk-3(ok160)* and *lonp-1(ko);pmk-3(ok169)* on NGM plates seeded with *E. coli* OP50 in the presence of FUdR at 20 °C. Statistical significance was assessed via a Kaplan–Meier survival curve, **** $p \leq 0.0001$.

Nevertheless, mitochondrial damage caused during infection by *P. aeruginosa* elicits a host defense, mediated in part by the ZIP-2 transcription factor, to promote organismal survival [47,48]. However, the increased activity of ATFS-1 and ZIP-2 in the *lonp-1* background was not sufficient to promote host resistance to infection by the *P. aeruginosa* strain PA14, and *lonp-1* adults were significantly susceptible to the pathogen compared to wt animals (Figure 5B). Given that ATFS-1 activity counteracts the activation of the MAPK^{mt}

pathway, we tested whether genetic disruption of *pmk-3* could enhance the host defense response to PA14. As shown in Figure 5B, loss of *pmk-3* did not alter the hypersensitive phenotype of *lonp-1* mutants to pathogenic bacteria, although it had a negative impact on the immune response of wt worms. In spite of that, ZIP-2-dependent expression of *irg-1* and *irg-2* genes was compromised in both *pmk-3* and *lonp-1;pmk-3* mutants, similarly to *zip-2* deletion (Figure 5A). These results suggest a genetic interaction between PMK-3 and ZIP-2 when *lonp-1* is missing, which determines the activity of ZIP-2 and affects other functions than the innate immune response.

2.6. Disruption of the MAPK^{mt} Pathway Influences *Lonp-1* Mutants' Lifespan and Stress Responses

Induction of the ZIP-2 pathway provides surveillance for several core cellular processes, and can also delay the ageing process by preserving mitochondrial homeostasis in aged worms [49]. Moreover, the extended lifespan of some, but not all, long-lived mitochondrial mutants was shown to require an active MAPK^{mt} pathway [24]. Considering the above genetic interaction between ZIP-2 and PMK-3, we examined the effects of disruption of each pathway on the lifespan of *lonp-1* mutants. Although worms deficient in the *lonp-1* gene display a shorter lifespan than the wt [30], deletion of either *zip-2* or *pmk-3* severely reduced the lifespan of *lonp-1* mutants, without affecting the normal lifespan of wt worms (Figure 6A and Table S3). This shortening of lifespans was not observed when *pmk-1*/p38 MAPK was deleted in the *lonp-1* mutant background, with loss of *pmk-1* to reduce only the brood size of both wt and *lonp-1* strains (Figure S5A,B and Table S3). Furthermore, deletion of *pmk-3*, *pmk-1* and *zip-2* (Figure S5C) did not have any impact on the growth of wt or *lonp-1* animals.

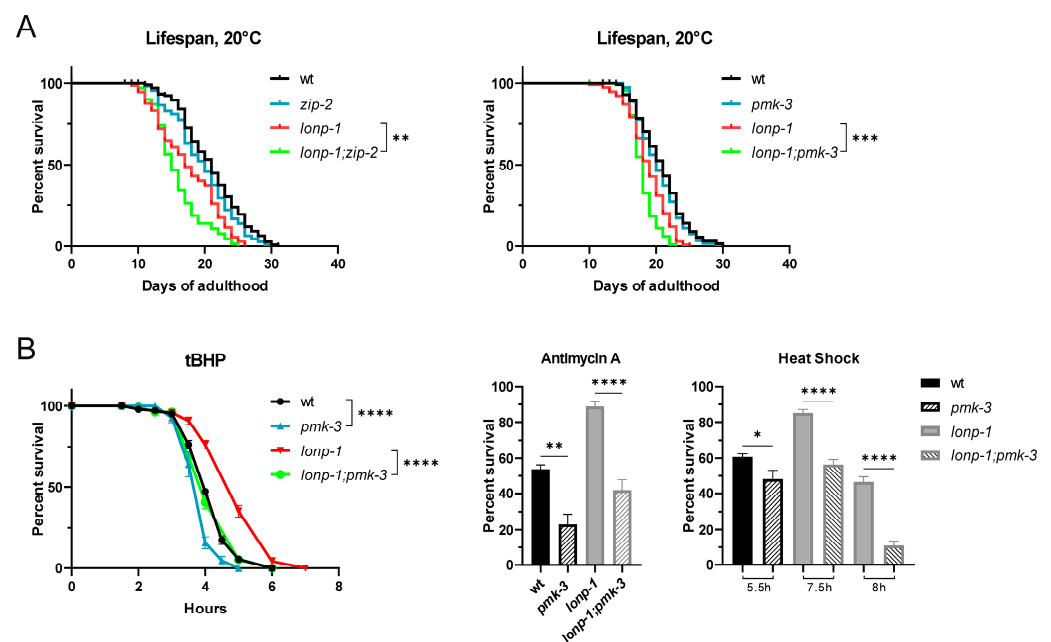


Figure 6. Loss of ZIP-2 or PMK-3 shortened the lifespan of *lonp-1* mutants and PMK-3 promotes organismal survival under stress. (A) Lifespan assays of wt, *lonp-1(ko)*, *zip-2(ok3730)*, *lonp-1(ko);zip-2(ok3730)*, *pmk-3(ok169)* and *lonp-1(ko);pmk-3(ok169)* worms on NGM plates seeded with *E. coli* OP50 at 20 °C. Replicates and statistical analysis of lifespan assays are shown in Table S3, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. (B) Survival of 1-day-old adults of wt, *lonp-1(ko)*, *pmk-3 ok160* and *lonp-1(ko);pmk-3(ok160)* strains treated with tert-butyl hydroperoxide (tBHP, 10 mM), Antimycin A (40 μ m for 24 h), or subjected to heat shock (at 35 °C for 5.5, 7.5 or 8 h). The percentage survival for all biological replicates was plotted, and an unpaired Student's *t*-test was used to assess significance, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and **** $p \leq 0.0001$.

Worms bearing deficiency in the *lonp-1* gene are short-lived relative to the wt, but exhibit an increased resilience in some forms of exogenous stress, for instance, to specific oxidants or heat shock [30]. Here, we showed that, similarly to *pmk-1* deletion, loss of *pmk-3* renders both wt and *lonp-1* worms sensitive to oxidative stress induced by the organic peroxide tert-butyl hydroperoxide (tBHP) (Figures 6B and S6A). Treatment of worms with antimycin, an inhibitor of complex III of the electron transport chain, revealed a general requirement for *pmk-3* to confront superoxide anion generation in mitochondria (Figure 6B), while *pmk-1* was required only in *lonp-1*-deficient animals (Figure S6A). These results suggest that PMK-3 is important for both wt and *lonp-1* adults to cope with oxidative stress. Moreover, deletion of *pmk-3* severely reduced the high survival rate of *lonp-1* mutants at 35 °C (Figure 6B), while loss of *pmk-1* had no effect on their extreme heat tolerance, with the double *lonp-1;pmk-1* mutants being similarly tolerant to single *lonp-1* mutants (Figure S6A). However, in a wt background, *pmk-1* deletion had a greater negative impact on thermotolerance compared to *pmk-3* deletion. Further studies are needed to address the key role of PMK-3 in the heat resistance of *lonp-1*, but it does not seem to involve *tbb-6* or *zip-2* functions (Figure S6B,C). Overall, our data support a central role of PMK-3/p38 MAPK in mediating the lifespan length and stress resistance under conditions of *lonp-1*-induced mitochondrial perturbations.

3. Discussion

In humans, mutations of the LonP1 gene are associated with a broad spectrum of diseases, including a rare multisystem developmental disorder known as CODAS (Cerebral, Ocular, Dental, Auricular, and Skeletal anomalies) syndrome, as well as neurodegeneration and cancer [27–29,50]. The mammalian protease LonP1 is a multifunctional enzyme with essential roles during development of cardiomyocyte and skeletal muscle cells [51,52]. Also, acting as both a chaperone and a protease, LonP1 plays a crucial role in protein quality control, preserving mitochondrial homeostasis in adults. An age-related decline in the expression and activity of LonP1 seems to contribute to structural and functional impairment of organs with age [29,51]. While genetic disruption of the LonP1 gene in mice and *Drosophila* results in embryonic lethality [53–55], *C. elegans lonp-1* knockout mutants are viable but exhibit disturbed mitochondrial and ROS homeostasis, resulting in impaired growth and a shortened lifespan [30]. *lonp-1*-deficient worms are extremely resistant to specific oxidants and heat stress due to induction of both mitochondrial and cytosolic stress signaling pathways. These include UPR^{mt}, where increased activity of the ATFS-1 transcription factor was found to be essential for normal development of *lonp-1* mutants and determines the resistance of *lonp-1* adults to external oxidative stress [30]. Interestingly, lack of LONP-1 was recently reported to induce constitutive formation of mitochondrial stress granules, perhaps as an adaptive response [56]. Moreover, ATFS-1 activity in long-lived *isp-1* mitochondrial mutants could prevent the induction of another mitochondrial stress signaling pathway named MAPK^{mt}, in which PMK-3/p38 MAPK upregulates the expression of the *tbb-6* beta-tubulin target gene in the intestines [24]. MAPKs are potent regulators of microtubule dynamics in mammals, and the DLK-1/PMK-3 pathway in *C. elegans* can regulate microtubule dynamics and endocytosis in neurons [57,58]. Although the exact role of TBB-6 in intestinal cells is still unknown, it has been suggested that it may function to enhance ADP entry into mitochondria during mitochondrial stress [24].

Here, we demonstrated the induction of the MAPK^{mt} pathway in *lonp-1* mutants, which is consistent with the presence of a disturbed mitochondrial network and an accumulation of ROS in these animals. Based on our results discussed below, a schematic representation of the genetic interactions and molecular functions of MAPK^{mt} in worms deficient in the *lonp-1* gene is shown in Figure 7. Depletion of *atfs-1* further enhances the expression of the *tbb-6* marker, supporting the notion that ATFS-1 suppresses MAPK^{mt} activity, probably to fine-tune it. One regulator of ATFS-1 in PMK-3 activity may be the CBP ortholog CBP-3, which contains only the kinase-inducible domain interacting domain [33], and is required for *tbb-6* induction in *isp-1* mutants [24]. We found that *cbp-3* is upregulated

in *lonp-1* worms and ATFS-1 suppresses this induction upstream of PMK-3/TTB-6 signaling. The combination of such protein interaction and phosphorylation events could be important for orchestrating the cellular processes and changing the metabolic status under two opposing signals in response to mitochondrial stress. For example, under conditions of moderate mitochondrial dysfunction, *C. elegans* can adapt and often exhibits an altered metabolism and an increased lifespan [59]. However, the ageing process can be accelerated when the activity of the different mitochondrial protein quality control systems is not in balance. In support of this, activity of the MAPK^{mt} pathway is required for the lifespan extension of some mitochondrial mutants [24]. We have shown that disruption of *atfs-1* in *lonp-1* adults reduced their lifespan [30] and here, deletion of *pmk-3* also shortened the lifespan of *lonp-1* animals. Moreover, our data as presented below uncovered a genetic interaction between PMK-3 and ZIP-2, which could influence the lifespan of *lonp-1* mutants.

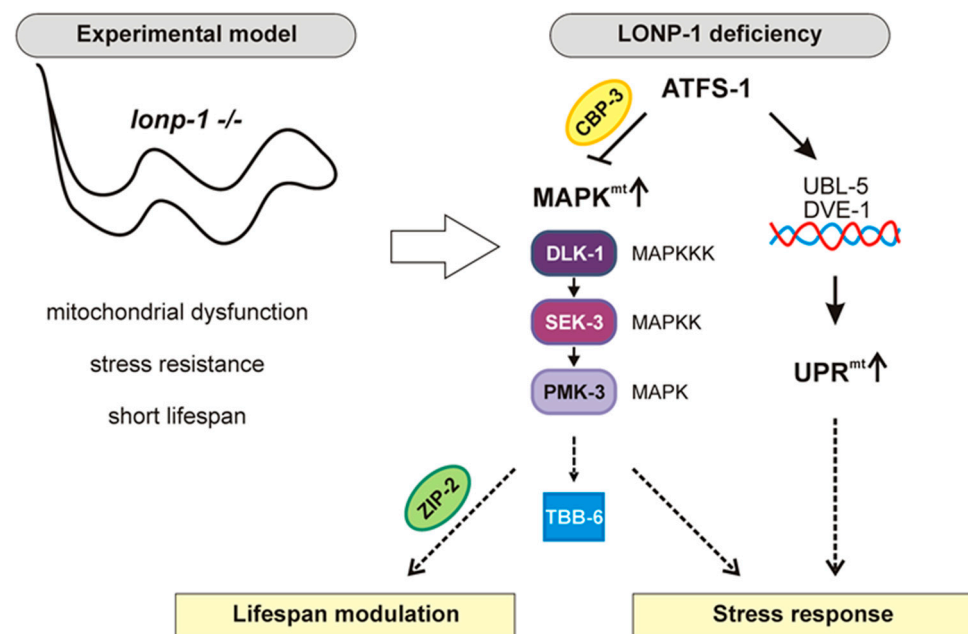


Figure 7. A schematic representation of the genetic interactions and molecular functions of MAPK^{mt} in worms deficient in the *lonp-1* gene.

ZIP-2 is a bZIP transcription factor with an established role in innate immunity [42,45,46]. Although mitochondrial dysfunction can induce immune responses in worms, mediated in part by ATFS-1 and ZIP-2 [44,47,48], the observed activation of ZIP-2 in *lonp-1* mutants was not sufficient to increase survival of mutants against pathogenic bacteria PA14. Moreover, the ZIP-2-dependent transcription of *irg-1* and *irg-2* target genes was abolished after depletion of *pmk-3*, signifying a requirement of the PMK-3 kinase for both basal and induced activity of the ZIP-2 factor, even though PMK-3 is not involved in innate immunity. Separate from its role in immunity, ZIP-2 is activated in response to age-associated mitochondrial dysfunction, independently of ATFS-1, and delays aging phenotypes by preserving mitochondrial homeostasis in aged worms [49]. In addition to this, ZIP-2 is activated and mediates lifespan extension under various dietary restriction conditions [60,61]. Since deletion of either *zip-2* or *pmk-3* significantly reduced the lifespan of *lonp-1* mutants, we speculate that this novel crosstalk between MAPK^{mt} and ZIP-2 is important in modulating the ageing process under mitochondrial dysfunction. This is strengthened by the observation that the DLK-1/PMK-3 signaling pathway declines with age, and this is overcome by mild mitochondrial stress [62]. Future studies investigating the underlying molecular mechanism and transcriptional targets are expected to shed light on the relevant ageing modulators.

We have previously shown that knockout of *lonp-1* induces a subset of stress-responsive genes associated with protective mechanisms, thereby safeguarding the mitochondrial and cytosolic proteome to defend the mitochondrial function [30]. Thus, here, we evaluated the consequences of *pmk-3* deletion on the resistance of *lonp-1* mutant adults to exogenous stresses. We confirmed that the activity of PMK-3 is indispensable for both oxidative and heat stress responses. More specifically, loss of PMK-3 significantly diminished the extreme heat resistance of *lonp-1* mutants, while deletion of *pmk-1* did not block this response. However, thermotolerance of wt animals was reduced when *pmk-1* was missing, which is consistent with a previous work, where heat was found to induce nuclear translocation of PMK-1 [23]. It has been suggested that PMK-1 might contribute to the elevated expression of *hsp* and other chaperone genes through hyperphosphorylation of heat shock factor I (HSF-1), analogously to the stress activation of mammalian HSF1 [63]. HSF-1 is the single worm homolog of the four mammalian HSFs, and its functions in thermal stress response are tightly regulated by post-translational modifications [64]. Given that the extreme thermotolerance of *lonp-1* mutants requires HSF-1 activity [30] and PMK-3, but not PMK-1 (this study), we propose that PMK-3 kinase mediates the function of HSF-1 or its regulators in *lonp-1* mutants in response to heat stress. These relationships might be evolutionarily conserved, as we have shown that genetic or pharmacological inhibition of human LonP1 in cancer cells induces the expression of genes involved in the heat shock response (HSR) [30]. Interestingly, new evidence exists for nuclear localization of mitochondrial LonP1 in mammalian cells, and this translocation is increased under heat stress, up-regulating HSF1 target genes [65]. Thus, it was suggested that LonP1 modulates the heat shock response through interaction with and possible degradation of HSF1 in the nucleus [65]. It is tempting to speculate that mammalian p38 MAPK could have a similar regulatory role with PMK-3 on LonP1 and HSF1 functions. Although in mammals there are four p38 isoforms that are highly similar to PMK-1 in worms, they exhibit differential expression/activation patterns and specific downstream effectors [1,66], raising the possibility that they may fulfill analogous cellular functions to the PMK-3 kinase in worms, promoting organismal fitness and stress responses.

4. Materials and Methods

4.1. *C. elegans* Strains and Culture Conditions

C. elegans strains were maintained at 20 °C on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* OP50 as a food source. Whenever it was necessary, NGM plates with UV-killed bacteria supplemented with 40 µg/mL 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to prevent progeny growth. All strains used in this study are listed in Table S1.

4.2. RNA Interference

RNAi experiments were conducted at 20 °C on NGM plates seeded with *E. coli* HT115 (DE3) bacteria, transformed with the indicated RNAi construct (primers listed in Table S2) or the appropriate empty vector (plasmid L4440 or T444T, Addgene, Watertown, MA, USA). Plates containing 2 mM isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) were incubated at 37 °C overnight to induce RNAi. Worms were synchronized from eggs on RNAi plates at 20 °C and transferred onto new RNAi plates when they reached L4 or the young prefertile adult stage (YA) for analysis. For post-developmental RNAi experiments, L4 to YA worms raised on OP50 plates were transferred onto RNAi plates for the indicated time.

4.3. Microscopic Analysis

Age-synchronized transgenic worms expressing the indicated fluorescence stress reporter were grown on OP50 or RNAi plates at 20 °C, and a microscopic analysis was performed in 1-day-old adults, considering the developmental delay in *lonp-1* mutants. Worms were immobilized with levamisole (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and mounted on

2% agarose pads on glass microscope slides. Images of worms were captured via fluorescent microscopy using a Leica DMRA upright fluorescent microscope equipped with a Hamamatsu ORCA-flash 4.0 camera with a 10× or 40× objective lens. All strains were assayed in parallel and microscopy settings were kept the same in each experiment. Fluorescence was measured as the average pixel intensity with ImageJ 1.52p (Fiji) [67] in the whole captured worm image or in standardized regions of the intestine. At least 50 worms per strain and condition were measured in three biological replicates, and the mean of calculated values was plotted as the mean fluorescence intensity \pm SEM. Representative fluorescence and bright field micrographs are shown for each genotype and condition.

4.4. Growth Rate and Fecundity Assays

Worms were synchronized by placing 10 gravid adults of each strain on NGM plates with adequate food (OP50) and they were allowed to lay eggs for 2–3 h before removing. Eggs were left to hatch at 20 °C, and the number of progenies in each developmental stage after 68 h was scored. The total brood size was determined at 20 °C by picking 10 L4 stage nematodes from an NGM plate and placing one nematode onto separate individual NGM plates with OP50. Individual animals were transferred onto new plates daily until the end of the spawning period of worms. The total number of F1 progeny hatched in each plate for each individual was counted.

4.5. Lifespan Analysis

Animals were synchronized by egg-laying, and 100–150 healthy L4 larvae of each strain, were transferred to three NGM plates (approximately 40 per plate) seeded with OP50 bacteria, at 20 °C. Animals were moved to fresh plates every 2–4 days and survival was scored daily by gentle prodding. Worms that failed to respond were considered dead, whereas worms raptured, burrowed into the agar, bagged (that displayed internal hatching of eggs), or animals that crawled off the plates were censored in the analysis. Statistical analysis was performed by comparing each population to the appropriate control and *p*-values were determined using the log-rank (Mantel-Cox) test. Replicates were carried out as indicated in Table S3.

4.6. Stress Sensitivity Assays

In all assays, animals were synchronized by egg laying on NGM plates with OP50 bacteria at 20 °C. Heat shock assays were performed by shifting 1-day-old adults onto three fresh plates containing approximately 30 animals per plate from 20 °C to 35 °C for the indicated time points. The percentage of alive animals was scored following 16 h of recovery at 20 °C by assessing the response to gentle touch. For the tBHP-induced oxidative stress assay, 1-day-old adult worms were placed on freshly prepared tBHP plates [30] containing 10 mM tBHP (from a stock solution of 70% in water, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) devoid of bacteria. During the initial two hours, worms were periodically relocated to the center of the plate, as they tried to “escape” from the plate and avoid tBHP, and survival was counted every hour. For antimycin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)-induced oxidative stress, synchronized L4 larvae of each strain were placed on plates containing 40 μ M FUdR for 24 h. The next day, approximately 30 worms per plate were transferred onto fresh plates without FUdR seeded with UV-killed bacteria containing 40 μ M antimycin A. Survival was monitored after 24 h on three plates per strain. At least three independent experiments were performed for each stress assay. Resilience against the human opportunistic pathogen *P. aeruginosa* was tested using the pathogen infection assay, performed by SunyBiotech (<https://www.sunybiotech.com>, accessed on 1 February 2023). In brief, age-synchronized worms of the indicated genotype were grown at 20 °C on NGM plates seeded with OP50 bacteria. Approximately 80 of the synchronized young adults of each strain were transferred to fresh FUdR-containing plates seeded with the *P. aeruginosa* strain PA14. Viability was scored daily and *p*-values were determined using the log-rank (Mantel-Cox) test.

4.7. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from frozen worm pellets, each containing 200–300 worms, as described previously [30]. In each experimental set, a minimum of three biological replicate samples were collected and analyzed independently. Relative mRNA quantities were determined using the comparative Ct method for quantification, with each sample independently normalized to the endogenous reference gene (*ama-1*). Gene expression data are presented as the average fold change of all biological replicates relative to the control. The primer sequences used for qRT-PCR are shown in Table S2.

4.8. Statistics

Graphs were constructed and statistical analyses were performed in GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com/scientificsoftware/prism, accessed on 10 December 2021). Statistical analyses were performed by comparing each sample to the appropriate control in the same condition and *p*-values were determined by a Student's *t*-test and depicted as follows: **** *p* < 0.0001; *** *p* = 0.0001–0.001; ** *p* = 0.001–0.01; * *p* = 0.01–0.05; ns indicates not significant with a *p*-value \geq 0.05. For analyses involving multiple strains and conditions, a two-way ANOVA with a Tukey's multiple comparisons analysis was used to assess the significance and differences between groups.

5. Conclusions

In *C. elegans*, the *lonp-1* gene encodes a mitochondrial AAA⁺ protease, which has been shown to play a crucial role in protein quality control across species. In this work, we found that worms deficient in *lonp-1* have an activated mitochondrial PMK-3/p38 MAPK signaling pathway. In *lonp-1* mutants, the enhanced activity of the ATFS-1 transcription factor counteracted activation of the MAPK^{mt} pathway, pointing to the existence of interconnected and fine-tuned defense mechanisms in response to mitochondrial stress. In support of this notion, both ATFS-1 and PMK-3 activities positively regulated the *lonp-1* mutants' lifespan and oxidative stress response. In addition to this, we demonstrated that PMK-3 was required for both the basic and *lonp-1*-induced transcriptional activity of ZIP-2, a bZIP transcription factor that has previously been shown to preserve mitochondrial homeostasis in aged worms independently of innate immunity. Since loss of ZIP-2 activity reduced the lifespan of *lonp-1* animals, we suggest that this genetic interaction between PMK-3 and ZIP-2 can influence the ageing process in the face of mitochondrial damage. Finally, the extreme thermotolerance of *lonp-1* mutants was found to require PMK-3 activity, uncovering a new role of MAPK^{mt} in the heat stress response when LONP-1 is missing.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms242417209/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, P.S.; formal analysis, E.T.; funding acquisition, P.S. and S.R.; investigation, E.T., E.K., E.V., D.V. and S.K.; methodology, E.T. and E.K.; project administration, P.S.; resources, S.R., G.E.V. and P.S.; supervision, S.R., G.E.V. and P.S.; visualization, E.T. and E.K.; writing—original draft, P.S.; writing—review and editing, E.T., E.K., S.R., G.E.V. and P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research work was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (H.F.R.I.) under the "First Call for H.F.R.I. Research Projects to support Faculty members and Researchers and the procurement of high-cost research equipment grant" (Project Number: 1611). S.R. also acknowledges Fondation Santé for funding (Biomedical Research Grant 2023).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: Some strains were provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC, University of Minnesota, USA), which is supported by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We are grateful to all the members of the PS and GV laboratories for their contribution and critical input. We would like to thank the BRFAA Imaging Unit for access to and technical assistance with microscopy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAP3K	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MAPK ^{mt}	Mitochondrial MAPK
UPR ^{mt}	Mitochondrial Unfolded Protein Response
UPR ^{cyt}	Cytoplasmic Unfolded Protein Response
ATF	Activating Transcription Factor
SARM	Sterile α and Armadillo Motif
ASK1	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
MKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
NRF	Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor
FOXO	Forkhead Box O
CBP	CREB-Binding Protein
MAD	Mitochondrial-Associated Degradation
bZIP	Basic Leucine Zipper
RNAi	RNA Interference
tBHP	Tert-Butyl Hydroperoxide
hsp	Heat Shock Protein
HSF	Heat Shock Factor
HSR	Heat Shock Response

References

- Maik-Rachline, G.; Lifshits, L.; Seger, R. Nuclear P38: Roles in Physiological and Pathological Processes and Regulation of Nuclear Translocation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Plotnikov, A.; Zehorai, E.; Procaccia, S.; Seger, R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1619–1633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Andrusiak, M.G.; Jin, Y. Context Specificity of Stress-activated Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Signaling: The Story as Told by *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 7796–7804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pagano, D.J.; Kingston, E.R.; Kim, D.H. Tissue expression pattern of PMK-2 p38 MAPK is established by the miR-58 family in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1004997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chuang, C.F.; Bargmann, C.I. A Toll-interleukin 1 repeat protein at the synapse specifies asymmetric odorant receptor expression via ASK1 MAPKKK signaling. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 270–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nakata, K.; Abrams, B.; Grill, B.; Goncharov, A.; Huang, X.; Chisholm, A.D.; Jin, Y. Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell* **2005**, *120*, 407–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hammarlund, M.; Nix, P.; Hauth, L.; Jorgensen, E.M.; Bastiani, M. Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* **2009**, *323*, 802–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yan, D.; Wu, Z.; Chisholm, A.D.; Jin, Y. The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. *Cell* **2009**, *138*, 1005–1018. [[CrossRef](#)]
- Brandt, J.P.; Ringstad, N. Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 2228–2237. [[CrossRef](#)]
- Horowitz, L.B.; Brandt, J.P.; Ringstad, N. Repression of an activity-dependent autocrine insulin signal is required for sensory neuron development in *C. elegans*. *Development* **2019**, *146*, dev182873. [[CrossRef](#)]
- Kim, D.H.; Feinbaum, R.; Alloing, G.; Emerson, F.E.; Garsin, D.A.; Inoue, H.; Tanaka-Hino, M.; Hisamoto, N.; Matsumoto, K.; Tan, M.-W.; et al. A Conserved p38 MAP Kinase Pathway in *Caenorhabditis elegans* Innate Immunity. *Science* **2002**, *297*, 623–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Troemel, E.R.; Chu, S.W.; Reinke, V.; Lee, S.S.; Ausubel, F.M.; Kim, D.H. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **2006**, *2*, e183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Couillault, C.; Pujol, N.; Reboul, J.; Sabatier, L.; Guichou, J.F.; Kohara, Y.; Ewbank, J.J. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 488–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liberati, N.T.; Fitzgerald, K.A.; Kim, D.H.; Feinbaum, R.; Golenbock, D.T.; Ausubel, F.M. Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6593–6598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pukkila-Worley, R.; Ausubel, F.M. Immune defense mechanisms in the *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelium. *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, *24*, 3–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shivers, R.P.; Kooistra, T.; Chu, S.W.; Pagano, D.J.; Kim, D.H. Tissue-specific activities of an immune signaling module regulate physiological responses to pathogenic and nutritional bacteria in *C. elegans*. *Cell Host Microbe* **2009**, *6*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Keshet, A.; Mertenskötter, A.; Winter, S.A.; Brinkmann, V.; Dölling, R.; Paul, R.J. PMK-1 p38 MAPK promotes cadmium stress resistance, the expression of SKN-1/Nrf and DAF-16 target genes, and protein biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Genet. Genom.* **2017**, *292*, 1341–1361. [[CrossRef](#)]
18. Wang, S.; Tang, M.; Pei, B.; Xiao, X.; Wang, J.; Hang, H.; Wu, L. Cadmium-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*: The roles of HUS1, p53, and MAPK signaling pathways. *Toxicol. Sci.* **2008**, *102*, 345–351. [[CrossRef](#)]
19. Peterson, N.D.; Ico, J.D.; Salisbury, J.E.; Rodriguez, T.; Thompson, P.R.; Pukkila-Worley, R. Pathogen infection and cholesterol deficiency activate the *C. elegans* p38 immune pathway through a TIR-1/SARM1 phase transition. *eLife* **2022**, *11*, e74206. [[CrossRef](#)]
20. Hoeven, R.; McCallum, K.C.; Cruz, M.R.; Garsin, D.A. Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002453. [[CrossRef](#)]
21. Inoue, H.; Hisamoto, N.; An, J.H.; Oliveira, R.P.; Nishida, E.; Blackwell, T.K.; Matsumoto, K. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2278–2283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hwang, M.; Shrestha, C.; Kang, S.; Kim, J. MEKK-3 Acts Cooperatively with NSY-1 in SKN-1-Dependent Manner against Oxidative Stress and Aging in *Caenorhabditis elegans*. *Biology* **2022**, *11*, 1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mertenskötter, A.; Keshet, A.; Gerke, P.; Paul, R.J. The p38 MAPK PMK-1 shows heat-induced nuclear translocation, supports chaperone expression, and affects the heat tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress Chaperones* **2013**, *18*, 293–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Munkacsy, E.; Khan, M.H.; Lane, R.K.; Borrer, M.B.; Park, J.H.; Bokov, A.F.; Fisher, A.L.; Link, C.D.; Rea, S.L. DLK-1, SEK-3 and PMK-3 Are Required for the Life Extension Induced by Mitochondrial Bioenergetic Disruption in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006133. [[CrossRef](#)]
25. Nargund, A.M.; Pellegrino, M.W.; Fiorese, C.J.; Baker, B.M.; Haynes, C.M. Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* **2012**, *337*, 587–590. [[CrossRef](#)]
26. Nargund, A.M.; Fiorese, C.J.; Pellegrino, M.W.; Deng, P.; Haynes, C.M. Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol. Cell* **2015**, *58*, 123–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ma, H.; Chen, W.; Fan, W.; He, H.; Huang, F. Roles of LonP1 in Oral-Maxillofacial Developmental Defects and Tumors: A Novel Insight. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13370. [[CrossRef](#)]
28. Pareek, G. AAA+ proteases: The first line of defense against mitochondrial damage. *PeerJ* **2022**, *10*, e14350. [[CrossRef](#)]
29. Pinti, M.; Gibellini, L.; Liu, Y.; Xu, S.; Lu, B.; Cossarizza, A. Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 4807–4824. [[CrossRef](#)]
30. Taouktsi, E.; Kyriakou, E.; Smyrniotis, S.; Borbolis, F.; Bondi, L.; Avgeris, S.; Trigazis, E.; Rigas, S.; Voutsinas, G.E.; Syntichaki, P. Organismal and Cellular Stress Responses upon Disruption of Mitochondrial Lonp1 Protease. *Cells* **2022**, *11*, 1363. [[CrossRef](#)]
31. Hurd, D.D. Tubulins in *C. elegans*. *WormBook* **2018**, *2018*, 1–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Haynes, C.M.; Petrova, K.; Benedetti, C.; Yang, Y.; Ron, D. ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev. Cell* **2007**, *13*, 467–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Li, T.Y.; Sleiman, M.B.; Li, H.; Gao, A.W.; Mottis, A.; Bachmann, A.M.; El Alam, G.; Li, X.; Goeminne, L.J.E.; Schoonjans, K.; et al. The transcriptional coactivator CBP/p300 is an evolutionarily conserved node that promotes longevity in response to mitochondrial stress. *Nat. Aging* **2021**, *1*, 165–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wu, X.; Li, L.; Jiang, H. Doa1 targets ubiquitinated substrates for mitochondria-associated degradation. *J. Cell Biol.* **2016**, *213*, 49–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Li, S.; Armstrong, C.M.; Bertin, N.; Ge, H.; Milstein, S.; Boxem, M.; Vidalain, P.-O.; Han, J.-D.J.; Chesneau, A.; Hao, T.; et al. A Map of the Interactome Network of the Metazoan *C. elegans*. *Science* **2004**, *303*, 540–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhong, W.; Sternberg, P.W. Genome-Wide Prediction of *C. elegans* Genetic Interactions. *Science* **2006**, *311*, 1481–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Koyuncu, S.; Loureiro, R.; Lee, H.J.; Wagle, P.; Krueger, M.; Vilchez, D. Rewiring of the ubiquitinated proteome determines ageing in *C. elegans*. *Nature* **2021**, *596*, 285–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Heo, J.-M.; Livnat-Levanon, N.; Taylor, E.B.; Jones, K.T.; Dephore, N.; Ring, J.; Xie, J.; Brodsky, J.L.; Madeo, F.; Gygi, S.P.; et al. A Stress-Responsive System for Mitochondrial Protein Degradation. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 465–480. [[CrossRef](#)]

39. Hirsch, C.; Gauss, R.; Horn, S.C.; Neuber, O.; Sommer, T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **2009**, *458*, 453–460. [[CrossRef](#)]
40. Xu, S.; Peng, G.; Wang, Y.; Fang, S.; Karbowski, M. The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 291–300. [[CrossRef](#)]
41. Yamanaka, K.; Okubo, Y.; Suzuki, T.; Ogura, T. Analysis of the two p97/VCP/Cdc48p proteins of *Caenorhabditis elegans* and their suppression of polyglutamine-induced protein aggregation. *J. Struct. Biol.* **2004**, *146*, 242–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dunbar, T.L.; Yan, Z.; Balla, K.M.; Smelkinson, M.G.; Troemel, E.R. *C. elegans* detects pathogen-induced translational inhibition to activate immune signaling. *Cell Host Microbe* **2012**, *11*, 375–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Melo, J.A.; Ruvkun, G. Inactivation of conserved *C. elegans* genes engages pathogen- and xenobiotic-associated defenses. *Cell* **2012**, *149*, 452–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pellegrino, M.W.; Nargund, A.M.; Kirienko, N.V.; Gillis, R.; Fiorese, C.J.; Haynes, C.M. Mitochondrial UPR-regulated innate immunity provides resistance to pathogen infection. *Nature* **2014**, *516*, 414–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Estes, K.A.; Dunbar, T.L.; Powell, J.R.; Ausubel, F.M.; Troemel, E.R. bZIP transcription factor zip-2 mediates an early response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2153–2158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. McEwan, D.L.; Kirienko, N.V.; Ausubel, F.M. Host translational inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Triggers an immune response in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Host Microbe* **2012**, *11*, 364–374. [[CrossRef](#)]
47. Kirienko, N.V.; Ausubel, F.M.; Ruvkun, G. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1821–1826. [[CrossRef](#)]
48. Tjahjono, E.; Kirienko, N.V. A conserved mitochondrial surveillance pathway is required for defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006876. [[CrossRef](#)]
49. Hahm, J.H.; Jeong, C.; Lee, W.; Koo, H.J.; Kim, S.; Hwang, D.; Nam, H.G. A cellular surveillance and defense system that delays aging phenotypes in *C. elegans*. *Aging* **2020**, *12*, 8202–8220. [[CrossRef](#)]
50. Strauss, K.A.; Jinks, R.N.; Puffenberger, E.G.; Venkatesh, S.; Singh, K.; Cheng, I.; Mikita, N.; Thilagavathi, J.; Lee, J.; Sarafianos, S.; et al. CODAS Syndrome Is Associated with Mutations of LONP1, Encoding Mitochondrial AAA+ Lon Protease. *Am. J. Hum. Genet.* **2015**, *96*, 121–135. [[CrossRef](#)]
51. Zanini, G.; Selleri, V.; Malerba, M.; Solodka, K.; Sinigaglia, G.; Nasi, M.; Mattioli, A.V.; Pinti, M. The Role of Lonp1 on Mitochondrial Functions during Cardiovascular and Muscular Diseases. *Antioxidants* **2023**, *12*, 598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhao, K.; Huang, X.; Zhao, W.; Lu, B.; Yang, Z. LONP1-mediated mitochondrial quality control safeguards metabolic shifts in heart development. *Development* **2022**, *149*, dev200458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. De Gaetano, A.; Gibellini, L.; Bianchini, E.; Borella, R.; De Biasi, S.; Nasi, M.; Boraldi, F.; Cossarizza, A.; Pinti, M. Impaired Mitochondrial Morphology and Functionality in Lonp1wt/– Mice. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pareek, G.; Thomas, R.E.; Vincow, E.S.; Morris, D.R.; Pallanck, L.J. Lon protease inactivation in *Drosophila* causes unfolded protein stress and inhibition of mitochondrial translation. *Cell Death Discov.* **2018**, *4*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Quirós, P.M.; Español, Y.; Acín-Pérez, R.; Rodríguez, F.; Bárcena, C.; Watanabe, K.; Calvo, E.; Loureiro, M.; Fernández-García, M.S.; Fueyo, A.; et al. ATP-Dependent Lon Protease Controls Tumor Bioenergetics by Reprogramming Mitochondrial Activity. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 542–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sun, C.-L.; Van Gilst, M.; Crowder, C.M. Hypoxia-induced mitochondrial stress granules. *Cell Death Dis.* **2023**, *14*, 448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Bounoutas, A.; Kratz, J.; Emtage, L.; Ma, C.; Nguyen, K.C.; Chalfie, M. Microtubule depolymerization in *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons reduces gene expression through a p38 MAPK pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3982–3987. [[CrossRef](#)]
58. van der Vaart, A.; Rademakers, S.; Jansen, G. DLK-1/p38 MAP Kinase Signaling Controls Cilium Length by Regulating RAB-5 Mediated Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005733. [[CrossRef](#)]
59. Butler, J.A.; Ventura, N.; Johnson, T.E.; Rea, S.L. Long-lived mitochondrial (Mit) mutants of *Caenorhabditis elegans* utilize a novel metabolism. *FASEB J.* **2010**, *24*, 4977–4988. [[CrossRef](#)]
60. Hahm, J.H.; Jeong, C.; Nam, H.G. Diet restriction-induced healthy aging is mediated through the immune signaling component ZIP-2 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12982. [[CrossRef](#)]
61. Hahm, J.H.; Nirmala, F.S.; Choi, P.G.; Seo, H.D.; Ha, T.Y.; Jung, C.H.; Ahn, J. The innate immune signaling component FBXC-58 mediates dietary restriction effects on healthy aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging* **2023**, *15*, 21–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Radetskaya, O.; Lane, R.K.; Friedman, T.; Garrett, A.; Nguyen, M.; Borrer, M.B.; Russell, J.; Rea, S.L. The PMK-3 (p38) Mitochondrial Retrograde Response Functions in Intestinal Cells to Extend Life via the ESCRT Machinery. *bioRxiv* **2019**, 797308. [[CrossRef](#)]
63. Dayalan Naidu, S.; Sutherland, C.; Zhang, Y.; Risco, A.; de la Vega, L.; Caunt, C.J.; Hastie, C.J.; Lamont, D.J.; Torrente, L.; Chowdhry, S.; et al. Heat Shock Factor 1 Is a Substrate for p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol. Cell. Biol.* **2016**, *36*, 2403–2417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kyriakou, E.; Taouktsi, E.; Syntichaki, P. The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gibellini, L.; Borella, R.; De Gaetano, A.; Zanini, G.; Tartaro, D.L.; Carnevale, G.; Beretti, F.; Losi, L.; De Biasi, S.; Nasi, M.; et al. Evidence for mitochondrial Lonp1 expression in the nucleus. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Melamed Kadosh, D.; Beenstock, J.; Engelberg, D.; Admon, A. Differential Modulation of the Phosphoproteome by the MAP Kinases Isoforms p38 α and p38 β . *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12442. [[CrossRef](#)]
67. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Review

The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*

Eleni Kyriakou¹, Eirini Taouktsi^{1,2} and Popi Syntichaki^{1,*}

¹ Laboratory of Molecular Genetics of Aging, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Center of Basic Research, 11527 Athens, Greece

² Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, 11855 Athens, Greece

* Correspondence: synticha@bioacademy.gr; Tel.: +30-2106597474

Abstract: Response to hyperthermia, highly conserved from bacteria to humans, involves transcriptional upregulation of genes involved in battling the cytotoxicity caused by misfolded and denatured proteins, with the aim of proteostasis restoration. *C. elegans* senses and responds to changes in growth temperature or noxious thermal stress by well-defined signaling pathways. Under adverse conditions, regulation of the heat shock response (HSR) in *C. elegans* is controlled by a single transcription factor, heat-shock factor 1 (HSF-1). HSR and HSF-1 in particular are proven to be central to survival under proteotoxic stress, with additional roles in normal physiological processes. For years, it was a common belief that upregulation of heat shock proteins (HSPs) by HSF-1 was the main and most important step toward thermotolerance. However, an ever-growing number of studies have shown that targets of HSF-1 involved in cytoskeletal and exoskeletal integrity preservation as well as other HSF-1 dependent and independent pathways are equally important. In this review, we follow the thermal stimulus from reception by the nematode nerve endings till the activation of cellular response programs. We analyze the different HSF-1 functions in HSR as well as all the recently discovered mechanisms that add to the knowledge of the heat stress coping network of *C. elegans*.

Keywords: heat shock proteins; thermotolerance; *C. elegans*; HSF-1; thermosensation; stress resistance



Citation: Kyriakou, E.; Taouktsi, E.; Syntichaki, P. The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14907. <https://doi.org/10.3390/ijms232314907>

Academic Editor: Diego Guidolin

Received: 22 September 2022

Accepted: 24 November 2022

Published: 28 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The roundworm *C. elegans* is a widely used experimental model, gifted with a rapid life cycle, small size, large brood size, self-fertilization mode of reproduction, convenient and cheap laboratory maintenance and storage, transparent body, invariant number of somatic cells, and many other characteristics [1] that are considered advantages for biological studies. Being an ectotherm, *C. elegans* cannot regulate body temperature, which instead depends on ambient temperature [2]. Therefore, the nematode is affected by temperature fluctuations and can detect temperature changes [3]. Thermosensation and thermal stress response in a multicellular organism, such as *C. elegans*, are simultaneously cell-autonomous and cell non-autonomous processes. Coordination of events occurring in differentiated cells and tissues after exposure to high temperatures, is vital for the re-establishment of balance following a stress condition [4,5]. Upon exposure to heat stress, proteins can misfold and form aggregates, which together with cellular mis-organization, organelle dysfunction and altered membrane fluidity occurring in these conditions, can potentially cause cell death. In the worm, a rise in temperature is detected with the aid of specific thermosensory neurons that convert warming into electrical signals transduced through a neuronal circuit to orchestrate a cellular response [4,6]. This review follows the route of these signals from the thermal stimulus up to the cellular changes that are elicited by the conserved heat shock response (HSR) mechanism in *C. elegans*. We summarize the neuronal thermal stress sensing and how the signal spreads through thermosensory neurons to the somatic cells of the worm. We also present all known data about the differential gene expression and the

molecular mechanisms that are set in motion to cope with thermal stress; all fine-tuned by heat shock factor 1 (HSF-1), a major transcription factor that is crucial for cell survival as it also contributes to more complex physiological processes [7]. HSF-1 is the single worm homolog of the four mammalian HSFs, which are the main regulators of specific defensive proteins, known as heat shock proteins (HSPs). HSPs are primarily induced in response to heat shock but can also be produced in response to a variety of environmental and cellular stresses, as well as diseases, such as neurodegenerative disorders and cancer [8]. HSPs are known to have cytoprotective effects, acting as molecular chaperones that help to refold or stabilize the unfolded proteins, to dissociate the toxic protein aggregates and to drive the misfolded proteins to degradation, thus contributing to organismal physiology and pathophysiology [9]. Therefore, there is a rising interest in deciphering the molecular mechanisms of HSF1 regulation, the interplay between the downstream signaling pathways and its broad role in proteostasis maintenance and thermotolerance.

2. The Thermosensory Circuit

The nematode *C. elegans* can usually be found in nature in decomposing plant material [10] and is able to survive and reproduce in gradient temperatures that range from 15 °C to 25 °C [11]. Interestingly, the nematode detects, adapts and behaves in response to changes of even 0.01 °C on a thermal gradient [6,12], through the action of well-defined thermosensory neurons (See Reviews on temperature sensing by Aoki et al. [13] and Glauser [14]).

2.1. Detection of Temperature Changes

Sensing of temperature changes triggers a robust behavioral response in *C. elegans*. Worms tend to move toward the direction of the minimum temperature deviation from the cultivation temperature (T_c), to avoid conditions in which they cannot reproduce [15,16]. This phenomenon is termed thermotaxis [15]. There are four distinct types of thermotaxis analyzed by Hedgecock and Russell [15], depending on the behavior of the nematode when placed on a thermal gradient. When worms move toward warmer or cooler temperatures, their behavior is called positive or negative thermotaxis, accordingly. Isothermal tracking is worm's movement perpendicular to the gradient, and if worms do not respond to thermal gradients their behavior is characterized as atactic [15]. In the literature, several different thermotaxis behavioral assays have been described. In most of these protocols, the movement of well-fed worms toward their past T_c , on thermal gradients within the physiological temperature range (15–25 °C) is recorded and analyzed [17]. *C. elegans* can also respond to noxious temperatures (above 26 °C to at least 36 °C), generated on thermal gradients or by thermal pulses, and display a stereotypical avoidance behavior [18,19].

Laser ablation, genetic, behavioral and electrophysiological approaches have established that the AFD (Amphid Finger-like Endings D), are the primary thermosensory neurons (See extended reviews by Goodman and Sengupta [20,21]). AFD is a pair of bipolar sensory neurons terminating in ciliated endings, extending to the worm's nose [22], and allow worms to detect tiny thermal fluctuations of <0.01 °C from 15–25 °C. Additional sensory neurons required for temperature sensing and thermotaxis are the AWC (Amphid Wing Neurons C) and ASI (Amphid Single Cilium I) neurons [16,23–25]. Molecular analysis of thermosensation revealed that the membrane potential of AFD neurons is depolarized, triggered by activation of thermoreceptor currents (ThRCs) through a cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-dependent signaling cascade [6] (Figure 1).

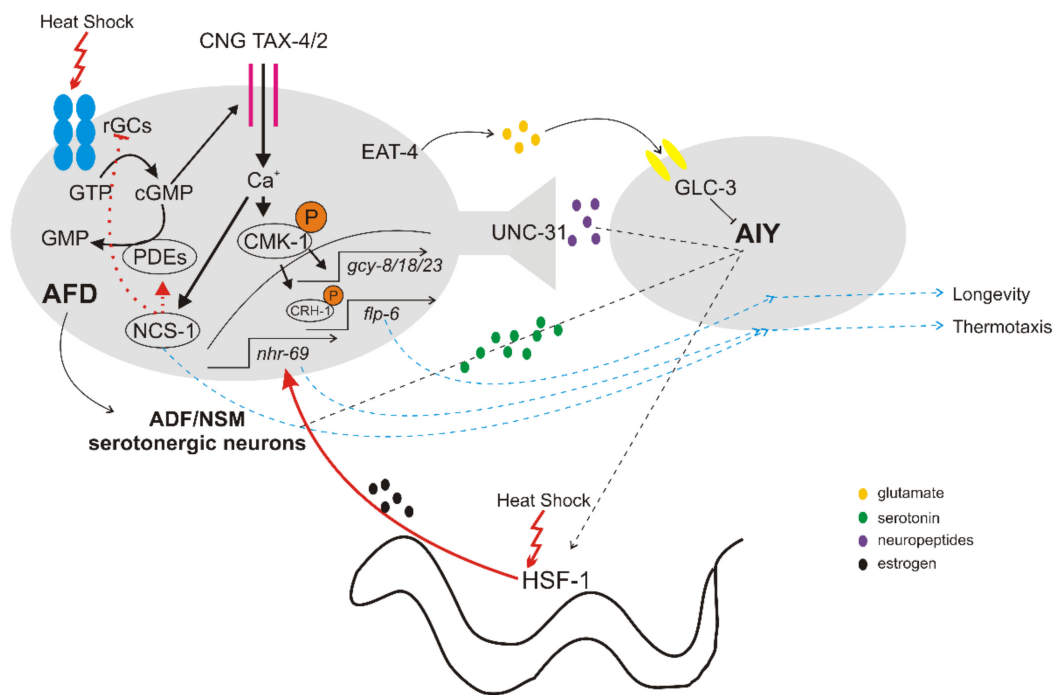


Figure 1. Schematic representation of AFD/AIY thermosensory circuit signaling. Temperature rising is received in AFD sensory neurons by rGCs that upregulate cGMP concentration. This leads to the opening of the CNG TAX-4/TAX-2 channels and the release of a calcium influx, resulting in depolarization of AFD membrane potential. The calcium influx maintains cGMP concentration levels through NCS-1 and further upregulates rGCs via CMK-1 phosphorylation. Phosphorylated CMK-1 enters the nucleus and among regulation of rGCs expression levels, also participates in CRH-1 phosphorylation and subsequent FLP-6 activation that is responsible for normal longevity under elevated temperatures. AFD activation leads to both excitatory and inhibitory signal transmission on AIY interneuron possibly by UNC-31-mediated peptides release and by glutamate release, accordingly. This activation can also release serotonin from serotonergic neurons and upregulate HSF-1 through AIY in the intestine. These signals are necessary for AIY to promote thermal behaviors (thermotaxis) and activate HSF-1-related organismal thermal responses in somatic tissues. In succession, HSF-1 can also signal to AFD in part through estrogen signaling to ensure normal thermotaxis.

In particular, three receptor-type transmembrane guanylyl cyclases (rGCs) are located at the sensing endings (the GCY-8, GCY-18 and GCY-23 that catalyze cGMP synthesis from GTP [26,27]) and are expressed exclusively in AFD [28,29]. In response to elevated temperatures, rGCs-evoked upregulation of intracellular cGMP levels opens the cyclic nucleotide-gated (CNG) TAX-4/TAX-2 channels [30,31] and permits calcium influx and depolarization [32]. Interestingly, exogenous expression of rGCs in other cells or tissues can also confer thermal responses [33]. The resulting calcium influx contributes to thermosensation in multiple ways. One of them is by regulating the neuronal calcium sensor 1 (NCS-1) expressed in AFD neurons, which probably has a dual function in calcium-dependent balancing of cGMP production [34]. NCS-1 is considered to inhibit GCY-8 and/or enhance cyclic nucleotide phosphodiesterase 2 (PDE-2), which hydrolyzes cGMP and contributes to ThRCs fast adaptation [20,34]. The fast phase of AFD adaptation has a timescale of few minutes, is transcription-independent and ensures high sensitivity of AFD neurons to tiny temperature changes. However, prolonged exposure to warmer temperatures evokes a second, slower (approximately 3–5 h) adaptation phase, which is also determined by calcium influx [35]. This involves the phosphorylation and nuclear localization of CMK-1, the *C. elegans* calcium/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI), which in turn upregulates the expression of rGCs, increases intracellular cGMP levels and confers long-term adaptation [35]. Additional identified targets of CMK-1 that are required for memoriz-

ing the Tc in AFD neurons include the Raf pathway [36], and the cyclic AMP-responsive element-binding protein CRH-1/CREB [37].

In response to noxious temperatures exceeding 26 °C, *C. elegans* shows an acute withdrawal reaction, which is under the control of several sensory neurons, including AFD, AWC and FLP (FLaP-like Dendritic Ending) in the head and PHC (Phasmid Neuron C) in the tail of animals [19]. This thermal avoidance behavior is mediated by a cGMP signaling pathway activating the downstream TAX-4/TAX-2 CGN channel within the AFD neurons, and a heat- and capsaicin-sensitive Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) pathway, specified by OSM-2 and OSM-9 channels, in FLP and PHC neurons [19,38]. FLP neurons are polymodal nociceptors that detect harsh mechanical as well as noxious heat stimuli (specifically, absolute high temperature rather than thermal changes) and trigger an escape/reversal response [39]. This reversal behavior engages several ion channels, involved in detection, amplification, maintenance and termination of the thermal signal in FLP neurons, and neurotransmission to downstream interneurons (see below). Similar to thermotaxis, previous thermal experience can modify noxious heat avoidance through a mechanism of phosphorylation and nuclear translocation of CMK-1, in FLP neurons [40]. Upon prolonged exposure to heat, progressive nuclear accumulation of CMK-1 reduces neurotransmission and FLP-evoked reversal responses, contributing to sensory adaptation [41].

2.2. Downstream Signaling of Thermosensory Neurons

Thermal information sensed and stored in AFD neurons is transmitted to the downstream AIY (Anterior Interneuron Y) interneurons to regulate thermotactic behaviors in the range between 15 °C and 25 °C in *C. elegans* [16,25]. The excitatory neurotransmission from AFD to AIY interneurons is likely mediated by peptides through the dense-core vesicles (DCVs) pathway [42]. The inhibitory neurotransmission of the AFD/AIY synapse is mediated by glutamate release from AFD through EAT-4 (the homologue of mammalian vesicular glutamate transporter, VGLUT), and subsequent reception of glutamate by AIY via the ionotropic glutamate receptor GLC-3 [43,44] (Figure 1).

In contrast to thermotaxis, where AIY are the major postsynaptic interneurons of AFD, noxious heat avoidance response triggered by infrared irradiation to nose tip of worms depends on AIB interneurons that are connected with AFD via gap junctions and with AWC and FLP neurons via chemical synapses [19]. FLP releases glutamate to AVA (Anterior Ventral Process A), AVD (Anterior Ventral Process D) and AVE (Anterior Ventral Process E) interneurons to promote backward locomotion [45]. In a thermal barrier assay, heat avoidance relies on the NPR-1/FLP-21 receptor in the interneuron RMG [38]. The noxious heat escape response of *C. elegans* proved to exhibit high plasticity, modulated by the thermal context as well as the past thermal experience, food and behavioral state of the animals [40,46]. Furthermore, the avoidance response seems to integrate information from several, parallel neural circuits, with partial functional redundancy, in order to allow a robust behavior strategy under dynamic environmental conditions [23]. Selective optogenetic activation of FLP neurons combined with a forward genetic screen identified both mutations in “general” genes that broadly affect avoidance response and mutations in “FLP pathway-specific” genes, such as the ryanodine receptor gene *unc-68* [45]. Additional mutations that impair reversal behavior in response to the optogenetic activation of FLP involve the genes encoding the neuropeptide receptor FRPR-19 and its ligand FLP-14 [47]. It was shown that FLP-14 is produced in the FLP postsynaptic partners, the AVA/AVD/AVE interneurons, and activates FRPR-19 found in both FLP neurons and its downstream interneurons in a positive feedback loop controlling reversal behavior [47].

The AFD neurons are able to integrate temperature information to a neuronal-endocrine circuit that controls lifespan at warm temperatures. Genetic or laser ablation of AFD or AIY interneurons shortens lifespan mostly at 25 °C [48]. The underlying molecular mechanism involves the activation of CRH-1/CREB by CMK-1/CaMKI in AFD neurons, which in turn upregulates the FMRFamide neuropeptide (FLP-6) that acts on AIY interneurons [49]

(Figure 1). FLP-6 targets the AIY interneurons and regulates both insulin pathway in intestinal cells and DAF-9/cytochrome P450-dependent sterol hormone signaling in XXX neurosecretory cells, in order to retain normal lifespan of worms at elevated temperatures [49] (for more details about the effects on lifespan see Kim et al. [3]). Conversely, temperature-induced hormonal signaling from peripheral tissues to AFD neurons can influence thermotactic behavior in worms. For example, *hsf-1* mutants display thermotaxis defects, and the expression of HSF-1 in muscles and intestine rescued these defects, through a nuclear hormone receptor NHR-69 estrogen-signaling pathway [50].

2.3. Cell Non-Autonomous Regulation of HSR

In response to acute heat stress, the HSR is activated in cell cultures, unicellular organisms [51,52] or in single cells within *C. elegans* irradiated by a laser microbeam [53], suggesting that it is a cell autonomous response. In a multicellular organism though, the proper regulation and coordination of HSR of individual cells, in diverse somatic tissues, is essential for organismal fitness and survival under thermal stress conditions. Exposure of worms to chronic, mild temperature stress (12–24 h at 28 °C) inhibits egg laying and triggers duration-specific remodeling of the transcriptome with little overlap with the canonical HSR [54]. HSR is induced by acute (even few minutes) exposure to higher temperatures (above 28 °C and up to 37 °C) in almost all cells and tissues of *C. elegans* to promote adaptation and survival. Several studies in *C. elegans* have shown that the nervous system regulates HSF-1 activity in HSR in a cell non-autonomous manner. First, mutations affecting the AFD/AIY neurons reduced heat-induced upregulation of HSP genes by HSF-1 in somatic cells [4]. Further studies established that the neuronal control of HSR is mediated by serotonergic signaling, as animals deficient in serotonin signaling exhibit lower expression levels of cytosolic *hsp-70* (a chaperone gene target of HSF-1) upon heat shock [55,56]. Intriguingly, optogenetic excitation of AFD neurons was sufficient to activate HSF-1 in distant tissues even in the absence of heat, through release of serotonin from serotonergic NSM (Neurosecretory Motor) and/or ADF (Amphid Dual Ciliated Ending F) neurons [56]. Likewise, optogenetic excitation of serotonergic NSM and ADF neurons could activate HSF-1 in remote tissues and protect cells from protein aggregation [56].

Protein misfolding and aggregation can be triggered by unfavorable conditions, such as high temperatures, but is also associated with the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), etc. [57,58]. A common way to track protein aggregations in nematodes is via expansions of polyglutamine (polyQ), typically associated with HD in humans. Worm models of HD expressing disease-related polyQ tract are susceptible to paralysis and pharmacological induction of HSR could suppress this phenomenon, while loss of HSF-1 activity exaggerates polyQ aggregation [59]. Surprisingly, disruption of the AFD neuronal signaling mitigates polyQ aggregation and toxicity in these worms [55]. This might be explained by the fact that animals deficient for AFD/AIY function were still able to induce the expression of HSP chaperones cell-autonomously, in tissues experiencing chronic stress due to accumulation of polyQ proteins. Thus, thermosensory neuronal signaling induces organismal HSR in response to acute heat stress, but suppresses cell-autonomous induction of chaperones under chronic stress caused by misfolded proteins, allowing fine tuning of chaperone levels within the tissues of an organism [55]. Interestingly, trans-cellular chaperone signaling between different tissues can communicate local perturbations of proteostasis independent of neural activity, to coordinate HSP90 expression in adjacent cells and tissues [60].

Cell non-autonomous regulation of HSR therefore involves inter-tissue communication, through inter-cellular or trans-cellular factors, and integrates diverse external and integral cues to produce adaptive behavioral responses. Overexpression of HSF-1 in the nervous system was sufficient not only to mount a robust systemic HSR upon heat stress [61], but also to prolong lifespan under normal conditions of growth [61], and to control fat

desaturation that supports adaptation of worms to warmer temperatures [62]. Similar to mammals, serotonin production is the signaling mechanism that modulates various stress-induced behaviors in *C. elegans*, even though chemosensory [63] or other neurons [64] seem to participate in activation of the HSR in distal tissues. One such behavior is the increased feeding of worms after a noxious heat stress, which requires the function of an E3 ubiquitin ligase in serotonergic neurons [65]. Additionally, serotonin release by maternal neurons, following an acute heat shock, activates HSF-1 in the germline and accelerates HSF-1-dependent transcription in germ cells through chromatin alterations. This mechanism protects the germline from stress and promotes the survival and stress resilience of the offspring [66,67]. HSF-1 activity is also coupled to the nutrient-sensing insulin/IGF-1 signaling to regulate normal development of the germline [68]. Although little is known about the regulation of germline HSF-1 by heat stress, it was shown that under heat stress, most germ cells did not induce the canonical HSR, and the activity of HSF-1 is rather repressed, by preferential binding of HSF-1 to helitrons (see Section 4), reducing reproduction [68].

3. Functional Domains of HSF-1

In *C. elegans*, the *hsf-1* gene is located in chromosome I and the resulting protein is composed of 671 amino acids (data from <https://www.wormbase.org>, accessed on 1 September 2022), which form a conserved N-terminal helix-turn-helix DNA-binding domain, an adjacent trimerization domain that consists of hydrophobic heptad repeats (HR-A/B), as well as a C-terminal transactivation domain following another heptad repeat (HR-C) (Figure 2). Spontaneous trimerization of HSF-1 is inhibited by HR-C that folds back and forms intramolecular contacts with HR-A/B [7,69,70]. In humans, a transactivation domain, which has been shown to enhance transcriptional activity, is kept inactive by a regulatory domain located between HR-A/B and HR-C domains [71,72]. The regulatory domain is subject to many post-translational modifications [73]. The exact position of the regulatory domain in *C. elegans* HSF-1 has not yet been identified but is presumably positioned also between the HR-A/B and HR-C domains (Figure 2). *hsf-1* is an essential gene for the nematode and therefore elimination of HSF-1 basic functional domains results in larval arrest, as is the case for the loss-of-function mutant allele *hsf-1(ok600)* in which a frameshift deletion results in the absence of the C-terminal HR-C and transactivation domains (380 amino acids eliminated in total) of HSF-1 (Figure 2) [74]. Although the functional domain structure of HSF-1 is highly conserved in eukaryotic species, there are species lacking the C-terminal transactivation domain that regulates the extent of HSF-1 activation and directs HSF-1 to specific target genes. In fact, the only viable *C. elegans hsf-1* mutant allele listed in Wormbase, *hsf-1(sy441)*, is the one missing only the transcriptional activation domain [70,75]. This truncation is caused by a substitution (missense mutation) that leads to a C-terminal elimination of 84 amino acids (Figure 2). The *C. elegans* strain (PS3551) carrying this allele was found to be short-lived, defective in chaperone induction and egg laying, and exhibits a temperature-sensitive larval arrest [7,70]. In view of the foregoing, it comes as no surprise that HSF-1 has functions independent of thermotolerance, including roles in growth, development, metabolism and longevity [74,76–78].

In unstressed conditions, mammalian HSF1 exists as a monomer, a state that is preserved through the above-mentioned intermolecular interactions, through post-translational modifications, and through interactions with chaperones [79,80]. Upon heat stress, chaperones are sequestered to be used in protein damage control, thus HSF1 is released, trimerized by coiled-coil interactions between the HR-A/B domains [69] and hyperphosphorylated. Phosphorylation occurs mostly in the regulatory domain, acting like a switch that lifts the restrain off the transactivation domain. In that active form HSF1 is able to bind with high affinity to specific short sequences, termed heat shock elements (HSEs), within promoters of certain target genes and induce their rapid and robust transcription [80]. *C. elegans* HSF-1 has been found in both dimeric and trimeric state upon heat shock [79]. The consensus HSE binding sequence can be generally described as inverted repeats of the pentamer nGAAn,

which is true also for the nematode [81,82]. Each HSF-1 moiety of the trimer recognizes one nGAAn repeat and therefore the promoter should host at least three such repeats for efficient HSF-1 trimer binding. The affinity of binding is determined by the number and exact sequence of nGAAn repeats [69] and is found in the majority of *hsp* genes, as well as in a plethora of other genes involved in a broad spectra of physiological cell activities [83]. The diverse HSF-1 functions can be elicited by differences in the composition of factors at HSF-1 binding sites, in the developmental stage of the nematode, in its post-translational modifications and by environmental stimuli [74,80].

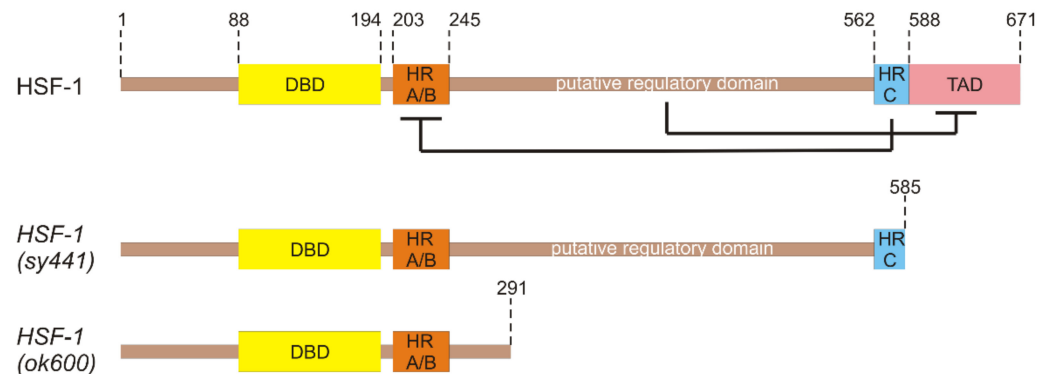


Figure 2. Domain structure of *C. elegans* HSF-1 full-length protein and the truncated alleles *sy441* and *ok600*. Numbers indicate amino acid positions. DBD is the DNA-binding domain, HR-A/B and HR-C are the trimerization domains and TAD is the transactivation domain. HSF-1 trimerization is negatively regulated by intramolecular interactions between the HR-A/B and the HR-C domains. The exact position of the regulatory domain in the *C. elegans* HSF-1 is not yet determined. However, it is most possibly located between the two trimerization domains and negatively regulates the trans-activating capacity of HSF-1. *sy441* allele is lacking the transactivation domain, while *ok600* allele is lacking both TAD and the putative regulatory domain.

Thermal stress has little effect on HSF-1 localization, as in unstressed conditions HSF-1 is already predominantly in the nucleus, yet it significantly affects HSF-1 distribution. Upon heat shock, HSF-1 is allocated to distinct sub-nuclear structures, termed HSF-1 stress granules [84]. These granules are similar to the nuclear stress bodies (nSBs) formed by mammalian HSF1 [85]. Worm HSF-1 stress granules are formed within a minute of heat shock and are dissolved after an hour of recovery. They can be reformed in similar locations if heat stress is reapplied, implying the existence of a scaffold for granule formation [84]. In humans, HSF1 granules are composed mainly of HSF1 bound to heterochromatic pericentromeric satellite repeats (non-coding RNA). Surprisingly, HSF1 bound to HSP promoters was not recovered from human HSF1 stress granules. Thus, their role in HSF1 regulation remains a mystery. *C. elegans* chromosomes do not possess centromeric regions or satellite repeats and at the same time the composition of worm HSF-1 stress granules is largely unknown [84]. A more recent study [86] found that double-stranded RNA (dsRNA) foci partially overlap with HSF-1 stress granules, during heat shock. The dsRNA recovered from these foci contained both sense and antisense transcripts enriched in translation related transcripts and sequences downstream of annotated genes (DoGs). DoG transcripts occur due to reduced efficiency of transcription termination during stress that causes the accumulation of normally untranscribed regions. The authors suggested that dsRNA sequences involved in translation that are over-represented in dsRNA foci, may have a functional role in stress response, i.e., silencing of the respective “translation-related transcripts” to attenuate global translation. Indeed, it has been shown that during heat shock, translation of mRNAs that are not involved in thermal stress response is stalled through pausing of translation elongation and inhibition of translation initiation [51,86–88].

4. HSF-1 Targets upon Heat Shock

In thermal stress conditions, homotrimerization and binding to HSEs of worm HSF-1 leads to the expression of genes encoding molecular chaperones and other stress responsive genes [7]. At the same time, de novo synthesis of the majority of cell proteins regulating under unstressed conditions is suppressed [51,88]. Interestingly, a recent study showed that the majority of HSEs found in the *C. elegans* genome, reside in transposable elements termed helitrons. The authors showed that helitrons, which comprise ~2% of the *C. elegans* genome, have rendered proximal genes “HSF-1 boundable” or have increased the binding affinity of other genes by supplying more HSEs in the promoter regions [82].

4.1. Heat Shock Proteins, the Main Executive Body of HSR

HSPs are molecular chaperones that are upregulated in response to heat shock and attempt to maintain homeostasis in stressed cells by preventing protein aggregation, but they can also function in protein synthesis, processing and degradation [7,80]. HSPs can be divided into two main categories based on their molecular mass: the large ATP-dependent HSPs of 40 to 105 kDa and the small ATP-independent HSPs of 8 to 25 kDa [89,90]. The top 10 genes upregulated by HSF-1 in response to heat shock comprise members of the *hsp-70* family and the small HSPs: *hsp-16.2*, *hsp-16.41*, *hsp-16.11*, *hsp-16.1*, *hsp-16.48* and *hsp-16.49* [7]. The most commonly used gene for reporting HSR is *hsp-70*, although *hsp-16.2* has also been frequently used [78]. The first study of HSR in *C. elegans* [91] identified eight “heat-shock polypeptides”, from which only the 70-kDa polypeptide was ubiquitously expressed. In *Drosophila*, where HSR was first observed, a homologous polypeptide of 70-kDa was also the most prevalent HSP. Despite the early perception that chaperones are the key players of the HSR, more recent studies argue that HSF-1-mediated thermotolerance is not dependent upon the induction of HSPs. This hypothesis was supported by the fact that the hypomorphic mutation *hsf-1(sy441)* did not decrease thermotolerance of the wild-type strain, although it has greatly reduced HSPs mRNA levels [8,92]. However, this HSF-1 mutant strain has given controversial results demonstrating a decrease in heat shock resistance in other studies [4]. The initial thought is that these contradictory results originate from different experimental setups, but it becomes apparent that there is a more complex mechanism underlying HSF-1 function upon heat shock than simply the chaperone activation and course of action [93]. With age, worms lose their ability to produce HSPs, which is probably the reason for the decrease in the effectiveness of HSR in aged nematodes [79,94].

4.2. Exoskeleton and Cytoskeleton Integrity Genes

A broad RNA-seq study performed by Brunquell et al. [7] sought the top upregulated and downregulated genes by the *C. elegans* HSF-1. As expected, 9 of the top 15 genes most highly upregulated were HSP genes. Interestingly, this study revealed that among the 654 genes that were significantly upregulated by HSF-1 during heat shock, the functional category of genes with the higher enrichment score were not the *hsp* genes but genes involved in the formation of cuticle structure. In fact, the gene for COL-149, a structural constituent of the cuticle was among the top 15 genes upregulated by HSF-1 in response to heat shock. RNA interference (RNAi) of the expression of another cuticle formation gene, *col-123* was found to decrease *hsp-70* promoter activity, induced by heat shock.

This result was in agreement with a previous study that also highlighted genes involved in the structure and function of the nematode extracellular matrix as main targets of HSF-1 [75]. The calcium-binding protein gene *pat-10* was identified as a direct target of HSF-1 and an essential for thermotolerance gene. In fact, a HSE was found less than 500 bp from the transcription initiation site of *pat-10*. Surprisingly, *pat-10*-dependent resistance to heat stress was not due to upregulation of HSPs. *pat-10* gene is known to be coding a component of the troponin complex that participates in muscle contraction. However, the authors showed that this function of PAT-10 was not responsible for thermotolerance. Furthermore, PAT-10 had been previously shown to be involved in actin cytoskeleton dy-

namics and endocytosis. Baird et al. [75] showed that heat shock caused muscle filaments to become unorganized and damaged. Thermal stress also resulted in the severe decrease of the ratio of the filamentous actin to globular actin. These consequences were reversed by *pat-10* overexpression. Authors also showed that silencing of *pat-10* by RNAi disrupted endocytosis. The fact that endocytosis is important for thermal stress response was also proven by silencing of the key regulator of coelomocytic endocytosis, *cup-4*, which reduced worm thermotolerance [75]. Remarkably, collagen genes are a major group of genes the expression of which is controlled by HSEs residing in helitrons [82]. *C. elegans* is not the first organism in which cytoskeletal and extracellular matrix genes and in particular collagen genes are upregulated in response to heat stress. Similar observations have been made for fish [95] and even human fibroblasts [96]. In chicken embryos, mice and rats, a heat-shock induced HSP, Hsp47 has been found to specifically bind procollagens in the endoplasmic reticulum and participate in collagen biogenesis [97]. Hsp47 expression is mediated by HSF1 binding of the HSE in the promoter region of the *Hsp47* gene [97].

5. The Post-Translational Fate of HSF-1

The phosphorylation status of mammalian HSF1 as well as other basal or stress-induced post-translational modifications (acetylation, sumoylation, ubiquitinylation, etc.) are associated with the diversification of its functions [73,98–100]. Some of these modifications have also been described for *C. elegans* HSF-1 [79,84,101].

5.1. Phosphorylation

As a monomer, mammalian HSF1 is constitutively phosphorylated and therefore cannot bind HSEs. In this case, phosphorylation is implemented in order to repress HSF-1 activity [69,102]. In the trimeric state, hyperphosphorylation of serine residues (at least 12) that are mostly located in the regulatory domain, seems to activate the HSF1 complex [73,103]. It has been shown that the number and the location of phosphorylated residues defines the activation state of HSF1. For example, in humans, phosphorylation of S230 and S326 were found to increase the transcriptional capacity of HSF1, while phosphorylation of S303 and S307 were shown to repress HSF1 activation (reviewed by Anckar and Sistonen [73] and Vihervaara and Sistonen [69]). For the worm HSF-1, it has been suggested that phosphorylation may be the most prevalent post-translational modification observed [79].

Under conditions of mild mitochondrial stress HSF-1 is dephosphorylated through the PP2A serine-threonine protein phosphatase complex. In *C. elegans*, PP2A consists of the catalytic subunit LET-92, a single scaffold subunit PPP2R1A/PAA-1 and one of several regulatory subunits that ensure substrate specificity. In this dephosphorylated state, HSF-1 was shown to induce the transcription of small HSPs in a mitochondrial stress-specific manner to protect against protein misfolding, aggregation and toxicity. LET-92 was shown to be the basic component for HSF-1 dephosphorylation but was not required for thermotolerance since hypo-phosphorylated HSF-1 selectively binds HSEs in the promoters of genes needed for mitochondrial perturbation response. This specific combination of genes does not qualify for thermal stress response [104].

5.2. Sumoylation

Some post-translational modifications may constitute a requirement for other post-translational modifications to be made. For example, in human HSF1, phosphorylation of S303, mentioned above, serves as a signal for sumoylation at K298. In fact, HSF1 was the first transcription factor in which a phosphorylation-dependent sumoylation motif (PDSM) was discovered. This motif consists of a sumoylation consensus sequence and a phosphorylation consensus sequence joined together. SUMO proteins are known transcriptional suppressors and therefore sumoylated K298 inhibits HSF1 transcriptional activity (reviewed by Anckar and Sistonen [73] and Vihervaara and Sistonen [69]). In *C.*

C. elegans, HSF-1 was also found to be target of sumoylation as it was identified among the 248 proteins conjugated to SUMO [105].

5.3. Acetylation

Some HSF1 is also subjected to stress-responsive acetylation of lysines primarily in the DNA-binding domain or domains involved in trimerization and localization. Consequently, acetylation results in the attenuation of the respective HSF1 abilities and therefore in the inhibition of the HSR [106]. Interestingly, members of the sirtuin family of nutrient sensor proteins enhance HSR through deacetylation of the DNA-binding domain of HSF1. This alters the duration of DNA binding thus increasing the transcription of target genes [101]. CCAR-1 was found to be the worm homologue of human CCAR2, which is a negative regulator of the sirtuin member SIRT1 that is a well-established deacetylase of HSF1 in mammals. In *C. elegans*, CCAR-1 was also proven to negatively regulate HSR by decreasing HSF-1 acetylation, mediated by deacetylase activity of the worm homologue of human SIRT1, SIR-2.1, and by increasing HSF-1 binding to *hsp-70* promoter [101].

6. Other Factors and Pathways That Aid Coping with Thermal Stress

6.1. The Insulin/IGF-1-Like Signaling (IIS)

The insulin/insulin-like growth factor signaling pathway is a highly conserved mechanism involved in development, metabolism, behavior and longevity. In *C. elegans*, insulin-like ligands are bound by the insulin receptor, DAF-2, initiating a downstream signal transduction to kinases AKT-1/-2 through phosphatidylinositol 3-kinase AGE-1. Phosphorylation of DAF-16 prevents it from entering the nucleus. In the absence of insulin-like ligands, DAF-16 translocates to the nucleus to promote longevity gene expression [107,108]. The IIS pathway also contributes to survival after a variety of stress stimuli, including thermal stress. Attenuation of IIS can be obtained by mutations in the core components of the pathway, such as the *daf-2*, which confer both longevity and resistance to heat stress [79,92]. In response to heat stress, the c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK)-1 directly interacts and phosphorylates DAF-16, promoting its nuclear translocation [109]. Increased thermotolerance of *daf-2* mutants is therefore DAF-16 dependent but HSF-1 independent. Thus, the elevated stress-induced levels of HSPs upon lowered IIS, are probably DAF-16 driven [92]. Consistent with this, upon heat shock, DAF-16 was shown to enter the nucleus in wild-type worms [110].

6.2. HIF-1

The master regulator of oxygen homeostasis, hypoxia-inducible factor 1 (HIF1), is a DNA-binding complex consisting of two subunits: HIF1 α and HIF1 β . HIF1 α is apparently the subunit responsible for coping with hypoxia and it has a homologue in *C. elegans* genome, named HIF-1. Upon normoxia, *C. elegans* oxygenase EGL-9 hydroxylates HIF-1, priming it for binding of E3 ubiquitin-ligase complex component VHL-1 that targets HIF-1 for proteasomal degradation [111]. Therefore, oxygen deprivation, *vhl-1*- or *egl-9*-knockdown are all conditions under which HIF-1 is expressed at constitutively high levels. A handful of studies have revealed a connection between HIF-1 and heat response in *C. elegans*. For example, Trenin et al. [112] showed that HIF-1 upregulation is required for heat acclimation in the nematode, as had been previously proven for mammals. In addition, Carranza et al. [113] showed that the thermotolerance conferred by chlorogenic acid, was HIF-1-dependent. They also found that upregulation of HIF-1, either by heat acclimation or by hypoxia-mimicking conditions, increased worm thermotolerance. The authors attributed worm resistance to thermal stress, at least in this case, to the induction of autophagy, mediated by HIF-1 and HSF-1. Autophagy presumably enhances the ability of worms to handle damage produced by thermal stress.

6.3. Autophagy

Autophagy (macroautophagy) is an efficient mechanism for the degradation of proteins and cytosolic components in general, thus contributing to cellular homeostasis. Autophagy is initiated in response to various stresses, such as nutrient deprivation, hypoxia, pathogens etc., by the formation of autophagosomes that encapsulate damaged cytoplasmic material. Autophagosomes are then fused with lysosomes and their content is degraded by hydrolases and recycled [114,115]. Recently, thermal stress was added to the list of autophagy triggers. Specifically, it was shown that hormetic heat shock systemically induces autophagy in *C. elegans*, in an HSF-1-dependent manner [114,115]. Hormetic heat stress is defined as a short-term exposure of worms to temperatures that would long-term be lethal, and which brings about induced thermotolerance, i.e., survival under lethal heat shock [116]. HSF-1 seems to play an important role in autophagy induction during thermal stress. In fact, the promoters of many autophagy-related genes contain putative HSEs; but it remains to be clarified whether HSF-1 directly impacts their expression or there is an intervening mechanism. Autophagy genes are required for the increased thermotolerance of worms after hormetic heat shock [117]. Moreover, overexpression of HSF-1 increased the formation of autophagosomes in muscle, neurons and intestines of the nematode [8]. Knockdown of mitophagy (a specific cellular process for elimination of dysfunctional mitochondria by autophagosome engulfment for subsequent lysosomal degradation) genes also reduced heat stress resistance in worms, due to increased protein aggregate formation caused by autophagy downregulation [118]. Autophagy seems to be a more competent method of damage control than HSR in the case of larger protein aggregates and dysfunctional organelles resulting after heat shock [8].

6.4. Non-Coding RNAs

MicroRNAs (miRNAs), first discovered in *C. elegans* [119–121], are small, non-coding RNAs that control gene expression and a wide variety of physiological processes through post-transcriptional silencing. Therefore, it is of no surprise that a process with high complexity such as the HSR would implicate post-transcriptional regulation through miRNAs. Specifically, the *mir-71*, *mir-239*, *mir-80*, *mir-229* and *mir-64-66* cluster, which control survival during heat stress, were identified by high-throughput small RNA sequencing and their function was tested by appropriate deletion strains. For example, *mir-71* and *mir-239* were shown to be required for generating embryos at high temperatures [119]. However, more research is needed on whether these miRNAs are direct targets of HSF-1 and on what are their direct mRNA targets. It is also unclear if the changes in miRNA expression upon heat shock are an intentional result of the thermal stress response or the byproduct of defective transcriptional/post-transcriptional silencing mechanisms upon elevated temperatures. In a more recent study [122], 6 miRNAs were identified to be upregulated by HSF-1 during heat shock: miR-784, miR-231, miR-86, miR-53, miR-47 and miR-34. While 5 of these miRNAs are of unknown function, miR-34 is a highly conserved miRNA that is implicated in ageing-associated processes. Interestingly, miRNAs are not the only type of non-coding RNAs (ncRNAs) involved in heat coping mechanisms. A study by Schreiner et al. [123] uncovered Piwi RNAs, long intergenic ncRNAs, pseudogene- and repeat-derived RNAs and unclassified ncRNAs expressed in *C. elegans* additionally to miRNAs, under heat stress conditions. The authors established a direct link between the expression of ncRNAs, such as miR-239, Helitron1_CE transposons and the pseudogene *dct-10*, and HSF-1. HSEs in the promoters of these ncRNAs are bound by HSF-1 in response to heat shock.

Much ink has been spilled about the transcriptional activation of HSR and the processes involved in safeguarding the proteome. However, less is known about the restoration of HSP gene expression to basal levels after the return to normal conditions. A recent study [124] demonstrated the involvement of the miRNA pathway in *hsp-70* downregulation following heat shock. Upon heat shock, *hsp-70* mRNA is up-regulated over 100-fold and then once normal temperature is restored, these levels drop to baseline within 24 h. In *C. elegans* this rapid restoration of *hsp-70* expression levels was found to depend on the

miRNA miR-85 and the Argonaut (AGO) protein ALG-1. According to the authors, the 3'UTR of *hsp-70* harbors two miR-85 binding sites. In unstressed conditions, miR-85 guides ALG-1 to target *hsp-70* mRNA for destabilization through imperfect base pairing. This way *hsp-70* expression levels are diminished to basal. This gene expression reset upon recovery proved to be essential for the survival of heat stressed worms. Apparently, maintenance of extremely high levels of HSPs for a prolonged period of time turns out to be toxic for the organisms.

6.5. m⁵C Methylation

Methylation of carbon-5 of cytosines in tRNA, rRNA, mRNA and ncRNA molecules is an evolutionary conserved mechanism performed by m⁵C RNA-methyltransferases, with yet largely unknown functions. Some possible functions are protection from degradation and modulation of translational fidelity [125]. It is also evident that although these chemical marks are often not essential under normal conditions and organisms present subtle phenotypes in their absence, they are involved in responses to environmental challenges. In fact, with the use of a *C. elegans* strain devoid of m⁵C in RNA, a role for m⁵C methylation in thermotolerance was uncovered as mutant worms were temperature-sensitive [126]. m⁵C methylation effect on the nature of HSR was shown to be subtle, with gene expression differences found mainly in genes involved in cuticle and ribosome formation. A more detailed codon-occupancy investigation showed that m⁵C methylation enhanced translation of leucine UUG codon upon heat shock. Interestingly, tRNA Leu-CAA is the only cytoplasmic tRNA with an m⁵C-modified wobble position. Therefore, m⁵C tRNA wobble methylation is probably involved in thermotolerance [126].

6.6. Mitochondrial Perturbation

Ageing in *C. elegans* is accompanied by proteostasis malfunction, which occurs partly due to attenuation of the HSR [89]. Labbadia et al. [127] identified mitochondrial electron transport chain (ETC) as an important factor in HSR repression that comes with age. These authors also found that mild ETC perturbation either by genetic knockdown or with the use of xenobiotics, sustained HSR levels in ageing worms. However, not all mitochondrial stresses are able to confer HSR maintenance with age. It was shown that knockdown of subunits of mitochondrial respiratory chain complexes I, III, IV and VI and of mitochondrial protein transport gene *tomm-22* and mitochondrial ribosomal protein gene *mrps-5* significantly increased heat shock resistance, while knockdown of other genes encoding proteins of mitochondrial function, *dnj-21*, *tin-44*, *mrpl-1*, *mrpl-2*, and *spg-7*, had little or no effect on stress resistance. This mild mitochondrial perturbation was found to promote thermotolerance in an HSF-1 dependent way [127].

Mitochondrial perturbation, accompanied by heat stress resistance was also observed in *lonp-1* deficient *C. elegans* mutants [128]. LONP-1 is the worm homolog of human LonP1, a highly conserved mitochondrial protease that functions as a peptidase, a chaperone and a DNA-binding protein, thereby fulfilling its role as a central regulator of mitochondrial activity [129]. Although LonP1 protease is considered as a stress-responsive gene, it is not temperature-inducible [130]. In our recent study, we created a *lonp-1* knockout *C. elegans* strain and showed that despite the disturbed mitochondrial function and impaired growth, fertility and lifespan in the mutant animals, there was a robust induction of both mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) and cytosolic HSR. Therefore, the *lonp-1* mutant strain was significantly more thermotolerant compared to wild-type, even with the use of slightly aged (day 3 of adulthood) individuals [128]. However, the responsible factors and mechanisms, or the interplay between them, remains unclear.

7. Concluding Remarks

Undoubtedly, the struggle to remain alive and unharmed upon elevated temperatures is a highly complicated process, even in simple invertebrate organisms, such as the nematode. HSF1 is admittedly the most important transcription factor driving the HSR in a

plethora of species ranging from yeast to mammals. However, HSR, which is considered as the function of HSPs in response to thermal stress, is not the only necessary event for maintaining homeostasis under the circumstances, as was previously believed. Preservation of exoskeletal and cytoskeletal integrity, also HSF1 driven, is gaining popularity as an equally important process. Moreover, other physiological processes that participate in thermotolerance are being uncovered over time, sometimes dependent and sometimes independent of HSF1. In addition, the variety of components involved that range from transcription factors, chaperones, enzymes, mRNAs, miRNAs, dsRNAs, tRNAs, transposons, ribosomes, autophagosomes to methyl-, acetyl- and phospho- groups and SUMO-proteins, unveils the complexity of this fine-tuned survival program. The precise interconnections and interplay of all of these components are not yet well-established and therefore future studies should be oriented toward this end. Although arguably, this is the most difficult task, it has become increasingly evident in the recent literature that in a multicellular organism each process is connected to numerous other processes and each molecular or cellular component is simultaneously or successively involved in numerous processes and is able to compensate for others when a mishap occurs. Thus, all findings should be skeptically examined under this prism. Modern high throughput techniques as well as the use of appropriate, suitable and convenient animal models, such as the *C. elegans*, will certainly help with deciphering the complicated processes of organismal stress responses.

Author Contributions: Conceptualization, E.K. and P.S.; writing—original draft preparation, E.K. and E.T.; writing—review and editing, E.K., E.T. and P.S.; visualization, E.K. and E.T.; supervision, P.S.; funding acquisition, P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (H.F.R.I.) under the “First Call for H.F.R.I. Research Projects to support Faculty members and Researchers and the procurement of high-cost research equipment grant” (Project Number: 1611).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Corsi, A.K.; Wightman, B.; Chalfie, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2015**, *200*, 387–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jeong, D.E.; Artan, M.; Seo, K.; Lee, S.J. Regulation of lifespan by chemosensory and thermosensory systems: Findings in invertebrates and their implications in mammalian aging. *Front. Genet.* **2012**, *3*, 218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kim, B.; Lee, J.; Kim, Y.; Lee, S.V. Regulatory systems that mediate the effects of temperature on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurogenet.* **2020**, *34*, 518–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Prahlad, V.; Cornelius, T.; Morimoto, R.I. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons. *Science* **2008**, *320*, 811–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vakkayil, K.L.; Hoppe, T. Temperature-Dependent Regulation of Proteostasis and Longevity. *Front. Aging* **2022**, *3*, 853588. [[CrossRef](#)]
6. Ramot, D.; MacInnis, B.L.; Goodman, M.B. Bidirectional temperature-sensing by a single thermosensory neuron in *C. elegans*. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 908–915. [[CrossRef](#)]
7. Brunquell, J.; Morris, S.; Lu, Y.; Cheng, F.; Westerheide, S.D. The genome-wide role of HSF-1 in the regulation of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 559. [[CrossRef](#)]
8. Higuchi-Sanabria, R.; Frankino, P.A.; Paul, J.W., 3rd; Tronnes, S.U.; Dillin, A. A Futile Battle? Protein Quality Control and the Stress of Aging. *Dev. Cell* **2018**, *44*, 139–163.
9. Occhigrossi, L.; D’Eletto, M.; Barlev, N.; Rossin, F. The Multifaceted Role of HSF1 in Pathophysiology: Focus on Its Interplay with TG2. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6366. [[CrossRef](#)]
10. Félix, M.A.; Duveau, F. Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 59. [[CrossRef](#)]
11. Harvey, S.C.; Viney, M.E. Thermal variation reveals natural variation between isolates of *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **2007**, *308*, 409–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Luo, L.; Clark, D.A.; Biron, D.; Mahadevan, L.; Samuel, A.D. Sensorimotor control during isothermal tracking in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Biol.* **2006**, *209 Pt 23*, 4652–4662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Aoki, I.; Mori, I. Molecular biology of thermosensory transduction in *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2015**, *34*, 117–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Glauser, D.A. Temperature sensing and context-dependent thermal behavior in nematodes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2022**, *73*, 102525. [[CrossRef](#)]
15. Hedgecock, E.M.; Russell, R.L. Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4061–4065. [[CrossRef](#)]
16. Mori, I.; Ohshima, Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1995**, *376*, 344–348. [[CrossRef](#)]
17. Goodman, M.B. Thermotaxis navigation behavior. In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*; Wormbook: Pasadena, CA, USA, 2014; pp. 1–10.
18. Ghosh, R.; Mohammadi, A.; Kruglyak, L.; Ryu, W.S. Multiparameter behavioral profiling reveals distinct thermal response regimes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol.* **2012**, *10*, 85. [[CrossRef](#)]
19. Liu, S.; Schulze, E.; Baumeister, R. Temperature- and touch-sensitive neurons couple CNG and TRPV channel activities to control heat avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32360. [[CrossRef](#)]
20. Goodman, M.B.; Sengupta, P. The extraordinary AFD thermosensor of *C. elegans*. *Pflug. Arch.* **2018**, *470*, 839–849. [[CrossRef](#)]
21. Goodman, M.B.; Sengupta, P. How *Caenorhabditis elegans* Senses Mechanical Stress, Temperature, and Other Physical Stimuli. *Genetics* **2019**, *212*, 25–51. [[CrossRef](#)]
22. Ward, S.; Thomson, N.; White, J.G.; Brenner, S. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* **1975**, *160*, 313–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Beverly, M.; Anbil, S.; Sengupta, P. Degeneracy and neuromodulation among thermosensory neurons contribute to robust thermosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 11718–11727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Biron, D.; Wasserman, S.; Thomas, J.H.; Samuel, A.D.; Sengupta, P. An olfactory neuron responds stochastically to temperature and modulates *Caenorhabditis elegans* thermotactic behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11002–11007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kuhara, A.; Okumura, M.; Kimata, T.; Tanizawa, Y.; Takano, R.; Kimura, K.D.; Inada, H.; Matsumoto, K.; Mori, I. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science* **2008**, *320*, 803–807. [[CrossRef](#)]
26. Yu, S.; Avery, L.; Baude, E.; Garbers, D.L. Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: A new family of chemosensory receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3384–3387. [[CrossRef](#)]
27. Ortiz, C.O.; Etchberger, J.F.; Posy, S.L.; Frøkjær-Jensen, C.; Lockery, S.; Honig, B.; Hobert, O. Searching for neuronal left/right asymmetry: Genomewide analysis of nematode receptor-type guanylyl cyclases. *Genetics* **2006**, *173*, 131–149. [[CrossRef](#)]
28. Inada, H.; Ito, H.; Satterlee, J.; Sengupta, P.; Matsumoto, K.; Mori, I. Identification of guanylyl cyclases that function in thermosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2006**, *172*, 2239–2252. [[CrossRef](#)]
29. Wasserman, S.M.; Beverly, M.; Bell, H.W.; Sengupta, P. Regulation of response properties and operating range of the AFD thermosensory neurons by cGMP signaling. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 353–362. [[CrossRef](#)]
30. Komatsu, H.; Mori, I.; Rhee, J.S.; Akaike, N.; Ohshima, Y. Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **1996**, *17*, 707–718. [[CrossRef](#)]
31. Coburn, C.M.; Bargmann, C.I. A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* **1996**, *17*, 695–706. [[CrossRef](#)]
32. Clark, D.A.; Biron, D.; Sengupta, P.; Samuel, A.D. The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 7444–7451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Takeishi, A.; Yu, Y.V.; Hapiak, V.M.; Bell, H.W.; O’Leary, T.; Sengupta, P. Receptor-type Guanylyl Cyclases Confer Thermosensory Responses in *C. elegans*. *Neuron* **2016**, *90*, 235–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, D.; O’Halloran, D.; Goodman, M.B. GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for *C. elegans* thermotaxis. *J. Gen. Physiol.* **2013**, *142*, 437–449. [[CrossRef](#)]
35. Yu, Y.V.; Bell, H.W.; Glauser, D.; Van Hooser, S.D.; Goodman, M.B.; Sengupta, P. CaMKI-dependent regulation of sensory gene expression mediates experience-dependent plasticity in the operating range of a thermosensory neuron. *Neuron* **2014**, *84*, 919–926. [[CrossRef](#)]
36. Kobayashi, K.; Nakano, S.; Amano, M.; Tsuboi, D.; Nishioka, T.; Ikeda, S.; Yokoyama, G.; Kaibuchi, K.; Mori, I. Single-Cell Memory Regulates a Neural Circuit for Sensory Behavior. *Cell Rep.* **2016**, *14*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nishida, Y.; Sugi, T.; Nonomura, M.; Mori, I. Identification of the AFD neuron as the site of action of the CREB protein in *Caenorhabditis elegans* thermotaxis. *EMBO Rep.* **2011**, *12*, 855–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Glauser, D.A.; Chen, W.C.; Agin, R.; Macinnis, B.L.; Hellman, A.B.; Garrity, P.A.; Tan, M.W.; Goodman, M.B. Heat avoidance is regulated by transient receptor potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2011**, *188*, 91–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Saro, G.; Lia, A.S.; Thapliyal, S.; Marques, F.; Busch, K.E.; Glauser, D.A. Specific Ion Channels Control Sensory Gain, Sensitivity, and Kinetics in a Tonic Thermoreceptor. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 397–408.e4. [[CrossRef](#)]
40. Schild, L.C.; Glauser, D.A. Dual Color Neural Activation and Behavior Control with Chrimson and CoChR in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2015**, *200*, 1029–1034. [[CrossRef](#)]
41. Ippolito, D.; Thapliyal, S.; Glauser, D.A. Ca(2+)/CaM binding to CaMKI promotes IMA-3 importin binding and nuclear translocation in sensory neurons to control behavioral adaptation. *Elife* **2021**, *10*, e71443. [[CrossRef](#)]

42. Narayan, A.; Laurent, G.; Sternberg, P.W. Transfer characteristics of a thermosensory synapse in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 9667–9672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ohnishi, N.; Kuhara, A.; Nakamura, F.; Okochi, Y.; Mori, I. Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **2011**, *30*, 1376–1388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Horoszok, L.; Raymond, V.; Sattelle, D.B.; Wolstenholme, A.J. GLC-3: A novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 1247–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Marques, F.; Saro, G.; Lia, A.S.; Poole, R.J.; Falquet, L.; Glauser, D.A. Identification of avoidance genes through neural pathway-specific forward optogenetics. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1008509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Byrne Rodgers, J.; Ryu, W.S. Targeted thermal stimulation and high-content phenotyping reveal that the *C. elegans* escape response integrates current behavioral state and past experience. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229399. [[CrossRef](#)]
47. Marques, F.; Falquet, L.; Vandewyter, E.; Beets, I.; Glauser, D.A. Signaling via the FLP-14/FRPR-19 neuropeptide pathway sustains nociceptive response to repeated noxious stimuli in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009880. [[CrossRef](#)]
48. Lee, S.J.; Kenyon, C. Regulation of the longevity response to temperature by thermosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 715–722. [[CrossRef](#)]
49. Chen, Y.C.; Chen, H.J.; Tseng, W.C.; Hsu, J.M.; Huang, T.T.; Chen, C.H.; Pan, C.L. A *C. elegans* Thermosensory Circuit Regulates Longevity through crh-1/CREB-Dependent flp-6 Neuropeptide Signaling. *Dev. Cell* **2016**, *39*, 209–223. [[CrossRef](#)]
50. Sugi, T.; Nishida, Y.; Mori, I. Regulation of behavioral plasticity by systemic temperature signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 984–992. [[CrossRef](#)]
51. Lindquist, S.; Craig, E.A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1988**, *22*, 631–677. [[CrossRef](#)]
52. Morimoto, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3788–3796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Stringham, E.G.; Candido, E.P. Targeted single-cell induction of gene products in *Caenorhabditis elegans*: A new tool for developmental studies. *J. Exp. Zool.* **1993**, *266*, 227–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Plagens, R.N.; Mossiah, I.; Kim Guisbert, K.S.; Guisbert, E. Chronic temperature stress inhibits reproduction and disrupts endocytosis via chaperone titration in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol.* **2021**, *19*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Prahlad, V.; Morimoto, R.I. Neuronal circuitry regulates the response of *Caenorhabditis elegans* to misfolded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14204–14209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tatum, M.C.; Ooi, F.K.; Chikka, M.R.; Chauve, L.; Martinez-Velazquez, L.A.; Steinbusch, H.W.M.; Morimoto, R.I.; Prahlad, V. Neuronal serotonin release triggers the heat shock response in *C. elegans* in the absence of temperature increase. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 163–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ross, C.A.; Poirier, M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2004**, *10* (Suppl. S10–17). [[CrossRef](#)]
58. Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 49–60. [[CrossRef](#)]
59. Teixeira-Castro, A.; Ailion, M.; Jalles, A.; Brignull, H.R.; Vilaça, J.L.; Dias, N.; Rodrigues, P.; Oliveira, J.F.; Neves-Carvalho, A.; Morimoto, R.I.; et al. Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: Rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 2996–3009. [[CrossRef](#)]
60. Van Oosten-Hawle, P.; Porter, R.S.; Morimoto, R.I. Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *Cell* **2013**, *153*, 1366–1378. [[CrossRef](#)]
61. Douglas, P.M.; Baird, N.A.; Simic, M.S.; Uhlein, S.; McCormick, M.A.; Wolff, S.C.; Kennedy, B.K.; Dillin, A. Heterotypic Signals from Neural HSF-1 Separate Thermotolerance from Longevity. *Cell Rep.* **2015**, *12*, 1196–1204. [[CrossRef](#)]
62. Chauve, L.; Hodge, F.; Murdoch, S.; Masoudzadeh, F.; Mann, H.J.; Lopez-Clavijo, A.F.; Okkenhaug, H.; West, G.; Sousa, B.C.; Segonds-Pichon, A.; et al. Neuronal HSF-1 coordinates the propagation of fat desaturation across tissues to enable adaptation to high temperatures in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **2021**, *19*, e3001431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Maman, M.; Carvalhal Marques, F.; Volovik, Y.; Dubnikov, T.; Bejerano-Sagie, M.; Cohen, E. A neuronal GPCR is critical for the induction of the heat shock response in the nematode *C. elegans*. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 6102–6111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kumsta, C.; Ching, T.T.; Nishimura, M.; Davis, A.E.; Gelino, S.; Catan, H.H.; Yu, X.; Chu, C.C.; Ong, B.; Panowski, S.H.; et al. Integrin-linked kinase modulates longevity and thermotolerance in *C. elegans* through neuronal control of HSF-1. *Aging Cell* **2014**, *13*, 419–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gracida, X.; Dion, M.F.; Harris, G.; Zhang, Y.; Calarco, J.A. An Elongin-Cullin-SOCS Box Complex Regulates Stress-Induced Serotonergic Neuromodulation. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 3089–3101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Das, S.; Min, S.; Prahlad, V. Gene bookmarking by the heat shock transcription factor programs the insulin-like signaling pathway. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 4843–4860. [[CrossRef](#)]
67. Das, S.; Ooi, F.K.; Cruz Corchado, J.; Fuller, L.C.; Weiner, J.A.; Prahlad, V. Serotonin signaling by maternal neurons upon stress ensures progeny survival. *Elife* **2020**, *9*, e55246. [[CrossRef](#)]
68. Edwards, S.L.; Erdenebat, P.; Morphis, A.C.; Kumar, L.; Wang, L.; Chamera, T.; Georgescu, C.; Wren, J.D.; Li, J. Insulin/IGF-1 signaling and heat stress differentially regulate HSF1 activities in germline development. *Cell Rep* **2021**, *36*, 109623. [[CrossRef](#)]
69. Vihervaara, A.; Sistonen, L. HSF1 at a glance. *J. Cell Sci.* **2014**, *127 Pt 2*, 261–266. [[CrossRef](#)]
70. Hajdu-Cronin, Y.M.; Chen, W.J.; Sternberg, P.W. The L-type cyclin CYL-1 and the heat-shock-factor HSF-1 are required for heat-shock-induced protein expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2004**, *168*, 1937–1949. [[CrossRef](#)]

71. Anckar, J.; Sistonen, L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *594*, 78–88.
72. Green, M.; Schuetz, T.J.; Sullivan, E.K.; Kingston, R.E. A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 3354–3362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Anckar, J.; Sistonen, L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: Implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 1089–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Li, J.; Chauve, L.; Phelps, G.; Brielmann, R.M.; Morimoto, R.I. E2F coregulates an essential HSF developmental program that is distinct from the heat-shock response. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 2062–2075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Baird, N.A.; Douglas, P.M.; Simic, M.S.; Grant, A.R.; Moresco, J.J.; Wolff, S.C.; Yates, J.R., 3rd; Manning, G.; Dillin, A. HSF-1-mediated cytoskeletal integrity determines thermotolerance and life span. *Science* **2014**, *346*, 360–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hsu, A.L.; Murphy, C.T.; Kenyon, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **2003**, *300*, 1142–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Morley, J.F.; Morimoto, R.I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 657–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Golden, N.L.; Plagens, R.N.; Kim Guisbert, K.S.; Guisbert, E. Standardized Methods for Measuring Induction of the Heat Shock Response in *Caenorhabditis elegans*. *J. Vis. Exp.* **2020**, *161*, e61030. [[CrossRef](#)]
79. Chiang, W.C.; Ching, T.T.; Lee, H.C.; Mousigian, C.; Hsu, A.L. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell* **2012**, *148*, 322–334. [[CrossRef](#)]
80. Vihervaara, A.; Duarte, F.M.; Lis, J.T. Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 385–397. [[CrossRef](#)]
81. Trinklein, N.D.; Murray, J.I.; Hartman, S.J.; Botstein, D.; Myers, R.M. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 1254–1261. [[CrossRef](#)]
82. Garrigues, J.M.; Tsu, B.V.; Daugherty, M.D.; Pasquinelli, A.E. Diversification of the *Caenorhabditis* heat shock response by Helitron transposable elements. *Elife* **2019**, *8*, e51139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Guisbert, E.; Czyz, D.M.; Richter, K.; McMullen, P.D.; Morimoto, R.I. Identification of a tissue-selective heat shock response regulatory network. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Morton, E.A.; Lamitina, T. *Caenorhabditis elegans* HSF-1 is an essential nuclear protein that forms stress granule-like structures following heat shock. *Aging Cell* **2013**, *12*, 112–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Jolly, C.; Morimoto, R.I. Stress and the cell nucleus: Dynamics of gene expression and structural reorganization. *Gene Expr.* **1999**, *7*, 261–270. [[PubMed](#)]
86. Melnick, M.; Gonzales, P.; Cabral, J.; Allen, M.A.; Dowell, R.D.; Link, C.D. Heat shock in *C. elegans* induces downstream of gene transcription and accumulation of double-stranded RNA. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0206715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Labbadia, J.; Morimoto, R.I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 435–464. [[CrossRef](#)]
88. Shalgi, R.; Hurt, J.A.; Krykbaeva, I.; Taipale, M.; Lindquist, S.; Burge, C.B. Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 439–452. [[CrossRef](#)]
89. Dutta, N.; Garcia, G.; Higuchi-Sanabria, R. Hijacking Cellular Stress Responses to Promote Lifespan. *Front. Aging* **2022**, *3*, 860404. [[CrossRef](#)]
90. Jee, H. Size dependent classification of heat shock proteins: A mini-review. *J. Exerc. Rehabil.* **2016**, *12*, 255–259. [[CrossRef](#)]
91. Snutch, T.P.; Baillie, D.L. Alterations in the pattern of gene expression following heat shock in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1983**, *61*, 480–487. [[CrossRef](#)]
92. McColl, G.; Rogers, A.N.; Alavez, S.; Hubbard, A.E.; Melov, S.; Link, C.D.; Bush, A.I.; Kapahi, P.; Lithgow, G.J. Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. *Cell Metab.* **2010**, *12*, 260–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Higuchi-Sanabria, R.; Paul, J.W., 3rd; Durieux, J.; Benitez, C.; Frankino, P.A.; Tronnes, S.U.; Garcia, G.; Daniele, J.R.; Monshietehadi, S.; Dillin, A. Spatial regulation of the actin cytoskeleton by HSF-1 during aging. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 2522–2527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. S6ti, C.; Csermely, P. Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology* **2000**, *1*, 225–233. [[CrossRef](#)]
95. Liu, S.; Wang, X.; Sun, F.; Zhang, J.; Feng, J.; Liu, H.; Rajendran, K.V.; Sun, L.; Zhang, Y.; Jiang, Y.; et al. RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. *Physiol. Genom.* **2013**, *45*, 462–476. [[CrossRef](#)]
96. Dams, S.D.; de Liefde-van Beest, M.; Nuijts, A.M.; Oomens, C.W.; Baaijens, F.P. Heat shocks enhance procollagen type I and III expression in fibroblasts in ex vivo human skin. *Skin Res. Technol.* **2011**, *17*, 167–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Ishida, Y.; Nagata, K. Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Methods Enzymol.* **2011**, *499*, 167–182. [[PubMed](#)]
98. Gomez-Pastor, R.; Burchfiel, E.T.; Neef, D.W.; Jaeger, A.M.; Cabisco, E.; McKinstry, S.U.; Doss, A.; Aballay, A.; Lo, D.C.; Akimov, S.S.; et al. Abnormal degradation of the neuronal stress-protective transcription factor HSF1 in Huntington’s disease. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14405. [[CrossRef](#)]
99. Batista-Nascimento, L.; Neef, D.W.; Liu, P.C.; Rodrigues-Pousada, C.; Thiele, D.J. Deciphering human heat shock transcription factor 1 regulation via post-translational modification in yeast. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15976. [[CrossRef](#)]

100. Raychaudhuri, S.; Loew, C.; Körner, R.; Pinkert, S.; Theis, M.; Hayer-Hartl, M.; Buchholz, F.; Hartl, F.U. Interplay of acetyltransferase EP300 and the proteasome system in regulating heat shock transcription factor 1. *Cell* **2014**, *156*, 975–985. [[CrossRef](#)]
101. Brunquell, J.; Raynes, R.; Bowers, P.; Morris, S.; Snyder, A.; Lugano, D.; Deonarine, A.; Westerheide, S.D. CCAR-1 is a negative regulator of the heat-shock response in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **2018**, *17*, e12813. [[CrossRef](#)]
102. Tonkiss, J.; Calderwood, S.K. Regulation of heat shock gene transcription in neuronal cells. *Int. J. Hyperth.* **2005**, *21*, 433–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Guettouche, T.; Boellmann, F.; Lane, W.S.; Voellmy, R. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* **2005**, *6*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Williams, R.; Laskovs, M.; Williams, R.I.; Mahadevan, A.; Labbadia, J. A Mitochondrial Stress-Specific Form of HSF1 Protects against Age-Related Proteostasis Collapse. *Dev. Cell* **2020**, *54*, 758–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Kaminsky, R.; Denison, C.; Bening-Abu-Shach, U.; Chisholm, A.D.; Gygi, S.P.; Broday, L. SUMO regulates the assembly and function of a cytoplasmic intermediate filament protein in *C. elegans*. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 724–735. [[CrossRef](#)]
106. Westerheide, S.D.; Ankar, J.; Stevens, S.M., Jr.; Sistonen, L.; Morimoto, R.I. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* **2009**, *323*, 1063–1066. [[CrossRef](#)]
107. Rivard, R.S.; Morris, J.M.; Youngman, M.J. The PP2A/4/6 subfamily of phosphoprotein phosphatases regulates DAF-16 and confers resistance to environmental stress in postreproductive adult *C. elegans*. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229812. [[CrossRef](#)]
108. Biglou, S.G.; Bendena, W.G.; Chin-Sang, I. An overview of the insulin signaling pathway in model organisms *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Peptides* **2021**, *145*, 170640. [[CrossRef](#)]
109. Oh, S.W.; Mukhopadhyay, A.; Svrzikapa, N.; Jiang, F.; Davis, R.J.; Tissenbaum, H.A. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4494–4499. [[CrossRef](#)]
110. Tepper, R.G.; Ashraf, J.; Kaletsky, R.; Kleemann, G.; Murphy, C.T.; Bussemaker, H.J. PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell* **2013**, *154*, 676–690. [[CrossRef](#)]
111. Shen, C.; Nettleton, D.; Jiang, M.; Kim, S.K.; Powell-Coffman, J.A. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20580–20588. [[CrossRef](#)]
112. Treinin, M.; Shliar, J.; Jiang, H.; Powell-Coffman, J.A.; Bromberg, Z.; Horowitz, M. HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol. Genom.* **2003**, *14*, 17–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Carranza, A.D.V.; Saragusti, A.; Chiabrando, G.A.; Carrari, F.; Asis, R. Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy. *Phytomedicine* **2020**, *66*, 153132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Chen, Y.; Leboutet, R.; Largeau, C.; Zentout, S.; Lefebvre, C.; Delahodde, A.; Culetto, E.; Legouis, R. Autophagy facilitates mitochondrial rebuilding after acute heat stress via a DRP-1-dependent process. *J. Cell Biol.* **2021**, *220*, e201909139. [[CrossRef](#)]
115. Kumsta, C.; Chang, J.T.; Schmalz, J.; Hansen, M. Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Fujimoto, M.; Nakai, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* **2010**, *277*, 4112–4125. [[PubMed](#)]
117. Kumsta, C.; Hansen, M. Hormetic heat shock and HSF-1 overexpression improve *C. elegans* survival and proteostasis by inducing autophagy. *Autophagy* **2017**, *13*, 1076–1077. [[CrossRef](#)]
118. Civelek, M.; Mehrkens, J.F.; Carstens, N.M.; Fitzenberger, E.; Wenzel, U. Inhibition of mitophagy decreases survival of *Caenorhabditis elegans* by increasing protein aggregation. *Mol. Cell Biochem.* **2019**, *452*, 123–131. [[CrossRef](#)]
119. Nehammer, C.; Podolska, A.; Mackowiak, S.D.; Kagias, K.; Pocock, R. Specific microRNAs regulate heat stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8866. [[CrossRef](#)]
120. Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [[CrossRef](#)]
121. Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **1993**, *75*, 855–862. [[CrossRef](#)]
122. Brunquell, J.; Snyder, A.; Cheng, F.; Westerheide, S.D. HSF-1 is a regulator of miRNA expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Schreiner, W.P.; Pagliuso, D.C.; Garrigues, J.M.; Chen, J.S.; Aalto, A.P.; Pasquinelli, A.E. Remodeling of the *Caenorhabditis elegans* non-coding RNA transcriptome by heat shock. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 9829–9841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Pagliuso, D.C.; Bodas, D.M.; Pasquinelli, A.E. Recovery from heat shock requires the microRNA pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Tuorto, F.; Herbst, F.; Alerasool, N.; Bender, S.; Popp, O.; Federico, G.; Reitter, S.; Liebers, R.; Stoecklin, G.; Gröne, H.J.; et al. The tRNA methyltransferase *Dnmt2* is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J.* **2015**, *34*, 2350–2362. [[CrossRef](#)]
126. Navarro, I.C.; Tuorto, F.; Jordan, D.; Legrand, C.; Price, J.; Braukmann, F.; Hendrick, A.G.; Akay, A.; Kotter, A.; Helm, M.; et al. Translational adaptation to heat stress is mediated by RNA 5-methylcytosine in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **2021**, *40*, e105496. [[CrossRef](#)]
127. Labbadia, J.; Briemann, R.M.; Neto, M.F.; Lin, Y.F.; Haynes, C.M.; Morimoto, R.I. Mitochondrial Stress Restores the Heat Shock Response and Prevents Proteostasis Collapse during Aging. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 1481–1494. [[CrossRef](#)]

128. Taouktsi, E.; Kyriakou, E.; Smyrniotis, S.; Borbolis, F.; Bondi, L.; Avgeris, S.; Trigazis, E.; Rigas, S.; Voutsinas, G.E.; Syntichaki, P. Organismal and Cellular Stress Responses upon Disruption of Mitochondrial Lonp1 Protease. *Cells* **2022**, *11*, 1363. [[CrossRef](#)]
129. Gibellini, L.; De Gaetano, A.; Mandrioli, M.; Van Tongeren, E.; Bortolotti, C.A.; Cossarizza, A.; Pinti, M. The biology of Lonp1: More than a mitochondrial protease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2020**, *354*, 1–61.
130. Voos, W.; Pollecker, K. The Mitochondrial Lon Protease: Novel Functions off the Beaten Track? *Biomolecules* **2020**, *10*, 253. [[CrossRef](#)]