



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ»**

Ηsp70 ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ»**

Hsp70 ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΣΤΕΦΑΝΟΣ

Hsp70 ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΕΣ

ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ Χ.

ΠΑΠΠΑΣ Π.

... *A*φιερωμένη στους σημαντικούς
ανθρώπους της ζωής μου...

Η παρούσα εργασία εκτός από το επιστημονικό κομμάτι σημαίνει παράλληλα και τον τερματισμό ενός ταξιδιού στα πεδία της Βιολογίας και των νέων τεχνολογιών των συναφών της επιστημών. Σημαίνει το τέρμα, μετά την έναρξη ενός δύσκολου εγχειρήματος για μένα προσωπικά και τους οικείους μου λόγω των απαιτήσεων που έχει ένα μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Ειδικότερα σε μια σχολή με τη μακρά ιστορία της Ιατρικής Ιωαννίνων! Αφήνοντας λοιπόν πίσω την κούραση από την παράλληλη εργασία μου και τα μικροπροβλήματα της καθημερινότητας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του προγράμματος, ανεξαιρέτως και ειδικότερα τον Δ/ντή του ΠΜΣ ΒΒΕ κ. Χ. Αγγελίδη και την καθηγήτρια κ. Π. Βεζυράκη. Επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια Κα Μητσέλου Α. και την Δρ. Κασιούμη Π., με τις θερμότερες ευχαριστίες. Για το τέλος άφησα τους συμφοιτητές μου Παντελή, Ευδοξία, Ειρήνη, Βιβή και Σταθούλα για τα ατελείωτα email και την αλληλοβοήθεια που μοιραστήκαμε! Είναι πολύ ωραίο το συναίσθημα μετά από ένα τέτοιο τέλος η γεύση να είναι γλυκιά και το μόνο που μένει είναι φίλιες, γνωριμίες με αξιόλογους ανθρώπους και κάποιες γνώσεις που εύχομαι να ανθίσουν μέσω της εργασίας μου και να μη ξεχαστούν σε κάποιο χρονοντούλαπο. Εις το επανιδείν...

Με εκτίμηση,

Γεωργίου Στέφανος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....	11
1.2. ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΟΜΟΙΟΑΣΤΑΣΗ.....	12
1.3. ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ.....	12
1.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ-ΣΥΝΟΔΟΙ (Chaperones).....	13
1.5. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ HSP's.....	14
1.5.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	15
1.5.2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ HSP's.....	15
1.5.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ HSP's.....	16
1.5.4. ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ 70 (kDa) - HSP70.....	16
1.6. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	19
1.6.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	19
1.6.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ.....	19
1.6.3. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ (ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ).....	21
1.6.4. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	22
1.7. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	24
1.7.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....	24
1.7.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....	24
1.8. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ STRESS: Πώς οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στο άγχος;.....	25
1.9. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ ΠΡΩΙΜΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΑΔΜΙΟΥ	28
2. ΟΙ HSP70 ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	29

2.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	31
2.2.	HSP's ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	31
2.2.1.	ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	31
2.2.2.	ΕΠΙΓΕΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	33
2.2.3.	HSPs ΣΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	34
2.3.	ΑΝΤΙΦΑΤΙΚΑ ΑΠΟΔΕΙΚΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	35
2.4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	36
2.4.1.	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΣΗ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ ΤΟΞΙΚΟΥ.....	37
2.4.2.	ΠΡΟΣΛΗΨΗ, ΟΡΙΑΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	37
2.4.3.	Η ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ HSP70 ΚΑΙ Η ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΑΝΟΧΗΣ.....	37
2.4.4.	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΥ.....	38
2.4.5.	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΥΓΧΥΣΕΩΣ.....	39
2.4.6.	ΣΥΝΕΡΓΑΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΞΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	39
2.4.7.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ HSPs ΜΕΣΩ ΤΗΣ Northern ΚΑΙ Western Blot.....	44
2.4.8.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΟΛΛΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΩΣ ΣΕΤ.....	46
3.	ΟΙ Hsp70 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ..	50
3.1.	ΝΟΣΟΣ ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ ΚΑΙ ΤΑΟΥΟΠΑΘΕΙΕΣ.....	51
3.2.	HSP70 ΚΑΙ Β-ΑΜΥΛΟΕΙΔΕΣ.....	53
3.3.	ΝΟΣΟΣ PARKINSON.....	53
3.4.	Hsp70 και Alpha-Synuclein.....	53
3.5.	Hsp70 και LRRK2.....	55
3.6.	HD και PolyQ.....	56
3.7.	ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ ΕΤΕΡΟΠΛΕΥΡΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	58
3.8.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.....	59

4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	60
5.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	63
5.1.	SUMMARY.....	63
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες είναι ουσίες με κυρίαρχο και πρωταρχικό ρόλο στη ζωή. Άλλωστε το όνομά τους υποδηλώνει το ρόλο αυτό. Αποτελούν απαραίτητο στοιχείο για κάθε ζωντανό οργανισμό. Η μελέτη της δομής μίας πρωτεΐνης γίνεται σε τέσσερα επίπεδα και περιλαμβάνει την πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή.

Πρωτοταγής δομή

Για να χαρακτηρίσουμε μία πρωτεΐνη ή ένα πεπτιδίο, δεν αρκεί να γνωρίζουμε μόνο από ποια και από πόσα κατά περίπτωση αμινοξέα αποτελείται. Πρέπει επιπλέον να προσδιοριστεί και η σειρά με την οποία βρίσκονται συνδεδεμένα τα αμινοξέα αυτά. Και τούτο γιατί η σειρά αυτή, δηλαδή η αλληλουχία των αμινοξέων, καθορίζει και τις ιδιότητες του πεπτιδίου ή της πρωτεΐνης.

Δευτεροταγής δομή

Η εύρεση της πρωτοταγούς δομής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεν παρέχει το σύνολο των πληροφοριών για τη δομή της πρωτεΐνης, αφού η αλυσίδα των αμινοξέων που αποτελούν την πρωτεΐνη δεν είναι ευθεία αλλά πραγματοποιεί ορισμένες αναδιπλώσεις προσδίδοντας στο μόριο συγκεκριμένο σχήμα στο χώρο. Οι αναδιπλώσεις αυτές εξαρτώνται από την αλληλουχία των αμινοξέων και δεν είναι τυχαίες. Καθορίζονται από διάφορες δυνάμεις μεταξύ των τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και προσδίδουν στην πρωτεΐνη χαρακτηριστικό σχήμα, καθώς και την δυνατότητα να παίξει το συγκεκριμένο βιολογικό της ρόλο. Οι δυνάμεις που συμμετέχουν στις αναδιπλώσεις αυτές είναι δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Τριτοταγής δομή

Η εξέλιξη των μεθόδων κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ οδήγησε στην ακριβέστερη μελέτη της διάταξης μίας πρωτεΐνης στο χώρο. Συγκεκριμένα, η ήδη αναδιπλωμένη έλικα μίας πρωτεϊνικής αλυσίδας αναδιπλώνεται σε διάφορα τμήματά της προσδίδοντας στο πρωτεϊνικό μόριο συνολικά, ένα συγκεκριμένο σχήμα.

Τεταρτοταγής δομή

Όμοιες ή διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που έχουν αναδιπλωθεί μπορούν συχνά να συνενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μεγαλύτερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Το τελικό σχήμα που αποκτά το πρωτεϊνικό σύμπλοκο στο χώρο αποτελεί την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης, ενώ οι ανεξάρτητες πεπτιδικές αλυσίδες που συνθέτουν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελούν τις υπομονάδες.

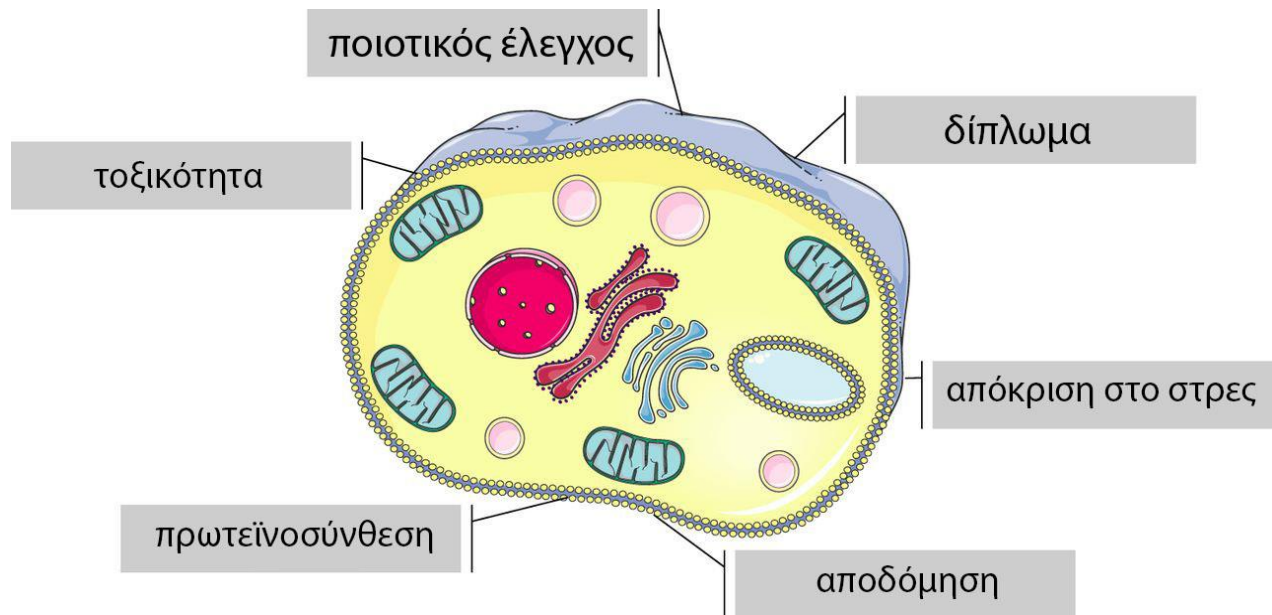
Τελικό σχήμα πρωτεϊνών

Τελικά οι πρωτεΐνες αποκτούν συγκεκριμένο σχήμα που μπορεί να είναι σφαιρικό ή ινώδες. Οι σφαιρικές πρωτεΐνες είναι διαλυτές στο νερό και σε αραιά διαλύματα αλάτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στον ορό του αίματος, στο ασπράδι του αυγού, αλλά και τα περισσότερα ένζυμα. Οι ινώδεις πρωτεΐνες είναι αδιάλυτες στο νερό και χρησιμεύουν στους διάφορους οργανισμούς

ως στηρικτικές και σκελετικές ουσίες. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται το κολλαγόνο, που αποτελεί μέρος του συνδετικού ιστού και οι κεράτινες, από τις οποίες αποτελούνται οι τρίχες και τα νύχια κ.ά. Ο αριθμός των διάφορων πρωτεϊνών που υπάρχουν στον άνθρωπο υπερβαίνει τις 30.000. Ο αριθμός φαντάζει πολύ μεγάλος, αλλά θα πρέπει να σκεφτεί κανείς ότι κάθε μία πρωτεΐνη επιτελεί και μία συγκεκριμένη λειτουργία, καθώς επίσης ότι ο αριθμός των λειτουργιών τις οποίες οι πρωτεΐνες επιτελούν είναι τεράστιος.

1.2 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ

Πρωτεϊνική ομοιόσταση καλείται το δίκτυο κάποιων μηχανισμών των πρωτεϊνών οι οποίοι διατηρούν τη σωστή λειτουργία και τελούν τις απαραίτητες ενέργειες ώστε να μην επηρεάζεται η εκάστοτε πρωτεΐνη από εξωτερικές και περιβαλλοντικές μεταβολές. Γενικότερα οι όποιες διαταραχές στην ομοιόσταση του οργανισμού μπορεί να οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, σε ακραίες μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (θερμοκρασία, ακτινοβολίες, διαθεσιμότητα οξυγόνου), ενώ συχνά είναι απόρροια του τρόπου ζωής (κάπνισμα, αλκοόλ κτλ.). Κάθε διαταραχή της ομοιόστασης μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση διάφορων ασθενειών.



Εικ. 1. 1. Ποιοτικός έλεγχος, 2. Δίπλωμα, 3. Τοξικότητα, 4. Απόκριση στο στρες, 5. Πρωτεϊνοσύνθεση,

6. Αποδόμηση

1.3. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες αποτελεί το κύριο θέμα μας και αφορά τη σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση. Η λανθασμένη αναδίπλωση συνδέεται με δημιουργία συσσωμάτων, δυσλειτουργία και παθογένεια. Πολλές ασθένειες - κυρίως νευροεκφυλιστικές - σχετίζονται με ελαττωματική

αναδίπλωση πρωτεϊνών και χαρακτηρίζονται από την εναπόθεση συσσωματωμάτων σε νευρώνες και άλλα κύτταρα και ενίοτε και εξωκυττάρια. Οι κυριότερες εξ αυτών των ασθενειών είναι οι εξής:

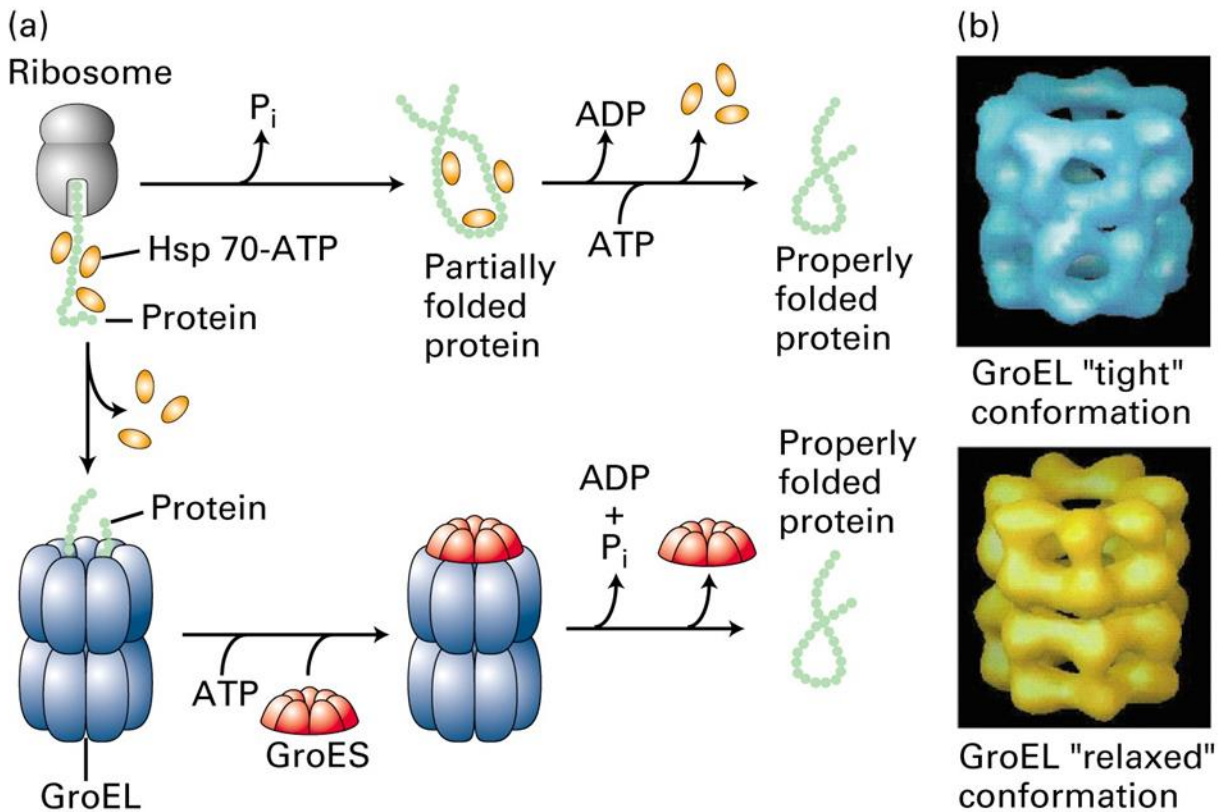
- *Νοσήματα Prion-Μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες*
- *Νόσος Alzheimer*
- *Χορεία Huntington*
- *Νόσος Parkinson*
- *Σπονδυλο-παρεγκεφαλιδική αταξία*
- *Αμυοτροφική ετερόπλευρη σκλήρυνση*

1.4 Μοριακές πρωτεΐνες-συνοδοί (Chaperones)

Μοριακούς συνοδούς αναφέρουμε τις πρωτεΐνες οι οποίες βοηθούν μία άλλη πρωτεΐνη αλληλεπιδρώντας μαζί της και σταθεροποιώντας την, ώστε να αποκτήσει σταθερή στερεοδιαμόρφωση, απουσιάζοντας όμως από την τελική δομή της εν λόγω πρωτεΐνης. Μια από τις σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις αφορά ότι προφυλάσσουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα από λανθασμένη αναδίπλωση. Ένα σημαντικό ερώτημα αποτελεί το γιατί είναι σημαντική η παρουσία συνοδών εφόσον η πρωτεϊνική αναδίπλωση είναι αυθόρμητη διαδικασία;

Οι 3 σημαντικότεροι λοιπόν λόγοι είναι:

1. Να προστατευθούν οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες από το πλούσιο σε βιομόρια περιβάλλον του κυττάρου που μπορεί να οδηγήσει σε συσσωμάτωση και λανθασμένη αναδίπλωση.
2. Για να επιταχυνθούν τα βραδέα στάδια της αναδίπλωσης.
3. Για την αποφυγή συσσωμάτωσης.



Εικ. 2 Περιγραφή εικόνας

Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες συνοδών αποτελεί η οικογένεια των *hsp* (*heat-shock-proteins*) οι οποίες θα αναλυθούν διεξοδικά παρακάτω, δίνοντας έμφαση στις *hsp70* που αποτελούν και το αντικείμενο της διατριβής, όντας ο σημαντικότερος εκπρόσωπος τους.

1.5 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ HSPs

1.5.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι πρωτεΐνες-συνοδοί πρωτοεπισημάνθηκαν σε καταστάσεις θερμικού σοκ και αυτός είναι ο λόγος της ονομασίας *heat shock proteins*. Οι πρώτες παρατηρήσεις κυτταρικής απόκρισης στο θερμικό σοκ έγιναν από το Ritossa [3] το 1962. Μετά από προσωρινή έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες, παρατηρήθηκε διόγκωση στα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων της *Drosophila*. Ακόλουθες έρευνες ήρθαν να αποδείξουν πως από μονοκύτταρους οργανισμούς ως τα φυτά και τον άνθρωπο, τα κύτταρα διαθέτουν ένα μηχανισμό προστασίας έναντι επιβλαβών ουσιών, ακτινοβολιών, φαρμάκων, βαρέων μετάλλων κτλ. [27]. Ο ρόλος των παραγόμενων *Hsp's* στην κυτταρική προστασία αποδόθηκε στη δράση τους ως μοριακών συνοδών (*molecular chaperones*), που υποβοηθούν τις λανθασμένα αναδιπλούμενες πρωτεΐνες να αποκτήσουν τη σωστή τρισδιάστατη δομή τους [60]. Κάποια όμως μέλη των *hsp's* δείχνουν

να παράγονται και σε φυσιολογικές συνθήκες παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και τη μεταφορά τους δια μέσω των μεμβρανών [138].



Ο Ferruccio Ritossa παρατηρεί τη διόγκωση στα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων της drosophila melanogaster στο εργαστήριό του στις αρχές της δεκαετίας του 1960.

1.5.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ HSPs

Η ικανότητα των διαφόρων οργανισμών να αποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους είναι καθοριστική για την επιβίωσή τους. Τα κύτταρα όλων των οργανισμών έχουν αποκτήσει την ικανότητα να αισθάνονται και να προσαρμόζονται γρήγορα στις διάφορες στρεσογόνες συνθήκες του περιβάλλοντός τους, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν αλλαγές στην θερμοκρασία και στο pH, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, στέρση θρεπτικών συστατικών, παρουσία χημικών τοξινών ή ιόντων βαρέων μετάλλων κ.α. [137]. Τα κύτταρα τα οποία υφίστανται κάποιο τέτοιο στρες μπορούν να αποκριθούν σε αυτό και να προσαρμοστούν μεταβάλλοντας τις μεταβολικές τους διεργασίες, παύοντας την ανάπτυξή τους και εκφράζοντας ειδικές πρωτεΐνες απόκρισης προς την εκάστοτε στρεσογόνο συνθήκη. Μία από τις πιο συχνές στρεσογόνες συνθήκες για τα κύτταρα ενός οργανισμού είναι η αύξηση της θερμοκρασίας. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αποκρίνονται αυξάνοντας την έκφραση ειδικών πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας, γνωστών και ως heat shock proteins (HSPs). Οι heat shock proteins είναι μοριακοί συνοδοί (chaperones), απαραίτητες για τη διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών, καθώς εμποδίζουν τη λανθασμένη αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων και βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Είναι οι πιο συντηρημένες φυλογενετικά πρωτεΐνες και είναι παρούσες σε όλους τους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι περισσότερες HSPs εκφράζονται σταθερά, σε χαμηλότερα επίπεδα, αλλά τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας. Διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, για παράδειγμα το κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, έχουν εξειδικευμένες HSPs, κατάλληλες για να αποκρίνονται στις ανάγκες του καθενός.

Παρόλα αυτά, και παρά τα διαφορετικά μοριακά τους βάρη, οι HSPs έχουν κάποιες κοινές λειτουργικές επικράτειες: μια επικράτεια πρόσδεσης νουκλεοτιδίου αδερίνης, που προσδένει και υδρολύει ATP, και μία επικράτεια πρόσδεσης πεπτιδίου, που προσδένει εκτεθειμένα υδροφοβικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών- υποστρωμάτων. Η πρόσδεση ATP προκαλεί μια καίριας σημασίας αλλαγή στη στεροδιάταξη, που οδηγεί στην απελευθέρωση της προσδεδεμένης πρωτεΐνης.

Λόγω του ότι η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με μία ή περισσότερες πρωτεΐνες συνοδούς, οι θέσεις πρόσδεσης πεπτιδίων των HSPs παρουσιάζουν -κατ' ανάγκη- ευρεία εξειδίκευση και η πρόσδεση υποβοηθείται από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Έτσι, οι HSPs αναμένεται να προσδένουν και άλλα μη-πρωτεϊνικά μόρια με εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα. [138]

Τα τελευταία χρόνια έρευνες υποδεικνύουν πως οι HSPs πέραν του ρόλου τους ως μοριακοί συνοδοί παίζουν σημαντικό ρόλο και σε διαφορετικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα σε διαδικασίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά, αρκετά είναι τα ερωτήματα που προκύπτουν σε σχέση με την ακριβή λειτουργία τους και γι' αυτό οι HSPs αποτελούν αντικείμενο έρευνας πληθώρας εργαστηρίων παγκοσμίως με σκοπό την αποσαφήνιση του ακριβούς μηχανισμού με τον οποίο δρουν.


1.5.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ HSPs

Με βάση το μοριακό τους βάρος οι HSPs χωρίστηκαν στις εξής έξι κατηγορίες: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 και τις small hsps. Αναλυτικά στον πίνακα 1.

1.5.4. Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (kDa) - HSP70

Η Hsp70 οικογένεια, της οποίας τα μέλη παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία τους, περιλαμβάνει την hsp70, η οποία εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο σε καταστάσεις στρες, την hsc70, η οποία δεν επάγεται σε καταστάσεις στρες αλλά εκφράζεται αδιάφορα, την Grp78, της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από τα επίπεδα γλυκόζης σε φυσιολογικές καταστάσεις στο κύτταρο, και την mtpr70. Οι hsp70 και hsc70 εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, την Grp78 την εντοπίζουμε στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η mtpr70 βρίσκεται στο μιτοχόνδριο [68]. Αναλύοντας τη μοριακή ανατομία των hsp70s παρατηρούμε μια καλά συντηρημένη αμινοτελική περιοχή 44 kd, με ασθενή δράση ATPάσης [70], και ένα καλά συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο, μοριακού βάρους 28 kd, στο οποίο γίνεται η πεπτιδική πρόσδεση [73]. Οι hsp70s παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συγγένειας πρόσδεσης για υδρόφοβα πεπτίδια και αυτή η συγγένεια αυξάνει μετά την μετατροπή του ATP σε ADP [150]. Έτσι ο μηχανισμός δράσης τους μπορεί να περιγραφεί ως εξής: Αρχικά υδρόφοβες πρωτεΐνες προσδένονται αντιστρεπτά με το σύμπλεγμα Hsp70-ATP. Η υδρόλυση του ATP επάγει την αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης και αυξάνει την συγγένεια της Hsp70 με το υπόστρωμά της, ώστε να σχηματιστεί ένα σταθερό σύμπλεγμα υπόστρωμα-Hsp70-ADP. Είναι γνωστό ότι οι Hsp70s έχουν ομοσυνοδούς πρωτεΐνες (co-chaperones) DnaJ τύπου, όπως η Hsp40, οι οποίες διαθέτουν μια περιοχή J, που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή τους με τις hsps. Οι DnaJ πρωτεΐνες επάγουν τη χαμηλή ενεργότητα ATPάσης των Hsp70s και έτσι μετατρέπουν την προσωρινή αλληλεπίδραση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης σε σταθερό σύμπλεγμα πολυπεπίδιο-Hsp70-ADP. Στη συνέχεια ένας αριθμός βοηθητικών πρωτεϊνικών συνοδών, όπως και οι

Hsp και Hsp, μετατρέπουν το ADP σε ATP και το σύμπλεγμα Hsp70-ATP απελευθερώνεται από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα, το οποίο οδηγείται σε σωστή αναδίπλωση [139]. Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους των hsp70s είναι η προστασία του κυττάρου από το θερμικό σοκ, η οποία επιτυγχάνεται με την σύνδεση των hsp70s με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες, με την αποτροπή δημιουργίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων [141]. Πρέπει να τονισθεί ότι οι hsp70s φαίνεται να αποτρέπουν την συσσωμάτωση αναδιπλούμενων πεπτιδίων και κατά την ενδοκυτταρική τους μετατόπισή τους [140]. Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική μετατόπιση των hsp70s από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και τη συσσώρευσή τους στους πυρηνίσκους, χωρίς όμως να έχει ακόμα διευκρινιστεί η βιολογική σημασία του παραπάνω εντοπισμού [142]. Αυξημένα ποσοστά έκφρασης των μελών της Hsp70 οικογένειας έχουν παρατηρηθεί σε υψηλής επιθετικότητας κακοήθους όγκους [142]. Η μοριακή βάση της υπερέκφρασης των Hsps σε καρκινικά κύτταρα δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα [30]. Ένας πιθανός ρόλος τους στην ογκογένεση μπορεί να θεωρηθεί η δράση τους σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δημιουργία καρκίνου, όπως πρωτεΐνες ογκογονιδίων. Η hsp70 έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες των ικτών ογκογονιδίων E1A του αδενοϊού και το μεγάλο T αντιγόνο του SV40, καθώς επίσης και με το κυτταρικό c-myc. Επίσης οι hsp70 και hsc70 αλληλεπιδρούν με μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη και την αυξάνουν τον χρόνο ημιζωής της. Τέλος οι Hsp70s μπορούν να μπλοκάρουν τη διαδικασία της απόπτωσης κυττάρων σε καταστάσεις στρες με διάφορους τρόπους, όπως αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών μέσω του κυτοχρώματος c, μπλοκάροντας μεταβολικούς δρόμους καθοδικά της ενεργότητας των κασπασών και αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των SARKs/JNKs κινασών, οι οποίες ενεργοποιούν την οδό των κασπασών με φωσφορυλίωση [68]. Έχει αναφερθεί ότι σε μερικά κύτταρα όγκων οι Hsps (Hsp70, Hsp90) εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπου παίζουν το ρόλο αντιγόνου ή πιο πιθανό το ρόλο των αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων [143]. Η δραστηριότητα των πρωτεϊνών Hsp70 ρυθμίζεται από ομοσυννοδούς όπως οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων [145], [144]. Τα συνημμένα συστήματα Hsp70 διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο όχι μόνο σε εχθρικά περιβάλλοντα, αλλά και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Αυτές οι πρωτεΐνες σταθεροποιούν την ξεδιπλωμένη πρόδρομη κατάσταση πριν από τη συναρμολόγησή τους σε πολυμοριακά σύμπλοκα στην κυτοσόλη και / ή τα μετατοπίζει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια. Οι Hsp70 διατηρούν επίσης πρόσφατα μετατοπισμένες πρωτεΐνες σε ξετυλιγμένη κατάσταση πριν από την αναδίπλωση και τη συναρμολόγησή τους σε οργανίδια. Πρόσθετα προάγουν τη διάλυση αδιάλυτων συσσωματωμάτων και την αναδίπλωση Πολυπεπτιδίων [146]. Η οικογένεια Hsp70 στη *D. melanogaster* περιλαμβάνει την επαγωγή με θερμότητα της Hsp70 και της ιδιοσυστατικά εκφρασμένης Hsc70 πρωτεΐνης. Πέντε διαφορετικά γονίδια hsc70 εκφράζονται με ένα χαρακτηριστικό χωρικό και χρονικό τρόπο υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης στην *Drosophila* [147]. Δύο διαφορετικοί τόποι, 87A7 και 87C1, στο δεξιό βραχίονα του χρωμοσώματος 3 φέρουν συστάδες γονιδίων που κωδικοποιούν για την επαγωγή με θερμότητα Hsp70 στη *D. melanogaster*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp70 διαφέρουν από άλλες κατηγορίες πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Είναι ένα από τις πιο διατηρημένες και πρωτοεμφανιζόμενες κάτω από συνθήκες άγχους. Είναι από τις πιο ευρέως μελετημένες και καλά καθορισμένες τάξεις των Hsps.

Οικογένεια	Δομή	ATP	Μέλη		Ομοσυνοδός	Λειτουργίες
			Προκαρυωτικά	Ευκαρυωτικά		
Hsp100	6-7μερής 	+	ClpB			-Αποσυμπλεγματοποίηση με την Hsp70
			ClpA			-Πρωτεόλυση με τη ClpP πρωτεάση
				Hsp104		-Θερμοανοχή -Αποσυμπλεγματοποίηση με την Hsp70
Hsp90	διμερής 	+	HtpG			-Ανοχή σε ακραίο θερμοκ στρες
				Hsp90	Hop, p23 CDC37	-Ανοχή σε στρες -Έλεγχος αναδίπλωσης και ενεργότητας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, κινασών κ.λπ.
Hsp70	μονομερής 	+	DnaK		DnaJ, GrpE	-De novo αναδίπλωση πρωτεϊνών -Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών -Καταβολισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων -Ρύθμιση στρες απόκρισης
				Hsp70, Hsc70	Hsp40, Bag1 Hip, Chip Hop, HspBP1	-De novo αναδίπλωση πρωτεϊνών -Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών με την Hsp104 -Ρύθμιση στρες απόκρισης -Ρύθμιση ενεργότητας αναδιπλωμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών
Hsp60	14μερής 16μερής 		GroEL		GroES	-De novo αναδίπλωση πρωτεϊνών -Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών
				CCT/TriC	Προφολντίνη	-De novo αναδίπλωση ακτίνης και τουμπολίνης
sHsps	8-24μερής 		IbpA, IbpB			-Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών που συνδέονται στον κυτταροσκελετό
				Hsp25, Κρυσταλλίνη		-Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών -Συστατικό του φακού του οφθαλμού

Πίνακας 1. Οι οικογένειες των μοριακών συνοδών με την αντίστοιχη δομή και λειτουργία τους.

(Αγγελίδης 2003)

1.6. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

1.6.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Γενικά η συμπεριφορά μιας τοξικής ουσίας, μεταξύ των ζωϊκών ειδών, δεν υπαγορεύεται από την ειδική ποιότητά της, αλλά από μια ποσοτική εκλεκτικότητα. Όλοι οι χημικοί παράγοντες μπορούν να έχουν ανεπιθύμητη επίδραση πάνω σε ένα βιολογικό σύστημα, εάν μια αρκούντως μεγάλη συγκέντρωση της χημικής ουσίας, επιτύχει να έλθει σε επαφή με το βιολογικό αυτό σύστημα. Έτσι, ουσίες τοξικές για τα ζώα, θα ήταν άλλες λιγότερο και άλλες περισσότερο δηλητηριώδεις και για τον άνθρωπο. Μια ένδειξη σχετικά με την τοξικότητα μιας ουσίας και μέτρο σύγκρισης μεταξύ τους δίνει η μέση θανατηφόρος δόση (LD50) μιας καθαρής ουσίας σε mg/Kg βάρους, η οποία όταν χορηγηθεί από το στόμα σε πειραματόζωα, θα θανατώσει το 50% από αυτά. Αν και οι διαφορές μεταξύ ποντικού και ανθρώπου είναι σημαντικές και η συμπεριφορά της τοξικής ουσίας επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, εν τούτοις στην πράξη η LD50 παρέχει μια αδρή αντίληψη για το πόσο δραστικό είναι ένα δηλητήριο. Ο καθορισμός της τοξικότητας είναι δύσκολος όταν η ουσία εισπνέεται ή όταν η έκθεση σ' αυτήν γίνεται μέσω του υδάτινου περιβάλλοντος.

1.6.2. Παράγοντες που καθορίζουν την τοξικότητα μιας ουσίας.

Σε σχέση με τον τοξικό παράγοντα:

- Χημική σύσταση
- Καθαρότητα
- Φυσικά χαρακτηριστικά
- Διαλυτότητα
- Έκδοχα

Σε σχέση με τις συνθήκες έκθεσης

- Δόση
- Απορρόφηση
- Κατανομή
- Απέκκριση
- Βιομετατροπή
- Συχνότητα έκθεσης
- Χρόνος έκθεσης

Σε σχέση με το βιολογικό σύστημα

- Είδος
- Φύλο
- Φυλή
- Ηλικία
- Βάρος σώματος
- Διατροφική κατάσταση
- Ιδιοσυγκρασία
- Εξάρτηση
- Συνέργια ή ανταγωνισμός

Σε σχέση με το περιβάλλον

- Θερμοκρασία
- Βαρομετρική πίεση
- Ακτινοβολία

ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

- Είδος του οργανισμού (ζώα, άνθρωπος)
- Ηλικία (τα παιδιά και οι υπερήλικες παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία)
- Φύλο (σε έρευνες έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένες ουσίες τα αρρενα άτομα είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητα από τα θήλεα)
- Φυλή (η γενετικά προκαθοριζόμενη ιδιοσυγκρασία του ατόμου μπορεί να αποτελέσει πρόσφορο έδαφος για την εμφάνιση υπερευαισθησίας)
- Παρουσία νόσων
- Εξάρτηση και εθισμός από μια ουσία
- Βάρος του σώματος και διαιτητική κατάσταση

ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

- Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος (η ένταση μιας τοξικής αντίδρασης ενός βιολογικού συστήματος είναι ανάλογη της θερμοκρασίας, ενώ η διάρκεια της αντίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογη της θερμοκρασίας)
- Η βαρομετρική πίεση και η ακτινοβολία επηρεάζουν την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση φαρμάκων και τοξικών παραγόντων

1.6.3. Μυκοτοξίνες: εμφάνιση και τοξικότητα

Οι μυκοτοξίνες είναι μια δομικά διαφορετική ομάδα ενώσεων κυρίως μικρού μοριακού βάρους, που παράγονται κυρίως από τον δευτερογενή μεταβολισμό ορισμένων νηματοειδών μυκήτων, οι οποίοι υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας μπορούν να αναπτυχθούν σε διάφορα τρόφιμα και τροφές. Προκαλούν μια τοξική απόκριση, που ονομάζεται μυκοτοξίνωση, όταν απορροφάται από υψηλότερα σπονδυλωτά και άλλα ζώα. Η κατάποση μυκοτοξινών από ανθρώπους, η οποία συμβαίνει κυρίως μέσω φυτικών τροφών καθώς και των υπολειμμάτων και μεταβολιτών που υπάρχουν σε ζωοτροφές, μπορεί να οδηγήσει σε γενική κυτταροτοξικότητα που συνήθως σχετίζεται με την αναστολή της σύνθεσης μακρομορίων όχι μόνο σε υψηλές δόσεις τοξινών [148], αλλά και, σε χαμηλότερες δόσεις, σε λεπτές αλλοιώσεις των λειτουργιών των διαφόρων ιστών και οργάνων όπως το εντερικό, ηπατικό και νεφρικό επιθήλιο, καθώς και το νευρικό, αναπαραγωγικό και ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, η κατάποση ορισμένων από αυτές τις μυκοτοξίνες έχει συνδεθεί με καρκινογόνες και τερατογόνες επιδράσεις [149]. Οι μυκοτοξιγενείς μύκητες που εμπλέκονται στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα ανήκουν κυρίως σε τρία γένη: *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Ενώ τα είδη *Fusarium* είναι καταστρεπτικά παθογόνα φυτών που παράγουν μυκοτοξίνες πριν ή αμέσως μετά τη συγκομιδή, τα είδη *Penicillium* και *Aspergillus* απαντώνται συχνότερα ως μολυσματικές ουσίες και τρόφιμα κατά την ξήρανση και την επακόλουθη αποθήκευση. Μεταξύ του μεγάλου αριθμού υφιστάμενων μυκοτοξινών, περισσότερων από 350, μερικές έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή, δικαιολογώντας ότι η ποσότητα τους σε τρόφιμα ρυθμίζεται σε σχέση με τον υψηλό επιπολασμό τους σε προϊόντα (δημητριακά, φρούτα, ποτά, καφέ, και τη σάρκα) και την τοξικότητά τους στον άνθρωπο και στα ζώα. Αυτές οι μυκοτοξίνες περιλαμβάνουν: (1) αφλατοξίνες, κυρίως αφλατοξίνη B1 (AFB1), (2) ωχρατοξίνες, κυρίως ωχρατοξίνη A (OTA), (3) τριχοθηκένια όπως τοξίνη T-2 και δεσοξυνιβαλενόλη (DON) όπως η φουμονισίνη B1 (FB1) και (5) η ζεαραλενόνη (ZEN). Σε αυτή τη μελέτη, επιδιώξαμε να προσδιορίσουμε την επίδραση της οξειδωτικής βλάβης στην παθογένεση της μυκοτοξίνωσης και να τοποθετήσουμε οξειδωτικό στρες στις οδούς σηματοδότησης της επαγόμενης από μυκοτοξίνες τοξικότητας.

1.6.4. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Στο περιβάλλον έχουν ανιχνευθεί άνω των 40 στοιχείων που ανήκουν στην κατηγορία των μετάλλων. Επικίνδυνα είναι τα αποκαλούμενα βαρέα μέταλλα όπως βηρύλλιο, κάδμιο, μόλυβδος, υδράργυρος, νικέλιο, άργυρος, χρυσός, χρώμιο, ψευδάργυρος και χαλκός. Τα πολύτιμα μέταλλα (άργυρος, χρυσός) ανακτώνται από τα υγρά απόβλητα λόγω της τιμής τους και έτσι δεν είναι πρακτικά ρύποι. Θεωρούνται τοξικά όσα μέταλλα έχουν δυσμενή επίδραση στους οργανισμούς ακόμη και όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η κυριότερη πηγή μετάλλων στο περιβάλλον είναι το έδαφος της γης όπου βρίσκονται όλα σχεδόν τα μέταλλα και τα οποία με διάφορους γεωχημικούς κύκλους και ανθρωπογενείς επεμβάσεις ανακατανέμονται στα διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα. Η βιομηχανική, τεχνολογική και γεωργική δραστηριότητα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες ρύπανσης από μέταλλα, από την απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων, μεταλλευτικές εκμεταλλεύσεις, εμπλουτισμό και παραγωγή μεταλλικών αντικειμένων, χρήση λιπασμάτων, κλπ. Η καύση στερεών καυσίμων είναι μία άλλη πηγή εκπομπής μετάλλων στην ατμόσφαιρα που τελικά εναποτίθενται στο έδαφος και τα νερά.

Τα μέταλλα δεν αφομοιώνονται, λόγω αδυναμίας των οργανισμών να τα «αναγνωρίσουν», ούτε όμως αποβάλλονται από το σύστημα των οργανισμών, κατά συνέπεια συσσωρεύονται και μάλιστα εκλεκτικά σε ορισμένους ιστούς (συκώτι, νεφρά) εμφανίζοντας έτσι υψηλές συγκεντρώσεις. Οι κυριότερες δράσεις τους είναι και καρκινογόνες. Η καρκινογόνος δράση των μετάλλων έχει μελετηθεί με μεγάλο αριθμό τοξικολογικών ερευνών και έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός της άμεσης προσθήκης σε κυτταρικό DNA (που προκαλεί μεταλλάξεις) είναι δευτερεύουσας σημασίας, σε σχέση με τη δράση μέσω οξειδωτικών βλαβών στο DNA που προκαλούνται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στον πίνακα 2 δίνονται τα όρια τοξικότητας των μετάλλων στη θάλασσα ενώ στον πίνακα 3 οι βιομηχανικές πηγές απόθεσης των μετάλλων στο περιβάλλον.

Μέταλλο	mg/l στη θάλασσα	Μέταλλο	mg/l στη θάλασσα
Mg	1.35×10^3	Cu	0.003
Ca	400	U	0.003
K	380	Mn	0.002
Sr	8.10	Co	2.7×10^{-4}
Li	0.18	Cd	1.1×10^{-4}
Al	0.01	Cr	5×10^{-5}
Fe	0.01	Hg	3×10^{-5}
Zn	0.01	Pb	3×10^{-5}
Ni	0.0054		

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Μέταλλο ενδιαφέροντος	Βιομηχανική δραστηριότητα
Αρσενικό	Χρωστικές και χρώματα, εντομοκτόνα/ζιζανιοκτόνα, μεταλλουργική επεξεργασία μετάλλων, γυαλί και κεραμικά, βυρσοδεψία
Χρώμιο και ενώσεις του	Ανοδίωση, τσιμέντο, χρωστικές, χρώματα, επιμεταλλώσεις, βυρσοδεψία
Κοβάλτιο και ενώσεις του	Καταλύτες, ίνες, χρώματα, χαρτί και χαρτοπολτός
Χαλκός και ενώσεις του	Επιμεταλλώσεις, ηλεκτρικά/ηλεκτρονικά, επεξεργασία επιφανειών, εντομοκτόνα, απόσταξη άνθρακα, οξειδωση κυανιούχων, πλαστικά
Σίδηρος και ενώσεις του	Αλουμίνιο, επιμεταλλώσεις, χρωστικές, ηλεκτρονικά, διοξείδιο του τιτανίου
Μόλυβδος και ενώσεις του	Μπαταρίες, τυπογραφία, εξάτμιση αυτοκινήτων, εκρηκτικά, πυροτεχνήματα, εντομοκτόνα, χρώματα, διυλιστήρια, πετροχημικά
Μαγγάνιο και ενώσεις του	Καταλύτες, μπαταρίες, γυαλί, χρώματα, πυροτεχνήματα
Υδράργυρος: οργανικός	Βακτηριακή δραστηριότητα από ανόργανο, εντομοκτόνα
Υδράργυρος: ανόργανος	Ηλεκτρικά/ηλεκτρονικά, εντομοκτόνα, μπαταρίες, φωτογραφικά, επιστημονικά όργανα, χλωράλκαλι, χρώματα, φαρμακευτικά, χαρτί /χαρτοπολτός, καταλύτες, τσιμέντο, καύση άνθρακα/πετρελαίου
Κασσίτερος και ενώσεις	Επιμεταλλώσεις
Ψευδάργυρος και ενώσεις	Συνθετικές ίνες, επιμεταλλώσεις, χαρτί/χαρτοπολτός, επεξεργασία ελαστικού
Βηρύλλιο και ενώσεις του	Πυρηνική βιομηχανία, σιδηρούχα και μη κράματα αεροναυπηγικής
Νικέλιο και ενώσεις του	Επιμεταλλώσεις, συσσωρευτές, καταλύτες
Κάδμιο και ενώσεις του	Χρωστικές, χρώματα, επιμεταλλώσεις, πολυμερή

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

1.7. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

1.7.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως βιοδείκτες ορίζονται μετρήσιμες ουσίες σε ένα βιολογικό σύστημα που οι διαφορές στην συγκέντρωσή τους αντανακλούν διαταραχές στην φυσιολογική λειτουργία του συστήματος. Δίνουν ακόμη απάντηση για τις ενδεχόμενες επιδράσεις ευεργετικές ή μη ενός φαρμάκου ή μιας θεραπευτικής αγωγής σε συγκεκριμένους ασθενείς, ώστε οι γιατροί να γνωρίζουν εκ των προτέρων πριν προχωρήσουν σε χορήγηση της όποιας θεραπείας. Στον τομέα της ιατρικής, βιοδείκτες όπως κύτταρα, πρωτεΐνες, γονίδια και άλλα εξυπηρετούν στη διάγνωση συγκεκριμένων νοσημάτων. Οι εξετάσεις για βιοδείκτες μπορούν να βοηθήσουν τους ιατρούς να μάθουν περισσότερα σχετικά με τη νόσο του ασθενούς, για παράδειγμα, εάν ο ασθενής πάσχει από ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνου ή εάν διατρέχει μεγαλύτερο κίνδυνο να υποστεί ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στην ιατρική διάγνωση, οι βιοδείκτες εξυπηρετούν επίσης στην ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων, οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να ευθύνονται για την ανάπτυξη συγκεκριμένων νοσημάτων. Αν και είναι τόσο σημαντική η εξέταση των βιοδεικτών το ένα τρίτο των ασθενών με καρκίνο στην Ελλάδα δεν διενεργούν αυτή την απαραίτητη εξέταση βιοδείκτη εξαιτίας της απουσίας ασφαλιστικής κάλυψης. Και παρά την αναγνωρισμένη δυνατότητα εξοικονόμησης πόρων και τα οφέλη για τους ασθενείς που μπορεί η εξέταση αυτή να επιφέρει, τα ασφαλιστικά ταμεία δεν φαίνεται να κατανοούν πως μακροπρόθεσμα θα ωφεληθούν σημαντικά από ίσως περιττές και ανούσιες για τους ασθενείς θεραπείες.

1.7.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Τι είναι όμως ακριβώς αυτό που μετράται τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά σε αυτές τις μελέτες; Ο καιρός που αρκούσε να υπολογίζουμε το ποσοστό ψαριών που πεθαίνουν έπειτα από έκθεση στον Χ παράγοντα έχει περάσει ανεπιστρεπτί, όσον αφορά την έρευνα. Παραμένει ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για ρυθμιστικούς και νομικούς σκοπούς (για παράδειγμα, χορήγηση αδειών σε χημικά και φαρμακευτικά σκευάσματα και χαρακτηρισμός τους), εντούτοις άλλοι, πιο εξευγενισμένοι και λιγότερο τελεολογικοί δείκτες από τον θάνατο, έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται [151]. Οι δείκτες αυτοί, επονομαζόμενοι βιοδείκτες, ξεκίνησαν να αναπτύσσονται την δεκαετία του 1980 και μέχρι και σήμερα γνωρίζουν συνεχή άνθηση και εμπλουτισμό.

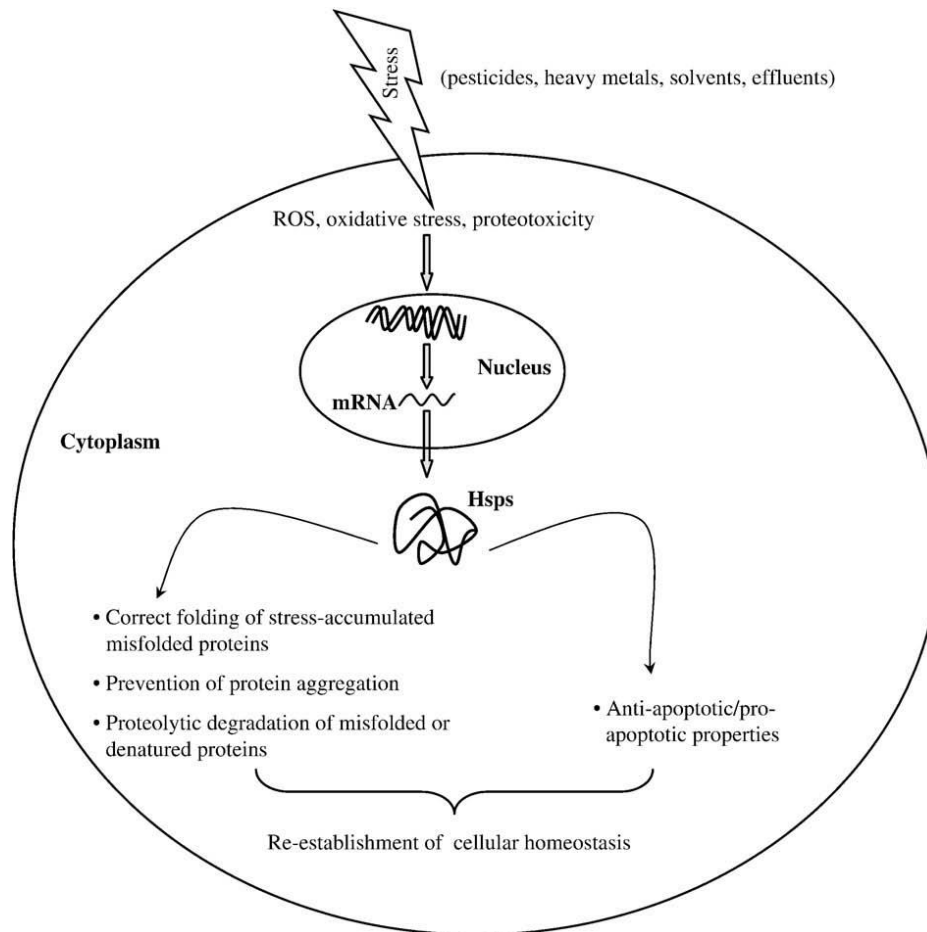
Κατά βάση, οποιαδήποτε απτή και μετρήσιμη βιοχημική ή φυσιολογική αλλαγή σε κύτταρα, εκκρίσεις ή ιστούς, η οποία υποδεικνύει παρουσία ρυπαντών στον οργανισμό ή αντισταθμιστική αντίδραση του οργανισμού, μπορεί να θεωρηθεί εν δυνάμει βιοδείκτης [150]. Οι βιοδείκτες μπορεί να αναφέρονται σε υποκυτταρικό επίπεδο και να μελετούν αλλαγές σε μικροσκοπικά οργανίδια του κυττάρου που δεν φαίνονται με γυμνό μάτι ή μπορεί να μελετούν διεξοδικά τις επιδράσεις του εκάστοτε ρυπαντή σε επίπεδο οργάνου (νέκρωση ή τραυματισμός ιστού, ανατομική ή φυσιολογική δυσλειτουργία οργάνου) ή ακόμα και οργανισμού ως συνολικής μονάδας, ανάλογα με το εάν η ευαισθησία του σε συνηθισμένες λοιμώξεις έχει αυξηθεί, εάν έχει αλλάξει η αναπαραγωγική του κατάσταση και το προσδόκιμο επιβίωσής τους και άλλα πολλά. Οι βιοδείκτες μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω τρεις βασικές κατηγορίες κυρίως για πρακτικούς σκοπούς. Έτσι μπορεί να έχουμε:

- **Βιοδείκτες έκθεσης** οι οποίοι μετρούν κατά πόσον ο οργανισμός έχει εκτεθεί σε κάποιο (ορισμένο) ξеноβιοτικό. Οι δείκτες αυτοί μπορούν να αφορούν σε μέτρηση συγκεκριμένων μεταβολικών ή συμπλόκων μεταβολικών με κυτταρικά οργανίδια.
- **Βιοδείκτες επίδρασης** οι οποίοι μετρούν τα πρώιμα αποτελέσματα της έκθεσης, τα οποία ίσως και ταυτόχρονα να αποτελούν και τα πρώτα βήματα στην διαδικασία τοξικότητας, ασθένειας ή καρκινογένεσης που πιθανόν θα ακολουθήσει.
- **Βιοδείκτες ευαισθησίας**, οι οποίοι μετρούν τους παράγοντες εκείνους που καθιστούν ορισμένα άτομα ή πληθυσμούς πιο ευαίσθητους στις βλαβερές επιδράσεις των ξеноβιοτικών από άλλους. Οι βιοδείκτες αυτοί μπορεί να μετρούν διαφορές στους προστατευτικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα στην δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων ή ενζύμων επιδιόρθωσης DNA.

1.8 Κυτταρική απόκριση στο στρες: πώς οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στο άγχος;

Το άγχος μπορεί να οριστεί ως μια φυσιολογική διαταραχή που μπορεί να συσχετιστεί με διάφορες ανωμαλίες. Ο όρος στρες χρησιμοποιήθηκε αρχικά στο πλαίσιο αυτό από τον φυσιολόγο Hans Selye, ο οποίος διαπίστωσε ότι οι άνθρωποι και τα ζώα μοιράζονται ένα συγκεκριμένο και σταθερό πρότυπο φυσιολογικών απαντήσεων σε ασθένεια ή τραυματισμό. Αυτές οι απαντήσεις περιλαμβάνουν την προσπάθεια του οργανισμού μας να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις που επιβάλλονται από τη διαδικασία ασθένειας ή τραυματισμού. Λόγω των διαφόρων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, αρκετές χιλιάδες ενώσεις απελευθερώνονται στο φυσικό περιβάλλον. Έτσι, οι οργανισμοί σε όλα τα βασίλεια αντιμετωπίζουν συνεχώς γεγονότα που προκαλούν οξεία και χρόνια στρες. Αυτές οι ασθένειες και οι χρόνιες καταπονήσεις είναι ικανές να προκαλέσουν επιβλαβή επίδραση στην κυτταρική υποδομή και να διαταράξουν την κυτταρική ομοιόσταση. Συνεπώς, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει την ικανότητα να εκκινούν έναν αριθμό προσαρμοστικών οδών απόκρισης στο κυτταρικό στρες μέσω των οποίων προσπαθούν να μειώσουν τη βλάβη και να διατηρήσουν ή να αποκαταστήσουν την κυτταρική ομοιόσταση. Οι οδοί απόκρισης κυτταρικού στρες είναι εξαιρετικά διατηρημένες μεταξύ 10:32 πμ τους συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, και παίζουν κεντρικό ρόλο στην αντιμετώπιση περιβαλλοντικών προσβολών. Οι διαφορετικοί παράγοντες άγχους μπορούν να διεγείρουν μονοπάτια απόκρισης λόγω στρες με στόχευση συγκεκριμένων γονιδίων (Σχήμα 1). Μεταξύ των διαφόρων οδών απόκρισης του στρες, η απόκριση θερμικού σοκ είναι μία από τις σημαντικότερες οδούς [152] που χαρακτηρίζονται από διακοπτόμενη σύνθεση των περισσότερων πρωτεϊνών για να ξεκινήσει η σύνθεση μιας ξεχωριστής σειράς πρωτεϊνών θερμικού σοκ.





Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της επαγωγής Hsp υπό συνθήκες περιβαλλοντικού στρες. Η έκθεση των στρεσογόνων παραγόντων στους ζωντανούς οργανισμούς προκαλεί οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ROS και την επαγωγή της πρωτεοτοξικότητας. Οι νέες συνθετικές πρωτεΐνες στρες κάτω από τέτοιες συνθήκες μπορούν να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιότητα προάγοντας τη σωστή αναδίπλωση συσσωρευμένων με άγχος πρωτεϊνών, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και προωθώντας πρωτεολυτική αποικοδόμηση λανθασμένων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Οι Hsps μπορεί επίσης να παίξουν προ-αποπτωτική ή αντι-αποπτωτική λειτουργία αλληλεπιδρώντας με διάφορες πρωτεΐνες οδού απόπτωσης, τόσο υπέρ όσο και κατά των μιτοχονδριακών συμβάντων.

1.9. Παρακολούθηση των ανθρώπινων πληθυσμών για πρώιμους δείκτες της τοξικότητας του καδμίου

Η έκθεση των ανθρώπινων πληθυσμών σε κάδμιο (Cd) από τον αέρα, τα τρόφιμα και το νερό μπορεί να επηρεάσει όργανα όπως τα νεφρά, το ήπαρ, τους πνεύμονες, το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα. Από όταν το Cd έχει αναγνωριστεί ως καρκινογόνο για τον άνθρωπο, οι βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωση της ευαισθησίας στον καρκίνο έχουν τεράστια σημασία για τη δημόσια υγεία. Η ικανότητα να ταυτοποιήσουμε την έκθεση σε Cd και την πρόσληψη αυτού του στοιχείου, μέσω βιολογικής παρακολούθησης είναι ένα πρώτο βήμα προς την κατανόηση των

επιπτώσεων στην υγεία. Η ερμηνεία και εφαρμογή των βιολογικών δεδομένων παρακολούθησης για την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων της ανθρώπινης υγείας απαιτούν συσχέτιση με βιολογικές μετρήσεις των απαντήσεων του οργανικού συστήματος στην εκάστοτε έκθεση. Καθοριστικό βήμα για αυτή την κατανόηση είναι η ανίχνευση και η σύνδεση των πρόωρων βιολογικών αποκρίσεων τοξικών επιδράσεων σε πληθυσμούς κύτταρου-στόχου. Ευτυχώς, η πρόοδος στην κυτταρική βιολογία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη των προ-κλινικών βιολογικών δεικτών (βιοδείκτες), οι οποίοι επιδεικνύουν μετρήσιμες και χαρακτηριστικές μοριακές αλλαγές στα οργανικά συστήματα ακολουθώντας χημικές εκθέσεις που συμβαίνουν πριν από την εμφάνιση φανεράς κλινικής νόσου ή την ανάπτυξη του καρκίνου. Η πρόοδος της τεχνολογίας έχει καταστήσει μια σειρά από αυτούς τους βιοδείκτες πρακτικούς για την παρακολούθηση Cd-εκτεθειμένων ανθρωπίνων πληθυσμών.

Οι βιοδείκτες θα είναι ολοένα και πιο σημαντικοί σε σχέση με την παρακολούθηση των επιπτώσεων από την έκθεση σε νέα βασισμένα σε κάδμιο υψηλής τεχνολογίας υλικά. Για παράδειγμα, το κάδμιο, το σελήνιο (Cd Se), νάνο-υλικά κατασκευασμένα από συνδυασμούς αυτών των στοιχείων έχουν μεταβληθεί σημαντικά κυτταρικά χαρακτηριστικά πρόσληψης εξαιτίας του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτές οι διαφορές, μπορεί να προκαλέσουν σημαντικά αποτελέσματα σε επίπεδο κυττάρου στόχου και ως εκ τούτου υπάρχει κίνδυνος για την τοξικότητα στα όργανα από τέτοια ανοίγματα. Η αξία των επικυρωμένων βιοδεικτών για την έγκαιρη ανίχνευση των συστημικών Cd που προκαλείται επιπτώσεις στον άνθρωπο δεν μπορεί να υποτιμηθεί λόγω της ταχείας επέκτασης των τεχνολογιών νάνο-υλικών. Η αναθεώρηση αυτή θα επιχειρήσει να συνοψίσει τις εφαρμογές, μέχρι σήμερα, των τελικών βιοδεικτών για την αξιολόγηση των επιδράσεων στα όργανα στόχους, σε ανθρώπινα συστήματα και σε πειραματικά συστήματα από την έκθεση σε Cd. Περαιτέρω, θα προσπαθήσει να παράσχει μια ματιά προς το μέλλον των βιοδεικτών.

2. ΟΙ HSP70 ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

2.1. Εισαγωγή

Η έκρηξη του ανθρώπινου πληθυσμού έχει οδηγήσει σε μια εποχή γρήγορης και βαριάς εκβιομηχάνισης που απειλεί τη ζωή σε σχεδόν όλους τους πιθανούς βιοτόπους. Το περιβάλλον μολύνεται ολοένα και περισσότερο από την προσθήκη μεγάλου αριθμού βαρέων μετάλλων, χημικών ουσιών και ακτινοβολίας, τα οποία είναι επικίνδυνα όχι μόνο για τα ανθρώπινα αλλά και για τα άλλα έμβια όντα. Υπό τις συνθήκες αυτές, οι βιολόγοι παίζουν κεντρικό ρόλο στη δημιουργία συνειδητοποίησης σχετικά με τις επιπτώσεις των επικίνδυνων υλικών σε άλλα ζητήματα για την αποκατάσταση και διατήρηση ενός υγιούς περιβάλλοντος. Επομένως, ένας βασικός τομέας εστίασης είναι η χρήση βιολογικών σημάτων ως δεικτών βιοχημικών αλλαγών, παρέχοντας έγκαιρη προειδοποίηση για τον περιβαλλοντικό κίνδυνο και την εκτίμησή του. Ως εκ τούτου, οι βιοχημικοί δείκτες ελέγχουν συχνά παράλληλες αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος. Η χρήση των βιοδεικτών ως μέτρο "ντετέκτιβ" μπορεί να επιτρέψει την υιοθέτηση ορισμένων έγκαιρων προληπτικών μέτρων για την αποφυγή ορισμένων κινδύνων. Για να επιτευχθούν αυτοί οι στόχοι, ορισμένες έρευνες έχουν προτείνει τη σύνδεση γονιδίων στρες, όπως οι HSP70, με ένα γονίδιο αναφοράς για καλλιεργούμενη βλάστηση που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να καταστεί δυνατή η χρήση δορυφορικών εικόνων ώστε να εκτιμηθεί η κατάσταση της καλλιέργειας για την περιβαλλοντική υγεία. Επιπλέον, αυτοί οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την καλύτερη κατανόηση των δεσμών που υπάρχουν μεταξύ της περιβαλλοντικής ποιότητας, των αλυσίδων των τροφίμων και της ανθρώπινης υγείας [1].

Μέχρι σήμερα, διάφοροι βιοδείκτες που προτείνονται για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Οι βιοδείκτες που παρουσιάζονται στον πίνακα 3 θεωρούνται σημαντικά εργαλεία για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση της έκθεσης, των επιδράσεων ή της ευαισθησίας σε άτομα ενός πληθυσμού υπό δυσμενείς συνθήκες. Συνεπώς, η επιλογή του βιοδείκτη θα πρέπει να βασίζεται κατά κύριο λόγο στην ικανότητα ενός βιοδείκτη να είναι επαρκώς ευαίσθητος για να παρέχει μια ακριβή μέτρηση σε ένα δείγμα.

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (HSPs) παράγονται ειδικά όταν τα κύτταρα εκτίθενται για μια στιγμή σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τις κανονικές τους απαιτήσεις ανάπτυξης. Η σύνθεση των HSPs είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο σε όλα τα φυτικά και ζωικά είδη που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Επειδή οι HSPs μπορούν επίσης να προκληθούν από οξειδωτικά, τοξίνες, βαρέα μέταλλα, ελεύθερες ρίζες, ιούς και άλλους παράγοντες άγχους, καλούνται μερικές φορές και οι «πρωτεΐνες στρες» [2]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ανακαλύφθηκαν αρχικά το 1962 σε προνύμφες *Drosophila melanogaster* σε απόκριση θερμικού σοκ [3] και ο όρος "πρωτεΐνη θερμικού σοκ" επινοήθηκε από τους Tissieres et al. [4]. Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας παρουσιάζουν χαρακτηριστικές διακυμάνσεις στην έκφρασή τους στους περισσότερους οργανισμούς κάτω από ένα εύρος θερμοκρασιών [5, 6], βαρέα μέταλλα [7-10], χημικές ουσίες [11-14], ακτινοβολίες [15-19], μεταβολίτες και ορμόνες [20-24], κλινικές καταστάσεις [16, 25-30] ή παθογόνα που μπορεί να είναι πάνω ή πέρα από τα βέλτιστα όριά τους [31-34], και φάρμακα [35-37].

Biomarkers proposed for environmental risk assessment.

Name of biomarker	Reference
Esterases	[130]
Polytene chromosomes of chironomids (Diptera)	[131]
HSP60, HSP70, alpha B-crystallin homologue, lipid peroxide, total glutathione level, ubiquitin, mitochondrial manganese superoxide dismutase, metallothionein, and cytochrome P450 2E homologue	[93, 122, 123]
Numbers of macrophages in liver tissue, changes in various blood parameters	[105]
Histological and ultrastructural markers, lysosomal membrane stability of coelomocytes, histidine	[51, 132]
Catalase activity	[78]
Metabonomics analysis using NMR techniques	[133]
P-glycoprotein, major vault protein, topoisomerase-II	[103]
Acetylcholinesterase inhibition and imposex	[134]
Digestive enzymes, glycolytic enzymes, and cellular energy allocation	[124]
Apoptosis in marine sponges and spiders	[135, 136]

Πίνακας 4

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι παρούσες σε όλους τους ζώντες οργανισμούς και ταξινομούνται συνήθως ως διαφορετικές οικογένειες σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος - HSP27, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 και HSP110. Αυτές οι οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους στις φυσιολογικές διεργασίες όπως η δραστηριότητα συσσώρευσης πρωτεϊνών, η προστασία από την απόπτωση, η στεροειδογένεση και η αντοχή στο στρες. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, ειδικά οι HSP70 και HSP60, έχουν επίσης προταθεί ως βιοδείκτες επιπέδων έκθεσης και τοξικότητας. Η υποψηφιότητά τους ως βιοδεικτών βασίζεται σε πολλές παρατηρήσεις που δείχνουν ότι η επαγωγή HSP60 σε ορισμένους οργανισμούς (π.χ. μυδιών *Mytilus edulis* και νηματώδους *Plectus acuminatus*) έχει ως αποτέλεσμα μια ευαίσθητη απόκριση σε αρκετές φορές από τη χρήση άλλων συγκρίσιμων παραμέτρων, όπως η ποσοτικοποίηση των δυσμενών επιδράσεων στη βιομάζα ή την αναπαραγωγή [38, 39]. Μια τέτοια παρατήρηση σε μύδια (*M. edulis*) οδήγησε στη σύστασή τους ως ένας από τους πλέον κατάλληλους οργανισμούς για τη βιολογική παρακολούθηση των υδρόβιων οικοσυστημάτων.

Ο ρόλος των HSP70 ως βιοδείκτη είναι πολύ επίκαιρος. Ορισμένες μελέτες έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Μερικοί δείχνουν υψηλή ευαισθησία HSP70 σε ρύπους, ενώ άλλοι δείχνουν διαφορετικά. Το συγκεκριμένο ζήτημα σε πολλές τέτοιες μελέτες φαίνεται να είναι η χρήση ποικίλων συγκεντρώσεων έκθεσης τοξικότητας. Ορισμένοι συγγραφείς έχουν χρησιμοποιήσει ρεαλιστικά χαμηλές συγκεντρώσεις, μερικοί έχουν χρησιμοποιήσει υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά μόνο πολύ λίγα δοκιμασμένα μοντέλα έκθεσης σε μολυσμένο πραγματικό κόσμο. Επιπλέον, οι υπάρχουσες επικυρωμένες βιολογικές δοκιμασίες, βασισμένες κυρίως στη θνησιμότητα ή την αναπαραγωγή, έχουν κάπως περιορισμένη δυνατότητα εφαρμογής εξαιτίας της ακατέργαστης ευαισθησίας, της μακράς

έκθεσής τους ή των συνολικών δαπανών της δοκιμής. Αντίθετα, οι μεταβολές σε βιοχημικό επίπεδο είναι συνήθως η πρώτη ανιχνεύσιμη απάντηση στην περιβαλλοντική διαταραχή. Συνεπώς, η ανάλυση των μεταβολών που προκαλούνται από τοξικότητα στην έκφραση γονιδίων (δηλ. Μεταβολές στα πρότυπα πρωτεϊνικής σύνθεσης) και η προκύπτουσα κυτταρική βλάβη μπορεί να είναι πολύ χρήσιμοι παράγοντες για να θεωρηθούν ως βιοδείκτες έκθεσης τοξικότητας. Καθώς οι αλλαγές αυτές υπογραμμίζουν όλες τις επιδράσεις σε ανώτερο οργανωτικό επίπεδο, ως εκ τούτου θεωρούνται ιδιαίτερα ευαίσθητοι δείκτες τοξικότητας.

2.2. HSPs ως βιοδείκτης σύμφωνα με το περιβάλλον.

2.2.1. Υδάτινο περιβάλλον.

Η πρώτη ευνοϊκή έκθεση σχετικά με τη χρήση των HSPs ως τοξικολογικού δείκτη προέκυψε από τη μελέτη των Cochrane et al. [40]. Αναφέρθηκε ότι η έκθεση του ζωοπλαγκτόν σε υπολείμματα δόσης CuSO₄ είχε ως αποτέλεσμα 4-5 φορές αύξηση των HSP58, με τη μέγιστη αύξηση να εμφανίζεται σε περίπου 5% της LC50 για το είδος. Μία παρόμοια απόκριση παρατηρήθηκε με τριβουτυλοκασσίτερο. Η κινητική της επαγωγής ήταν σιγμοειδής με επαγωγή που έλαβε χώρα στο εύρος 20-30 μg / L. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε απόκριση όταν εκτελέστηκε σε Al, Hg, Zn, αρσενικό νάτριο, αζίδιο του νατρίου, δωδεκυλοθειικό νάτριο ή πενταχλωροφαινόλη. Προτάθηκε ωστόσο, ότι η αφθονία του HSP58 μπορεί να λειτουργήσει ως βιοδείκτης έκθεσης τοξικότητας. Ορισμένες μελέτες που διεξήχθησαν σε μαλάκια, κυρίως σε μύδια, όπως για παράδειγμα των Sanders και Martin [41], ανέφεραν αυξημένα επίπεδα HSP60 και HSP70 σε μύδια και ιστό ψαριών που συλλέχθηκαν από μολυσμένες περιοχές. Η συλλογή δεδομένων σχετικά με τη χημεία των ιζημάτων και των υδάτων από τα σημεία δειγματοληψίας και τα φορτία των μολυσματικών σωμάτων έδειξε ότι η έκθεση τους σε μολυσματικούς παράγοντες ήταν μακροχρόνια. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η συσσώρευση HSP μπορεί να παρέχει μια μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των δυσμενών βιολογικών επιπτώσεων της έκθεσης σε τοξικά συστατικά όταν εξετάζονται άγριοι πληθυσμοί από μολυσμένες θέσεις. Ομοίως, μια άλλη μελέτη που διεξήχθη από τους [42] απεικόνισε στατιστικά ασήμαντες διαφορές στα συνολικά επίπεδα ενεργότητας κυτοχρώματος P450 και βενζο (α) πυρενικής υδροξυλάσης και προκάλεσαν σημαντικά τις HSP70 που συσχετίστηκε με τις ποσότητες των PAH που συσσωρεύτηκαν στα μυκήλια *Mytilus galloprovincialis* (συλλεγμένα από θέσεις μολυσμένες με αλειφατικούς και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες -PAH). Και πάλι, προτάθηκε ότι η HSP70 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στο *Mytilus galloprovincialis* ενάντια στην τοξικότητα. Μια άλλη μελέτη στα μαλάκια θεωρεί τις HSP70 ως βιολογικούς δείκτες (σε βράγχια, μανδύα και πεπτικό αδένα) και ο λόγος επιβίωσης του *Macoma nasuta* (οστρακοειδής) ως απάντηση στα βαρέα μέταλλα (Ni, Cr, Cu) και ίχνη οργανικών ρύπων από οργανικά χλωριούχα παρασιτοκτόνα και DDT και οι μεταβολίτες της DDD και DDE).

Οι αναλύσεις συσχέτισης μεταξύ Pearson και Spearman αποκάλυψαν ότι η θνησιμότητα και η HSP70 σε βράγχια συσχετίστηκαν σημαντικά με τις συγκεντρώσεις ιστού DDT και / ή των μεταβολιτών του [43]. Οι Schrodter et al., [44] επικύρωσαν την ηπατική HSP70 ως πιθανό βιοδείκτη απόκρισης κυτταρικού στρες στα ψάρια *Limanda* στο στάδιο της αναπαραγωγής 2. Παρατηρήθηκαν ποικίλα επίπεδα HSP70 (αποτελούμενα από δύο μορφές 75 και 73 kDa) μεταξύ δειγμάτων σε διαφορετικές θέσεις της Βόρειας Θάλασσας (Γερμανία) αλλά κάθε ένα συσχετίστηκε με την ένταση της βλάβης του DNA (σπασίματα μονής

έλικας και αλκαλικές ασταθείς θέσεις). Προτάθηκε ότι η *L. limanda* θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένα χρήσιμο εργαλείο και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ως ένας χρήσιμος βιοδείκτης για την παρακολούθηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Η επιδερμίδα των ψαριών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, καθώς είναι η διασύνδεση μεταξύ των ψαριών και του υδάτινου περιβάλλοντος. Οι Heresztyn και Nicholson [45] διερεύνησαν τη χρήση του HSP70 ως μέτρο της υποξαιμίας οικοτοξικότητας σε καλλιεργημένα επιδερμικά κύτταρα δέρματος της ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* που εκτίθενται σε χημικό στρες (2,4-διχλωροανιλίνη). Παρατηρήθηκε αύξηση εξαρτώμενη από τη θετική τοξική συγκέντρωση στις συγκεντρώσεις HSP70 (ποσοτικοποιημένες με ανοσοκυτταροχημεία). Εκτός από τα επιδερμικά κύτταρα του δέρματος, τα ερυθροκύτταρα ορισμένων ψαριών (π.χ. *Sparus sarba*) έχουν την ικανότητα να συνθέτουν HSPs λόγω της παρουσίας ενός πυρήνα και ως εκ τούτου θεωρούνται ενδιαφέροντα κυτταρικά μοντέλα για *in vitro* τοξικολογικές μελέτες. Σε μια τέτοια μελέτη, η έκθεση τους σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις Cd, Pb ή Cr-VI τόσο χαμηλές όσο 0,1 μM (τιμή που αντιπροσωπεύει συγκέντρωση *in vitro*) για 1 έως 2 ώρες έχει δείξει σημαντική υπερέκφραση HSP70 [46]. Οι Guizani et al., [47] παρείχε επίσης ευνοϊκά στοιχεία για την υποστήριξη λειτουργίας των HSP70 ως βιοδείκτες περιβαλλοντικού στρες.

Εκτός από το ζωοπλαγκτόν, τα μαλάκια και τα ψάρια, ορισμένοι συγγραφείς διερεύνησαν τις δυνατότητες των HSP70 ως βιοδείκτη στρες στα φύκια και σε άλλα φυτά. Για παράδειγμα, οι Bierkens et al., [48] υποδεικνύουν ότι οι HSP70 στο φύκι *R. subcapitata* είναι ένας ευαίσθητος βιοδείκτης, καθώς εμφάνισε μια εξαρτώμενη από τη δόση αύξηση σε απόκριση σε ένα ευρύ φάσμα ρύπων (ZnCl₂, SeO₂, lindane, carbaryl και SDS-αλλά όχι σε πενταχλωροφαινόλη) σε συγκεντρώσεις κάτω από το εύρος της κλασσικής κυτταροτοξικότητας (δηλαδή αναστολή της ανάπτυξης, θνησιμότητα). Ωστόσο, οι ZnCl₂ και SeO₂ βρέθηκαν να είναι οι ισχυρότεροι επαγωγείς του HSP70. Σε μια άλλη μελέτη, οι Ireland et al. [49] ανέφεραν αυξημένες συγκεντρώσεις του HSP70 σε οδοντωτή φουρκέτα *Fucus serratus* και σε κοινές λυγαριές *Lemna minor* που εκτέθηκαν για 24 ώρες σε ωσμωτικές και καδμίου πιέσεις. Και στις δύο τάσεις, η παραγωγή του HSP70 αυξήθηκε στο μέγιστο και στη συνέχεια μειώθηκε καθώς αυξήθηκαν τα επίπεδα του στρες. Υποστήριξαν ότι η HSP70, δοκιμασμένη με έμμεση ανταγωνιστική ανοσοπροσοφητική δοκιμασία συνδεδεμένη με ένζυμα, θα μπορούσε ενδεχομένως να εφαρμοστεί για την ανίχνευση στρες σε αυτά τα υδρόβια είδη. Εκτός από την HSP70, η απόκριση βιοδεικτών MitosHSP σε θερμότητα, ChIsHSP σε H₂O₂ και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Mn-SOD και Fe-SOD) και HSP60 για θέρμανση, H₂O₂ και Pb στο διφωσφορικό *Karenia brevis* έχει επίσης αναφερθεί από τους Miller-Morey και Van Dolah [50].

2.2.2. Επίγειο Περιβάλλον.

Διάφορες μελέτες υποστήριξαν επίσης τη χρήση των HSPs ως βιοδείκτες στην παρακολούθηση της ρύπανσης του εδάφους. Σε αυτό το πλαίσιο, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στα ασπόνδυλα του εδάφους, ιδιαίτερα το *Plectus acuminatus* (νηματώδη), το *Lumbricus terrestris* (γαιοσκώληκας) και τα γαστερόποδα (μαλάκια) με έμφαση στην HSP70 και / ή στην HSP60 ως βιοδείκτη τοξικότητας. Για παράδειγμα, οι Kammenega et al., [39], ανέφεραν την επαγωγή του HSP60 που σχετίζεται με αυξημένες συγκεντρώσεις Cu και Cd (4-400 $\mu\text{g} / \text{L}$ και 7-700 $\mu\text{g} / \text{L}$, αντίστοιχα). Για τον χαλκό, η επαγωγή του HSP60 ήταν τριών τάξεων μεγέθους πιο ευαίσθητη από ότι η EC20 για αναπαραγωγή. Για το κάδμιο, η επαγωγή HSP60 ήταν μία τάξη μεγέθους πιο ευαίσθητη. Τα αποτελέσματά τους επεσήμαναν ότι η επαγωγή HSP60 εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις ρεαλιστικές για την κατάσταση του πεδίου (2 έως 4,8 $\mu\text{g} \text{Cu}$ για αργιλώδη άμμο και αργιλώδη εδάφη). Ως εκ τούτου, η HSP60 προτάθηκε να είναι κατάλληλη ως πιθανός βιοδείκτης για το τοξικό στρες στο *P. Acuminatus*. Περίπου δύο χρόνια αργότερα, παρουσίασαν μια ανασκόπηση των δυνατοτήτων και των περιορισμών των βιοσπορίων των ασπόνδυλων (συμπεριλαμβανομένων των HSPs, μεταλλοθειονών και πρωτεϊνών που δεσμεύουν το μέταλλο, εστεράσες, ιστολογικοί και υπερδομικοί δείκτες, και λυσοσωμική ακεραιότητα). Συμπέραναν ότι η απόκριση HSP στα ασπόνδυλα του εδάφους ήταν ιδιαίτερα κατάλληλη για να δείξει τα αποτελέσματα της έκθεσης σε συγκριτικά χαμηλές συγκεντρώσεις για μια σειρά τοξικών ουσιών και θα μπορούσε να θεωρηθεί ως βιοδείκτης γενικής τάσης [51]. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη πρότειναν ότι η απόκριση HSP60 στον νηματοειδή μόνη της δεν ήταν κατάλληλος βιοδείκτης για έντονα μολυσμένα εδάφη. Έχει ενδεικτική τιμή σχετιζόμενη με την απόκριση HSP70 στα ισόποδα (*Oniscus asellus* και *Porcellio scaber*) και θα μπορούσε να είναι ένας κατάλληλος βιοδείκτης για μετρίως μολυσμένα εδάφη. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις HSP70 σε μη διακριτά άτομα και των δύο ειδών αυτών θεωρούνται κατάλληλα για χρήση ως δυνητικοί βιοδείκτες για την παρακολούθηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης [52].

Οι Nadeau et al., [53] ανέφεραν ότι η ανάλυση HSP70 με ανοσοαποτύπωση Western σε εντερικούς ιστούς του *L. terrestris* ήταν μια κατάλληλη και ευαίσθητη βιοανάλυση για την εκτίμηση των δυσμενών επιδράσεων στους γαιοσκώληκες όταν εκτέθηκαν σε χημικά και βαρέα μέταλλα (χλωροακεταμίδιο, πενταχλωροφαινόλη, Pb, Cd, Cu και Hg για 1-16 ημέρες). Τα δεδομένα τους έδειξαν επίσης ένα καλό επίπεδο αναπαραγωγικότητας παρά ορισμένες μεμονωμένες παραλλαγές. Επιπλέον, πρότειναν ότι η χρήση ζώων από παρθένας συνθήκες που έχουν μεταφερθεί σε μολυσμένα περιβάλλοντα έχει μεγάλη οικολογική συνάφεια. Η επαγωγή του HSP70 σε γαιοσκώληκες θα πρέπει να αντιπροσωπεύει όχι μόνο έναν καλό βιοδείκτη ευρέος φάσματος έκθεσης αλλά επίσης έναν βιοδείκτη επιδράσεων τοξικότητας δεδομένου ότι γνωστά τοξικά στοιχεία αλλοίωσαν την έκφραση γονιδίου σε αυτά τα ζώα. Επομένως, τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν δεν είναι απλά ένα μέτρο συσσώρευσης της HSP. Η ανίχνευση του HSP70 σε γαιοσκώληκες θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για την παρουσία δυνητικά επιβλαβών παραγόντων σε εδάφη, ιδιαίτερα στο *L. terrestris* και γενόσημους γενικά, που ενεργούν ως δυνητικά ζώα ιχνηλασίας. Σε άλλες μελέτες, το HSP70 έχει επίσης προταθεί ως ευαίσθητος βιοδείκτης στα κολονοκύτταρα του γαιοσκώληκα *Eisenia fetida* εκτεθειμένο σε μέταλλα όπως Zn, Cu, Pb και Cd (σε συγκέντρωση 1,32 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ διηθητικού χαρτιού) [54] και στο McCoy τα κύτταρα εκτίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις Hg, Cd και CuCl_2 (0,7, 1 και 3 μM , αντίστοιχα) [55].

2.2.3. HSP στα διαγονιδιακά συστήματα.

Ορισμένοι συγγραφείς έχουν τονίσει τη χρήση των HSPs σε διαγονιδιακά κύτταρα και οργανισμούς για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου. Παραδείγματα περιλαμβάνουν επιμολυσμένα κύτταρα HeLa με λουσιφεράση πυγολαμπίδας που έχει την αλληλουχία υποκινητή HSP22 του *Drosophila melanogaster* για CdCl₂, Cd (NO₃)₂, NaAsO₂, alachlor, οξική φεντίνη, θειράμη και maneb σε περιοχή συγκέντρωσης 0.05-50 μM [56]. Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν τη χρήση διαγονιδιακής *Drosophila melanogaster* (HSP70-lacZ) για την ομάδα φθαλμιδίου των χημικών ουσιών, captan, captafol και folpet [57], για την κυπερμεθρίνη (0.002, 0.2, 0.5 και 50.0 ppm) η οποία περιείχε Cr, Zn, Fe, Ni, Mn, Pb και Cu [58,59]. Όμοια ενός σταθερού διαγονιδιακού ψαριού ζέβρα με σύστημα γονιδίου ανταποκριτή HSP70 / eGFP, όπου η έκφραση HSP70 ενεργοποιήθηκε με ειδικό τρόπο για τον ιστό μετά την έκθεση σε διάφορες τοξίνες, συμπεριλαμβανομένου του Cd, χρησίμευσε ως αξιόπιστος και εξαιρετικά γρήγορος δείκτης κυτταρικής τοξικότητας [60]. Σε διαγονιδιακό ψάρι ζέβρα, το γονίδιο ανταποκριτής κάτω από ανθρώπινο προαγωγό HSP70 έδειξε ευαισθησία για την ανίχνευση του CuSO₄ σε δόσεις όπως 1,2mM [61].

Έτσι, οι HSP70 έχουν συχνά επισημανθεί ως ένας ιδιαίτερα ευαίσθητος βιοδείκτης έκθεσης σε διάφορους ρύπους σε γαιοσκώληκες, μύδια, *Drosophila*, ορισμένα ψάρια, φύκη και μερικά υδρόβια φυτά. Αρκετές μελέτες το έχουν προτείνει ως βιοδείκτη άλλων ανεπιθύμητων ενεργειών. Τα ευρέως αποδεκτά μοντέλα, όπως η *Drosophila* που έγιναν διαγονιδιακά για διαφορετικά γονίδια στρες, δηλαδή τα HSP70, HSP83 και HSP26, επισημαίνονται με γονίδια ανταποκριτές όπως β-γαλακτοσιδάση ή GFP έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση κυτταρικής καταπόνησης που προκαλείται από περιβαλλοντικά χημικά ή τα μείγματα τους [62]. Οι σχεδιαζόμενες ανιχνεύσεις επέτρεψαν την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στρες μετά από έκθεση σε χημική ρύπανση, υποδεικνύοντας το μέγεθος της κυτταρικής τοξικότητας που προκαλείται από τις χημικές ουσίες [63-68]. Οι Nisamedtinov et al., [69] μελέτησαν την απόκριση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε διαφορετικές συνθήκες στρες που χρησιμοποιούν διαγονιδιακή τεχνολογία. Η ομάδα χρησιμοποίησε την κατασκευή πρωτεΐνης σύντηξης HSP12p-Gfp2p και κατέδειξε ότι η αφθονία του HSP12p κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες εξαρτιόταν από τον συγκεκριμένο παράγοντα άγχους. Μια ταχεία μετατόπιση των συντελεστών στρες έδωσε υψηλότερα ποσοστά σύνθεσης HSP12p σε σύγκριση με τις σταδιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες στρες. Παρομοίως, για τις μελέτες τοξικότητας της ανάπτυξης, τα διαγονιδιακά zebra fish για HSP70 ή HSP27 που επισημαίνονται με έναν ανταποκριτή GFP εκτέθηκαν σε βαρέα μέταλλα για να εξετάσουν την επίδραση των ξενοβιοτικών σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης [70].

2.3. Αντιφατικά αποδεικτικά στοιχεία

Ένας αριθμός ερευνητών έχουν επικρίνει τη χρήση των HSP70 ως βιοδείκτες. Οι Wieganta et al., [71], ανέφεραν, για παράδειγμα, ότι διάφοροι παράγοντες πίεσης (αρσενίτης, κάδμιο, δινιτροφαινόλη και αιθανόλη) που αναγνωρίζονται ως γνωστοί επαγωγείς HSP απέτυχαν να διεγείρουν συγκεκριμένα HSPs σε κύτταρα ήπατος αρουραίου σε βαθμό συγκρίσιμο με την επαγωγή αυτών των HSPs από θερμικό σοκ. Ως εκ τούτου, εξετάστηκε η επικύρωση της ειδικής για το στρες αξιολόγησης κινδύνου μέσω περαιτέρω έρευνας με μεγαλύτερες ομάδες πρωτεϊνών. Οι Mirkes et al. [72] ανέφεραν ότι η απόκριση θερμικού σοκ, που χαρακτηρίζεται από τη σύνθεση και συσσώρευση του HSP72, δεν ήταν γενικός βιοδείκτης σε έμβρυα αρουραίου για χημικά τερατογόνα όπως N-ακετοξυ-2-ακετυλαμινοφλουορένιο, CdCl₂, κυκλοφωσφαμίδιο, αρσενίτη νατρίου (AS) και σαλικυλικό νάτριο (SAL). Οι τελευταίες δύο χημικές ουσίες προκάλεσαν τη σύνθεση και τη συσσώρευση του HSP72, και οι δύο έχουν διαφορετική κινητική συσσώρευσης. Επίσης, αυτές οι χημικές ουσίες προκάλεσαν εμβρυοτοξικότητα χαρακτηριζόμενη από ανώμαλη ανάπτυξη και επιβράδυνση της ανάπτυξης. Η υπερέκφραση των HSP72 μετά από βραχυχρόνια έκθεση (2-6 ώρες) πνευμονικής κυτταρικής σειράς (A549) σε οξείες συγκεντρώσεις Cd (υψηλότερη από 50 μM) θεωρήθηκε πρώιμος βιοδείκτης για επαγγελματική έκθεση σε Cd αλλά μακροχρόνια (1 μήνα) η έκθεση in vivo το καθιστούσε αμφίβολο επειδή η έκφραση των HSP72 μειώθηκε λόγω της κυτταρικής προσαρμογής στη χρόνια έκθεση σε Cd [73]. Παρομοίως, σε νεανική πέστροφα ουράνιου τόξου εκτεθειμένη σε Cd (1,5 μg / L) και Zn (150 μg / L) για 21 ημέρες, παρατηρήθηκε προσαρμοστική ανταπόκριση σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ με αύξηση αντιοξειδωτικών αμυντικών (ολική γλουταθειόνη, δισμουτάση υπεροξειδίου και αντιοξειδωτική ικανότητα ισοδύναμη με Trolox) χωρίς οποιαδήποτε εξασθένιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης GSH ή επαγωγής των HSP70 και HSP60 [74].

Οι Efremova et al., [75] ανέφεραν ότι τα Pb και Zn προκάλεσαν μια ισχυρή επαγωγή των HSP. Τα οργανοχλωρίδια και η πενταχλωροφαινόλη προκάλεσαν επίσης επαγωγή αλλά δεν ενισχύθηκαν σταθερά. Τα απόβλητα από το φυτό χαρτοπολτού και χαρτιού προκάλεσαν μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αύξηση της έκφρασης του HSP70 σε ενδημικά σφουγγάρια γλυκού νερού στη λίμνη Baikal. Ωστόσο, δεν υπήρχε διαφορά στις βασικές συγκεντρώσεις των HSP70 μεταξύ των σφουγγαριών που συλλέχθηκαν από μολυσμένα (με απόβλητα ύδατος του χαρτοπολτού και του χαρτιού) και των μη μολυσμένων χώρων. Μια άλλη μελέτη σχετικά με το σφουγγάρι *Crambe* ανέφερε ότι η συσσώρευση και η απόκριση των HSP54 ήταν υψηλότερη και ταχύτερη από των HSP72 για την έκθεση σε Cu. Ωστόσο, η HSP72 προκλήθηκε σημαντικά μόνο στα άτομα που μεταμοσχεύθηκαν στη μολυσμένη περιοχή. Υπό πειραματικές συνθήκες, αμφότερες οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ προκλήθηκαν από χαλκό στα 30 μg / L και παρεμποδίστηκαν στα 100 μg / L. Οι υψηλότερες μέσες τιμές των HSP54 και HSP72 αντιστοιχούσαν στους σπόγγους που έδειξαν τις χαμηλότερες μέσες τιμές τοξικότητας. Έτσι, η τοξικότητα και η παραγωγή του HSP εμφανίζουν ανταγωνιστικές τάσεις [76]. Στο χιτωνόζωο *Pseudodistoma crucigaster*, οι HSPs προκλήθηκαν μόνο όταν οι συγκεντρώσεις Cu ήταν κάτω από το ήμισυ της πραγματικής συγκέντρωσης στο ρυπασμένο λιμάνι τους. Ο συγγραφέας πρότεινε ότι η HSP ήταν χρήσιμη μόνο ως σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για την υποβρύχια μόλυνση Cu στο χιτωνόζωο, καθώς η απόκριση αναστέλλεται πάνω από μια τιμή κατωφλίου του παράγοντα καταπονήσεως, η οποία ήταν μεταβλητή μεταξύ των ειδών [77]. Επιπλέον, η επίδραση του Cu (50, 100 και 960 μg / L για 2-24 ώρες στους 19 ° C) στα επίπεδα HSP60 που αναλύθηκαν με ανάλυση Western blotting των υδροσκώληκων *Dugesia schubarti* δεν αποκάλυψε αλλαγές στην έκφραση HSP60. Ωστόσο, η δραστηριότητα της καταλάσης επηρεάστηκε σημαντικά.

Επομένως, συνήχθη το συμπέρασμα ότι οι HSP60 δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για τη μόλυνση Cu στους υδροσκώληκες [78].

Το έντομο *Tetrix tenuicornis* συλλέχθηκε από μολυσμένες και μη μολυσμένες θέσεις για μελέτη της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων και της επίδρασής τους στο επίπεδο πρωτεϊνών στρες. Τα έντομα που συλλέχθηκαν από μολυσμένη περιοχή είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις (κυμαινόμενες από 1,5 έως 42 φορές) των Cu, Zn, Pb και Cd από τα έντομα ελέγχου. Επιπλέον, οι συσσωρεύσεις βαρέων μετάλλων προκάλεσαν μόνο μικρές διακυμάνσεις στη συσσώρευση των Hsc70 και HSP70i [9]. Περαιτέρω, παρατηρήθηκε επίσης μια αναστολή της σύνθεσης HSP70 στον γαιοσκώληκα *Lumbricus terrestris* σε απόκριση σε μια ποικιλία μετάλλων όπως το Pb, Cd και Cu [53]. Αξιολογώντας τη δύναμη των HSP70 ως περιβαλλοντικού βιοδείκτη της υγείας των ψαριών κατά τη διάρκεια των συνθηκών, οι Webb και Gagnon [79] ανέφεραν ότι η μέτρηση HSP70 από μόνη της ήταν ανεπαρκής για την αξιολόγηση των συνθηκών υγιεινής των ψαριών.

2.4. Συζήτηση: Κριτική Ανάλυση

Ένα γενικό συμπέρασμα σχετικά με την εγκυρότητα των HSP70 ως βιοδείκτες έκθεσης ή αποτελέσματος τοξικότητας είναι δύσκολο να επιτευχθεί, εν μέρει λόγω του αντικρουόμενου χαρακτήρα πολλών από τις παραπάνω ερευνητικές εκθέσεις. Ωστόσο, ορισμένες εκθέσεις έρευνας μας επιτρέπουν να εξαγάγουμε συμπεράσματα σχετικά με τη δύναμη συγκεκριμένων υποψηφίων βιοδεικτών. Κατά την ανάλυση της μέχρι σήμερα έρευνας, αντιμετωπίσαμε 9 βασικές ανησυχίες σχετικά με τους περιορισμούς στη χρήση των HSP ως βιοδείκτες. Αυτά εξηγούνται λεπτομερώς στην ακόλουθη συζήτηση. Οι ερευνητές πρέπει να εξετάσουν τις ακόλουθες ανησυχίες προκειμένου να καταλήξουν σε συγκεκριμένα συμπεράσματα.

- (1) Μπορούν οι HSP ως βιοδείκτες να αποκαλύψουν τόσο τη συγκέντρωση όσο και τη φύση ενός συγκεκριμένου τοξικού παράγοντα σε ένα περιβάλλον;
- (2) Είναι κοινή η πρόσληψη, η οριακή συγκέντρωση και ικανότητα επαγωγής όλων των μετάλλων / τοξικών ουσιών;
- (3) Η μεταβλητότητα των συγκεντρώσεων HSP70 μεταξύ διαφόρων οργανισμών και η απόκτηση ανοχής επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα;
- (4) Οι διαφορές ηλικίας και φύλου δεν επηρεάζουν την έκφραση του HSP70;
- (5) Οι φυσικές ιδιότητες του εδάφους και οι μεταβλητοί μηχανισμοί αποτοξίνωσης μεταξύ των ειδών δεν δρουν ως παράγοντες συγχύσεως;
- (6) Μήπως μια συνεργιστική επίδραση διαφορετικών τοξικών ουσιών τροποποιεί την έκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ;
- (7) Οι διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης HSP εξάγουν παρόμοια αποτελέσματα για ένα συγκεκριμένο τοξικό στον ίδιο οργανισμό;
- (8) Είναι οι μελέτες που επικυρώνουν τις HSP ως βιοδείκτες αρκετά ευρείες;
- (9) Αποτελεί η εφαρμογή των βιολογικών δεικτών χρήσιμη στρατηγική για την αξιολόγηση της τοξικότητας;

2.4.1. Συγκέντρωση και φύση συγκεκριμένου τοξικού παράγοντα.

Οι HSPs δεν αποκάλυψαν τη συγκέντρωση ή τη φύση ενός συγκεκριμένου παράγοντα καταπόνησης, δηλαδή τύπου βαρέων μετάλλων ή χημικών, καθώς εμφάνιζαν μια έντονη μεταβολή στις συγκεντρώσεις τους ανταποκρινόμενες σε μια ποικιλία καταστάσεων πίεσης. Επιπλέον, αυτές οι συγκεντρώσεις δεν δίνουν μια πραγματική εικόνα για διαφορετικά τοξικά μέσα σε ένα περιβάλλον, δηλαδή, πόσες τοξικές ουσίες υπήρχαν σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία ή βιοτόπου υπό διερεύνηση.

2.4.2. Πρόσληψη, οριακές συγκεντρώσεις και επαγωγή.

Οι οριακές συγκεντρώσεις μετάλλων για την επαγωγή HSP70 ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών μετάλλων. Για παράδειγμα, σε αναλύσεις απορρόφησης μετάλλων για τα Pt, Pd, Rh, Cd και Pb στα μύδια (*Dreissena polymorpha*) έδειξε την υψηλότερη πρόσληψη για Cd ακολουθούμενη από Pt, Pb, Pd και Rh. Οι υψηλότερες τιμές HSP70 παρατηρήθηκαν στην περίπτωση έκθεσης σε Pd ακολουθούμενη από Pt, Rh, Pb και Cd. Επομένως, το Pd φαίνεται να είναι ένας ιδιαίτερα ισχυρός επαγωγέας των HSP70, παρά τη σχετικά χαμηλή οριακή συγκέντρωση [8]. Επομένως, πρέπει να αποφεύγονται απλά συμπεράσματα με βάση τα σωματικά βάρη και τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με βάση την αντοχή του τοξικού. Επιπλέον, η ισχύς διαφόρων τοξικών ουσιών διαφέρει σημαντικά στην επαγωγή του υποκινητή HSP70. Για παράδειγμα, τα αποτελεσματικά μέταλλα όπως τα Cd, Zn και Hg και οργανικές ενώσεις όπως παράγωγα χλωροφαινόλης, 3,4-διχλωροανιλίνη, αιθυλοπαραθείο, βενζο (α) πυρένιο, 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ, ενδοσουλφάνη, διουρόνη και 4-νουλοφαινόλη, σε μη κυτταροτοξικές δόσεις, ενώ η τετραχλωροϋδροκινόνη και το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο, επάγουν τον υποκινητή σε κυτταροτοξικές δόσεις [13]. Περιστασιακά, ένα μέταλλο ενισχύει τη συσσώρευση άλλων. Αυτή είναι η περίπτωση ενός συνδυασμού Cu και Zn που οδήγησε σε υψηλότερη συσσώρευση Zn σε κύτταρα HepG2 [80]. Εντοπίστηκαν επίσης περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις HSP70 δεν συσχετίζονται με τον βαθμό έκθεσης του μετάλλου (όπως στα καβούρια *Carcinus maenas* για Cu και Zn) [81]. Επιπλέον, εξακολουθεί να τίθεται υπό αμφισβήτηση η έλλειψη συγκεκριμένων μετάλλων, για παράδειγμα του Cu, η μείωση της έκφρασης του HSP70 σε ορισμένους ιστούς (καρδιακό) και τα μιτοχόνδρια [82] και η ακριβής επίδραση αυτής της διατροφικής ανεπάρκειας σε άλλα όργανα.

2.4.3. Η ποικιλότητα των συγκεντρώσεων HSP70 και η απόκτηση ανοχής.

Οι ατομικές διαφορές υφίστανται ακόμη και σε μοριακά επίπεδα, σε παράγοντα, για παράδειγμα, που προκαλεί ατομική μεταβλητότητα της έκφρασης HSP70 σε εντερικούς ιστούς του *L. terrestris* [82]. Ορισμένοι συγγραφείς ανέφεραν μια ασθενή συσχέτιση μεταξύ των τοξικών και των HSP70 ως βιοδείκτες λόγω της διατομικής μεταβλητότητας των συγκεντρώσεων HSP70. Αυτή ήταν η περίπτωση του μυδιού *Mytilus trossulus*, όπου η διατομική μεταβλητότητα έτεινε να καλύπτει την επαγωγή της HSP70 σε χαμηλές συγκεντρώσεις ως (III), όντας έτσι ένας λιγότερο αποτελεσματικός βιοδείκτης τοξικότητας. Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων απαιτείται να αναλυθούν δείγματα προ- ή μετα-στρες για να επιτραπεί μεγαλύτερη ευαισθησία και αξιοπιστία στις HSP70. Άλλοι δείκτες, όπως η χρήση ακτίνης, πρέπει να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Η χρήση κατασκευασμένου γονιδίου HSP70-reporter προτείνεται και η ανίχνευση με HSP60, αίμη οξυγενάση-1, μεταλλοθειονεΐνη, CYP450, MXR ή GPx έχει προταθεί από την La Porte [83].

Μια άλλη δυσκολία στην επικύρωση των HSP ως βιοδεικτών είναι η ενίσχυση της απόκρισης στο άγχος (σε μορφή αυξημένης σύνθεσης του HSP70) σε αυτοανοσία καθώς και στην διασταυρούμενη ανεκτικότητα από μη θανατηφόρες δόσεις τοξικών ουσιών σε ευαισθητοποιημένα κύτταρα / ιστούς ή ιστούς που έχουν ήδη εκτεθεί σε τέτοια ή σε άλλες τοξικές ουσίες με διασταυρούμενη ανοχή). Ένα παράδειγμα είναι η αμφεταμίνη και το Cd στα ηπατικά κύτταρα [84, 85]. Hg [86] και το ουράνιο [87-89] στο νεφρό είναι ικανά να προκαλέσουν αυτοαπορρόφηση, ενώ το Zn εναντίον του Cd σε κύτταρα εγγύς αρουραίου [90], Pb έναντι Cd / C₂H₂ σε αστρογλοιακά κύτταρα [91], Hg, Pb, Cu, μεναδιόνη και διαιθυλοδιθειοκαρβαμικός εστέρας ενάντια σε θανατηφόρο θερμοκρασία σε κύτταρα Hepatoma Re35 H35 (92) ήταν επίσης ικανά να προκαλέσουν διασταυρούμενη ανοχή. "Πόσες φορές;" και "Σε ποιο βαθμό έχει εκτεθεί ένας οργανισμός;" είναι ερωτήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν στο φυσικό περιβάλλον. Επομένως, η επίκτητη αντίσταση κατά της κυτταροτοξικότητας καθώς και η διασταυρούμενη ανοχή σε μεγάλο αριθμό οργανισμών προσθέτει επίσης αβεβαιότητα στο ρόλο των HSP ως βιοδείκτη. Ομοίως, οι αποκρίσεις των βιοδεικτών ποικίλουν σε σχέση με τη διάρκεια και το επίπεδο έκθεσης σε εργαστηριακές συνθήκες και εξαρτώνται επίσης από τον πληθυσμό [93, 94]. Η απόκτηση της ανεκτικότητας από ορισμένους οργανισμούς όχι μόνο καλύπτει την πραγματική εικόνα, αλλά φαίνεται επίσης ως παράγοντας αμφιβολίας κατά την εφαρμογή του θέματος στην καθιέρωση κριτηρίων ποιότητας νερού [95].

2.4.4. Διαφορές ηλικίας και φύλου.

Ορισμένες μελέτες αποκάλυψαν ότι όχι μόνο η λειτουργική ικανότητα των HSP70 έναντι καταστάσεων στρες μειώνεται με τη γήρανση [96], αλλά και η γήρανση σχετίζεται με μια πραγματικά μειωμένη συγκέντρωση HSP70 και στη συνέχεια με μια μειωμένη ικανότητα ανταπόκρισης σε συνθήκες πίεσης [97]. Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης αποκαλύψει διαφορές με βάση το φύλο όσον αφορά την έκφραση των HSPs. Για παράδειγμα, η ανίχνευση γονιδίου HSP70 στα αναπαραγωγικά όργανα των ενήλικων μυγών έδειξε ότι η έκφρασή της περιοριζόταν σε αρσενικές μύγες [59]. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις μελέτες, τέτοιες διαφορές λόγω φύλου και ηλικίας αναμένονται επίσης σε άλλους οργανισμούς σε σχέση με τις HSP70 ως απάντηση σε τοξικές ουσίες. Θα πρέπει επίσης να εξεταστεί η ηλικία και το φύλο ενός οργανισμού, ιδίως όταν μελετάται ο ρόλος των HSPs ως εκτίμηση κινδύνου για τις επιπτώσεις της ρύπανσης του περιβάλλοντος στα όργανα του φύλου.

2.4.5. Παράγοντες συγχύσεως.

Σε περίπτωση μόλυνσης του εδάφους, οι Filzek et al., [98] υπογράμμισαν την εξέταση της υποκείμενης γεωλογίας, της φύσης του εδάφους και της χρήσης της γης ως απαραίτητων προϋποθέσεων για την κατανόηση της σημασίας οποιωνδήποτε παρατηρούμενων βιολογικών επιδράσεων. Οι συγγραφείς παρείχαν επίσης εκτενή συζήτηση σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο η διαθεσιμότητα και η κινητικότητα διαφόρων βαρέων μετάλλων στις επιλεγμένες περιοχές του τόπου επηρεάστηκαν από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων όπως το pH, η οργανική ύλη και η περιεκτικότητα σε άργιλο. Οι σημαντικές διαφορές στις τοξικές αποκρίσεις που μετρήθηκαν στο εργαστήριο έναντι των εκτεθειμένων στον αγρό νηματωδών από τους Arts et al., [52] εξήγησαν λόγω παραγόντων συγχύσεως όπως η διαθεσιμότητα τροφίμων και οι διαφορές στις οδούς πρόσληψης μολυσματικών ουσιών στα διάφορα καθεστώτα έκθεσης.

Υποστηρίχθηκε επίσης ότι υπήρχαν διαφορές μεταξύ των ιθαγενών ζώων που μεταμοσχεύθηκαν στον αγρό και των ζώων που συλλέχθηκαν στον αγρό, εν μέρει λόγω της αυξημένης και πιθανώς κληρονομικής ανοχής του πληθυσμού του αγρού. Επιπλέον, φυσιολογικές διαφορές στον τρόπο με τον οποίο ένα μεμονωμένο είδος χειρίζεται την πρόσληψη, την αποτοξίνωση, την αφομοίωση και την ενδεχόμενη έκκριση συσσωρευμένου μετάλλου επηρέασε επίσης την απόκριση HSP70 σε ισόποδα. Τέτοιες φυσιολογικές διαφορές υπάρχουν όχι μόνο στους χερσαίους οργανισμούς αλλά και στους υδρόβιους [99].

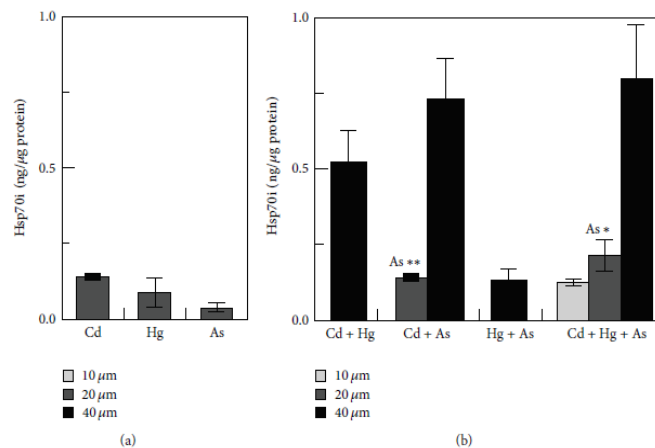
2.4.6. Συνεργιστικές επιδράσεις μεταξύ τοξικών ουσιών καθώς και μεταξύ τοξικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τις συνεργιστικές επιδράσεις των διαφόρων τοξικών ουσιών με τις άλλες πτυχές των περιβαλλοντικών πιέσεων (θερμοκρασία, pH, αλατότητα κλπ.). Για παράδειγμα, η τοξική επίδραση μεταβάλλεται σημαντικά υπό τις επιπρόσθετες επιδράσεις πολλών βαρέων μετάλλων σε σύγκριση με περιπτώσεις απομονωμένης τοξικότητας ενός μετάλλου όπου δύο ή περισσότερα μέταλλα βρίσκονται σε συνδυασμό. Η μεμονωμένη δόση των 20 μM As, Cd και Hg προκάλεσε μόνο μέτρια αύξηση του HSP70, ενώ ο συνδυασμός τους στα χαμηλότερα επίπεδα τοξικότητας προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη συσσώρευση αυτών των πρωτεϊνών [Εικόνα 1] [100]. Επιπλέον, ένας αριθμός γονιδίων στρες που ανταποκρίνονται σε βαρέα μέταλλα (όπως HSPs και MT) περιέχουν στοιχεία απόκρισης μετάλλων (MREs) στην περιοχή προαγωγού / ενισχυτή τους, η οποία ενεργοποιείται από μεταγραφικό παράγοντα μεταγραφής 1 (MTF-1). Η απόκριση σε θερμικό σοκ προκαλείται από παράγοντα-1 μεταγραφής θερμικού σοκ (HSF-1), ο οποίος ενεργοποιεί μια συστοιχία γονιδίων θερμικού σοκ. Η συνεργιστική ενεργοποίηση έχει επίσης καταδείξει τους προωθητές που ανταποκρίνονται στα μέταλλα από τα βαρέα μέταλλα (Zn ή Cd) και το θερμικό σοκ σε συνδυασμό. Η θερμότητα διεγείρει επίσης την ενδοκυτταρική συσσώρευση Zn και Cd όταν παρέχεται εξωγενώς κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ, (σε κύτταρα θηλαστικών HEK293) και έτσι οδηγεί σε υπερενεργοποίηση της οδού απόκρισης μετάλλου. Είναι ενδιαφέρον ότι σχετικώς χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των βαρέων μετάλλων από μόνα τους δεν προκάλεσαν καθόλου μεταγραφή και χρησίμευαν ως επαρκής διέγερση για τέτοια συνεργιστική ενεργοποίηση προαγωγού HSP70 θηλαστικού (Σχήματα 2 (α) και 2 (β)) [101]. Ομοίως, τα υδατοδιαλυτά κλάσματα διαφορετικού μίγματος που περιέχουν μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb και Zn), όταν χορηγήθηκαν χωριστά σε ανθρώπινα καλλιεργημένα κύτταρα (HT29 κυτταρική σειρά από βλεννογόνο του εντέρου), απέτυχαν να προκαλέσουν σημαντική έκφραση του HSP72. Όταν δόθηκαν σε συνδυασμό, άσκησαν ισχυρή συνεργιστική δράση προκαλώντας σημαντική υπερέκφραση του HSP72 (Εικόνα 3) [102]. Αυξημένες συγκεντρώσεις του HSP70 έχουν επίσης παρατηρηθεί σε κύτταρα HepG2 υπό τις συνεργιστικές επιδράσεις των Cu και Zn σε σύγκριση με κάθε μέταλλο (Εικόνα 4) [80]. Μια άλλη μελέτη που διεξήχθη από τους Ait-Aissa et al. [74] ανέφεραν ότι το 3,3', 4,4'-τετραχλωροδιφαινύλιο (1 mg / kg) προκάλεσε έντονα τις HSP70, ενώ η ταυτόχρονη έκθεση του σε μέταλλα δεν μετέβαλε σημαντικά τα αποτελέσματά του. Ωστόσο, η 17- β -οιστραδιόλη σε συνδυασμό με Cd / Zn έδειξε συνεργιστική δράση.

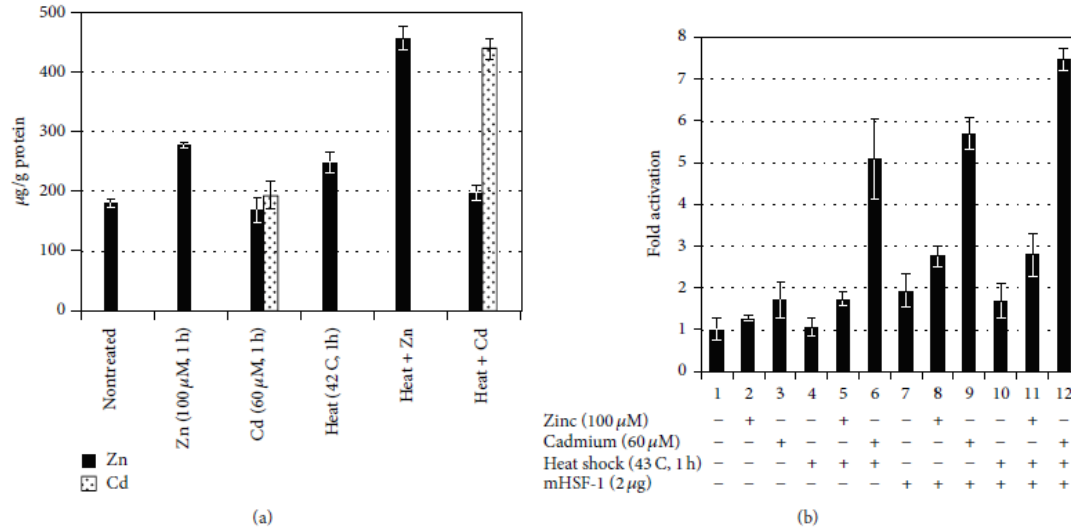
Εκτός από τις συνεργιστικές επιδράσεις των τοξικών ουσιών, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία [103], η αλατότητα [104] και η παροχή οξυγόνου [105] επηρεάζουν επίσης την έκφραση των HSPs και μπορεί επίσης να έχουν συνεργιστικό αποτέλεσμα σε συνδυασμό με τοξικά, καθιστώντας

έτσι την υπόσταση τους ως βιοδείκτες αμφίβουλη. Για παράδειγμα, η έκθεση σε Cd αύξησε τις συγκεντρώσεις HSP70 σε θαλάσσια αχιβάδα, ενώ η αλατότητα μειώνει αισθητά το ίδιο επίπεδο σε αυτά τα είδη. Μια εργαστηριακή μελέτη σχετικά με τις επιδράσεις της αλατότητας στις συγκεντρώσεις HSP70 έδειξε ότι η έκθεση σε αλατότητα 0,1 ppt μείωσε αισθητά τις συγκεντρώσεις HSP70 σε αχιβάδες *Portamoecorbula amurensis* σε σύγκριση με εκείνες που εκτέθηκαν σε υψηλότερες αλατότητες (Σχήμα 3 [106]). Η αύξηση της αλατότητας από 5 έως 25 ανά χιλιάδες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας και των συγκεντρώσεων των ελεύθερων μεταλλικών ιόντων. Το φαινόμενο αυτό θεωρήθηκε ως το ισχυρότερο για τα Cd και Pb, ενώ τέτοια μικρότερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα Ni, Cu και Zn [104]. Ο ρυθμός συσσώρευσης ουρανίου στους ιστούς της αχιβάδας *Corbicula fluminea* ήταν υψηλότερος κάτω από υποξία παρά από την επαρκή οξυγόνωση. Σε κυτταρικό επίπεδο, το ουράνιο αντί για την υποξία προκάλεσε την έκφραση της πρωτεΐνης πολλαπλής ξενοβιοτικής ανοχής.

Ορισμένοι συγγραφείς θεωρούν επίσης τις HSP70 ως βιοδείκτη στα φύκια *Raphidocelis subcapitata* σε απόκριση μεταβολών στο pH, τη θερμοκρασία, τα χυμικά οξέα, τα νιτρικά και τα φωσφορικά άλατα. Τα φύκια ανταποκρίθηκαν σε αυτές τις αλλαγές με μια παροδική αύξηση της συγκέντρωσης HSP70. Η θερμοκρασία και το pH βρέθηκε ότι προκαλούν επίκτητη ανοχή. Δηλαδή τα φύκια που αναπτύσσονται σε pH ή σε θερμοκρασία διαφορετικές από τις συνθήκες ελέγχου αποδείχθηκαν ότι έχουν αποκτήσει ανοχή σε μία επακόλουθη πρόκληση με Zn (105 M). Αυτά τα αποτελέσματα χαρακτηρίζουν την HSP70 ως βιολογικό παράγοντα για την περιβαλλοντική ρύπανση υπό την προϋπόθεση ότι βασικές περιβαλλοντικές παράμετροι όπως το pH και η θερμοκρασία διατηρούνται σταθερά [108]. Εκτός από τη θερμοκρασία και το pH, έχει δοθεί πολύ μεγάλη έμφαση και στην ανάλυση των θρεπτικών ουσιών, των ηλεκτρολυτών και της περιεκτικότητας σε διαλυμένο οξυγόνο [105].



Σχήμα 2: Τα τοξικά μέταλλα προκαλούν συσσώρευση HSP70i στα υποκύτταρα κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση. Αποτελέσματα ποσοτικής ανάλυσης Western ανοσοαποτύπωσης, συσσώρευσης HSP70i σε υποκύτταρα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με διάφορες συγκεντρώσεις μεμονωμένων τοξικών μετάλλων (α) ή συνδυασμούς δύο και τριών τοξικών μετάλλων συνολικού ύψους 10, 20 ή 40mM (β) για 3 ημέρες. Οι τιμές εκφράζονται σε ng HSP70i ανά mg ολικής πρωτεΐνης. Τα βασικά επίπεδα HSP70i ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης [100].



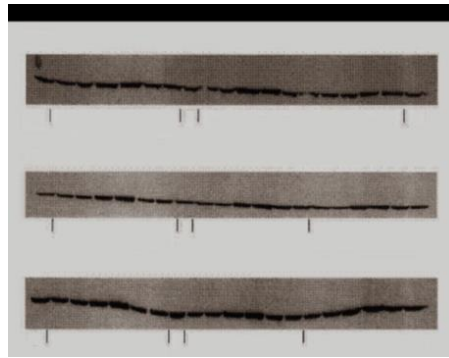
Σχημα 3: (α) Η κυτταρική συσσώρευση Zn και Cd ενισχύεται από θερμικό σοκ. Μετά την προσθήκη Zn και Cd σε τελική συγκέντρωση 100 και 60 µM, αντίστοιχα, με ή χωρίς θερμικό σοκ (42 °C για 1 ώρα). Κύτταρα HEK293 συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με ICP-MS. Τα δεδομένα από τρεις ανεξάρτητους προσδιορισμούς έχουν καταδειχθεί [101]. (β) Έκφραση υποκινητή HSP70 με Cd και θέρμανση παρουσία ή απουσία HSF-1. Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με κατασκευάσµα υποκινητή-ανταποκριτή HSP70-Luc, το κατασκευάσµα αναφοράς CMV-LacZ και φορέα έκφρασης HSF-1 ποντικού. 36 ώρες μετά την επιμόλυνση, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή με 100 µM ZnCl₂ ή 60 µM CdCl₂ με ή χωρίς θερμικό σοκ στους 43 °C για 1 ώρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκαν οι δραστηρότητες του γονιδίου αναφοράς με προσδιορισµό λουσιφεράσης. Το βασικό επίπεδο λήφθηκε ως 1 για τον υπολογισµό της ενεργοποίησης πτυχώσεων [101].

HSP70 levels in clams during adaptation to various salinities*.

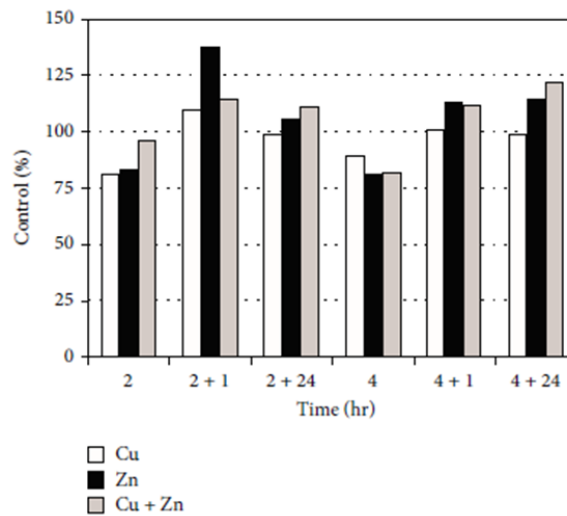
Salinity (ppt)	HSP70 (relative density ×10 ³)		
	After 24 h	After 24 h	After 24 h
0.1	1791	17.41	14.59
3	1772	23.92	38.08
6	2734	39.25	35.82
10 (ambient)	31.05	26.20	17.80
14	19.56	36.10	32.6
27	37.53	31.08	35.56

Πίνακας 5

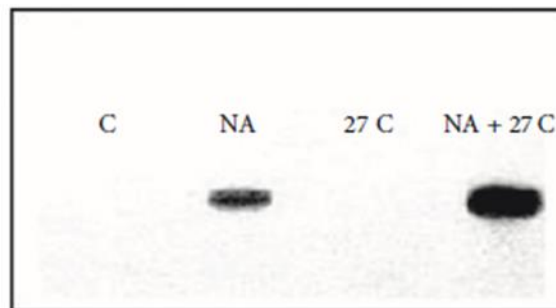
* Μύδια που συλλέγονται από τη μαρίνα Martinez (αλατότητα: 10 ppt). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη σχετική πυκνότητα αυθαιρέτων μονάδων ζωνών που ανιχνεύονται με western blotting των συγκεντρωμένων δειγμάτων πέντε μυδιών *Rotamocorbula amurensis*, χωρίς σημαντικές διαφορές στη θερμοκρασία αλλά αυξάνοντας την αλατότητα με βαθμιδωτό τρόπο στις θέσεις δειγματοληψίας [106].



Εικόνα 3: Ανοσοαποτυπώσεις που εμφανίζουν επίπεδα HSP72 σε κύτταρα HT29 μετά από έκθεση 24 ωρών στα διαφορετικά εκχυλίσματα λάσπης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν μόνο σε διαλυτά εκχυλίσματα λάσπης (SE), σε διαλυτά εκχυλίσματα λάσπης + διάλυμα βαρέων μετάλλων (SE + HM) ή μόνο σε διάλυμα βαρέων μετάλλων (HM) στις υποδεικνυόμενες συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε γραμμάρια ανά κιλό ξηρού υλικού. Τα μη επεξεργασμένα κύτταρα είναι έλεγχος (C) S1, S2, S3, διαφορετική λάσπη [102].



Σχήμα 4: Ανίχνευση πυκνομετρίας σάρωσης HSP70 σε Cu (30 $\mu\text{g} / \text{mL}$) και Zn (50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) μόνο ή σε συνδυασμό με επεξεργασμένα κύτταρα HepG2 εκφρασμένα ως ποσοστό ελέγχου κατά τον χρόνο που περιγράφηκε [80].



Σχήμα 5: Επίδραση της θερμικής καταπληξίας (27 ° C) 2 h και του αρσενικού νατρίου (10 μM) σε κύτταρα A6 του *Xenopus laevis* με έλεγχο 22 ° C [120].

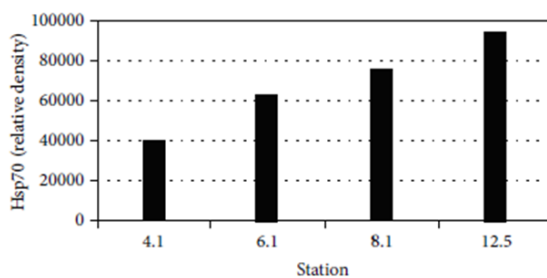
Ένας άλλος περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την έκφραση των HSPs είναι η εποχιακή διακύμανση, η οποία δρα εν μέρει σύμφωνα με την αντίστοιχη θερμοκρασία. Οι εποχιακές διακυμάνσεις στις HSP70 όπως σημειώνεται στο μύδι (*Mytilus galloprovincialis*) σε δύο τοποθεσίες του Carreau της Μεσογείου Θάλασσας (τοπική περιοχή) και στη La Four cade (θέση μεταμόσχευσης) σε μια διετή μελέτη μπορεί να δώσει πιθανότερο αποτέλεσμα συνδυασμένων περιβαλλοντικών παραγόντων, αλατότητα και θολερότητα) και επίπεδα χημικής μόλυνσης [109]. Οι Bodin et al., [109] διεξήγαγαν μια ολοκληρωμένη μελέτη αλλά δεν πρότειναν καμία συσχέτιση των μεταβολών στο επίπεδο βιοδεικτών με άλλες παραμέτρους. Αναφέρουν Επίσης ότι τα μύδια αμφοτέρων των θέσεων έχουν συγκεκριμένα προφίλ χημικής μόλυνσης αλλά έχουν παρόμοιο εύρος τιμών. Για παράδειγμα, και οι δύο τοποθεσίες ήταν πολύ μολυσμένες από βαρέα μέταλλα (201 και 258,4 mg / kg dw, αντίστοιχα) και θεωρήθηκαν ως μέτριοι δείκτες για πολυχλωριωμένα διφαινύλια και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Ωστόσο, τα επίπεδα μόλυνσης στο Carreau ήταν διπλάσια για τους PAHs (101,5mg / g dw) και τα PCBs (90,2mg / g dw) στη La Four cade. Η εποχιακή τάση μόλυνσης στο Carreau έδειξε έξι φορές υψηλότερο επίπεδο πυρολυτικών ρύπων το χειμώνα. Έδειξε ότι η εποχιακή διακύμανση των επιπέδων μόλυνσης ήταν μια ανθρωπογενής δραστηριότητα που συσχετίζεται καλά με τις καθημερινές ανάγκες ζωής τους [110]. Μια άλλη μελέτη από τους Hamer et al., [111] διερεύνησαν τις συγκεντρώσεις των HSP70 στα βράγχια του μυδιού *Mytilus gallo provincialis* που συλλέχθηκαν εποχιακά από διαφορετικούς τόπους της παράκτιας περιοχής Rovinj (Κροατία). Παρατηρήθηκαν τα μέγιστα επίπεδα HSP72 και HSP70 το καλοκαίρι (Σεπτέμβριος) και ελάχιστες συγκεντρώσεις το χειμώνα (Δεκέμβριος). Οι HSP70 έδειξαν σημαντική συσχέτιση με τη θερμοκρασία της θάλασσας ($r = +0.822$, $P < 0.05$) μόνο. Ομοίως, παρατηρήθηκε επίσης μια σημαντική διαφορά εποχής (Μαρτίου και Σεπτεμβρίου) όσον αφορά την περιεκτικότητα σε HSP70 σε σαρανταποδαρούσες συγκεντρωμένες από μη ρυπανθείς περιοχές [112]. Τα θηλυκά ψάρια που συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές περιοχές την άνοιξη (26,5 ° C) και το χειμώνα (4,8 ° C) εμφάνισαν παρόμοια τάση στον ιστό των ωοθηκών και του ήπατος του μακρού *Lepomis macrochirus*, στο κεφάλι και στους νεφρούς του *Ameiurus melas*, και στον ιστό και των δύο ειδών [113].

Έτσι, οι εποχιακές διακυμάνσεις δρουν μέσω της θερμοκρασίας και των διατροφικών καθεστώτων, καθώς και μέσω της ποσότητας και της ποιότητας των ρύπων που απορρίπτονται σε περιβάλλοντα ανάλογα με τις εποχιακές δραστηριότητες των ανθρώπων. Ως αποτέλεσμα, οι σύνθετες μοριακές αλληλεπιδράσεις σε πραγματικούς περιβαλλοντικούς βιοτόπους λειτουργούν σε βιολογικές δομές και στην περίπτωση χρόνιας ρύπανσης η δράση των τοξικών ουσιών μπορεί να μην είναι κυρίαρχη αλλά συνδέεται με πολλούς άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες άγχους. Σε συνδυασμό με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι ρύποι μπορούν να συμβάλλουν στην αποδυνάμωση των αμυντικών και ρυθμιστικών μηχανισμών των μελετών οργανισμών. Ως εκ τούτου, οι βιοδείκτες έκθεσης που σχετίζονται με αυτούς τους μηχανισμούς πρώιμης φυσιολογικής ρύθμισης υπόκεινται σε παραλλαγές που καθιστούν δύσκολη την ανίχνευση των ειδικών επιδράσεων των χημικών ρύπων. Η παρεμβολή φυσικών περιβαλλοντικών παραγόντων στην έκφραση βιοδεικτών είναι ένα σημαντικό ζήτημα σε σχέση με τη χρήση βιολογικών σημάτων στην παρακολούθηση των βιολογικών επιδράσεων των ρύπων στο φυσικό τους περιβάλλον, καθιστώντας δύσκολη την ερμηνεία των πεδίων. Ως εκ τούτου, οι επιπτώσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη στις στρατηγικές δειγματοληψίας για την παρακολούθηση των προγραμμάτων ώστε να αποφεύγεται η εσφαλμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες πεδίου έδειξαν ότι η απόκριση στο στρες μπορεί να συμβεί ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις ρύπων που συνήθως επικρατούν στο περιβάλλον. Απαιτούνται αυξημένες γνώσεις σχετικά με την κινητική και την επιμονή της αντίδρασης στο άγχος σε

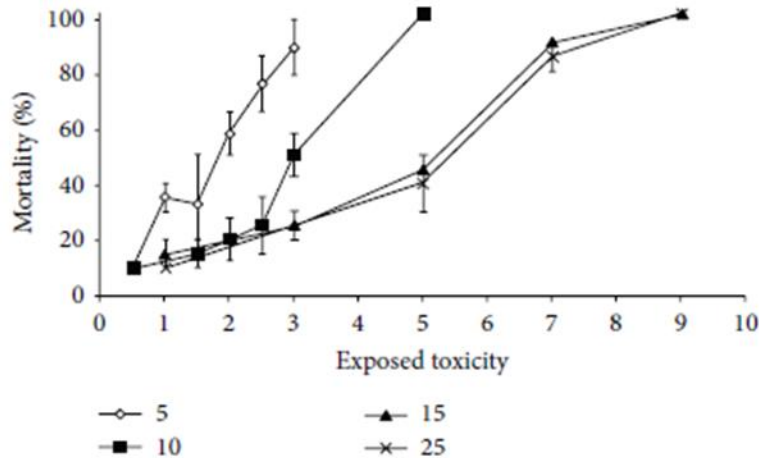
πολύπλοκα περιβαλλοντικά μείγματα (η επίδραση τόσο των φυσιολογικών όσο και των περιβαλλοντικών παραμέτρων), τα συστατικά επίπεδα των HSP και η απόκτηση ανοχής πριν από την ασφαλή εφαρμογή των HSPs για την εκτίμηση της ρύπανσης.

2.4.7. Ανίχνευση HSPs μέσω της Northern και Western Blot.

Κανονικά, και οι δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση HSP για να ποσοτικοποιηθούν οι HSP ως βιοδείκτες τοξικότητας. Μερικοί ερευνητές υπογράμμισαν ότι το αποτύπωμα Northern είναι ένα εξαιρετικά ευαίσθητο και αρχικό βήμα στην ανίχνευση του περιβαλλοντικού άγχους στην έκφραση γονιδίων. Άλλοι επιστήμονες τόνισαν το αποτύπωμα Western από το γεγονός ότι οι μεταβολές στην έκφραση του mRNA δεν αντιστοιχούν αναγκαστικά σε αλλαγές στα επίπεδα πρωτεΐνης [7] ή ότι το πολυριβόσωμα μπορεί να εμπλέκεται στη σύνθεση πρωτεϊνών κάτω από ορισμένες συνθήκες. Μια απλή μέτρηση του mRNA μπορεί να δώσει μια αμφίβολη απάντηση. Η οποία αν και είναι πραγματικά πιο αξιόπιστη πλέον, παραμένει αμφισβητήσιμη. Για μερικούς στις HSP, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της επαγωγής mRNA και των πρωτεϊνών της (HSP60, HSP68 και HSP84) [114]. Κάποιοι άλλοι δεν βρήκαν καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA και της πρωτεϊνικής σύνθεσης, για παράδειγμα HSP68 [115]. Κάποιες περιπτώσεις έχουν επίσης παρατηρηθεί τα επίπεδα mRNA παρέμειναν σταθερά μετά την έκθεση σε βαρέα μέταλλα (ZnCl₂, 0-330 μM), ενώ τα επίπεδα πρωτεΐνης αυξήθηκαν σημαντικά με τρόπο δόσοεξαρτώμενο [116]. Ως εκ τούτου, τα συμπεράσματα δεν μπορούν να εξαχθούν μόνο βάσει ενός από τα δύο, και οι δύο πλευρές πρέπει να διερευνηθούν στα προτεινόμενα οργανικά μοντέλα. Δεν αποτελεί σκοπό να υποδηλωθεί η έλλειψη ποιότητας στις μελέτες που επικυρώνουν τις HSP ως βιοδείκτες. Στην πραγματικότητα, όλες αυτές οι μελέτες είναι έγκυρες και τους αναγνωρίζονται τα πολύτιμα ευρήματά τους. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά λογικά ερωτήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν σε σχέση με ορισμένες μελέτες. Για παράδειγμα, οι Arts et al., [52] διηγείται ότι η απάντηση HSP60 στο νηματώδες *Plectus acuminatus* είχε μια ενδεικτική τιμή που σχετίζονται με την ανταπόκριση HSP70 σε ισόποδα και θα μπορούσε να είναι ένας κατάλληλος βιολογικός δείκτης για λιγότερο έντονα μολυσμένα εδάφη. Αυτή η συλλογιστική είναι διφορούμενη. Εάν πρέπει να ελέγξουμε την έκταση της μόλυνσης του εδάφους πριν καταλήξουμε στη σημασία της απόκρισης βιοδεικτών, τότε ποιο είναι το πλεονέκτημα αυτών των βιολογικών δεικτών;



Σχήμα 6: Τα επίπεδα HSP70 σε *Potamocorbula amurensis* (μέσος όρος \pm SD, $n = 90$) που μετράται κάθε μήνα ($n = 6-8$ ανά σταθμό) από 07/1996 έως 01/1998 (εκτός 10/96, 1-3 / 97 και 10/97). Οι μονόδρομες αναλύσεις ANOVA και Tukey αποκάλυψαν δύο κύριες ομάδες θέσεων: ομάδα A με θέσεις 4.1 και 6.1 και ομάδα B με θέσεις 8.1 και 12.5 ($P < 0.001$) [106].



Σχήμα 7: Η καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης του ακέριου *Neotomys* για ένα μίγμα έξι μετάλλων σε διαφορετικές αλατότητες (5, 10, 15 και 25 ‰). Η τοξικότητα μειώνεται με την αύξηση της αλατότητας και οι υψηλότερες αλατότητες άνω των 25 ‰ δεν επηρέασαν περαιτέρω την LC50 96 ωρών του μείγματος των μετάλλων (Hg, / Cd, / Cu, / Zn, Ni, / Pb) 4.4 και 4.6 TU [104].

Οι περισσότερες από τις μελέτες επικύρωσαν τις HSPs ως βιοδείκτες τοξικότητας με βάση 2-5 τοξικά και ακόμη μερικά μόνο με βάση ένα μόνο τοξικό [58, 59, 78]. Πολλοί λίγοι ερευνητές θεωρούσαν συνεργιστικές επιδράσεις. Οι Issa et al., [13] διερεύνησαν το μέγιστο αριθμό τοξικών ουσιών (3 μέταλλα και 15 οργανικές χημικές ουσίες) στο πλαίσιο αυτό. Δεν μπορέσαμε να εντοπίσουμε καμία αναφορά για τις μελέτες με ανάλυση σημαντικού ευρέος φάσματος τοξικών ουσιών ή μελετών που περιέχουν όλα τα πιθανά βαρέα μέταλλα ή όλους τους οργανικούς ρύπους. Εάν μια αρχική μελέτη που χρησιμοποιείται Cu, Cd και Hg για τα βράγχια και το ηπατοπύκνωμα στα ψάρια, για παράδειγμα, μια πιο χρήσιμη συνέχιση μιας τέτοιας έρευνας θα ήταν η δοκιμή διαφορετικών μετάλλων στα ίδια όργανα του ίδιου ζώου αντί να χρησιμοποιηθούν τα ίδια μέταλλα για διαφορετικό ζώο. Στην τελευταία αυτή περίπτωση είναι πολύ δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να επικυρωθούν οι HSP ως βιοδείκτες έκθεσης τοξικότητας ή ανεπιθύμητων ενεργειών. Για παράδειγμα, εάν δοκιμάζουμε τον οργανισμό για εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου στον οποίο η έκφραση των HSP70 ή HSP60 θεωρήθηκε ως βιοδείκτης ως απάντηση σε Cu, Cd, Zn και Hg, το περιβάλλον μπορεί επίσης να έχει Cr και / ή οργανικό τοξικό παράλληλα με τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα; τότε πώς μπορούμε να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα, καθώς οι HSPs ανταποκρίνονται σε μια ποικιλία τοξικών ουσιών τόσο κατασταλτικά όσο και με πολύ εκφραστικούς τρόπους, ανάλογα με τη συγκέντρωση του τοξικού και τη διάρκεια της έκθεσης; Η διεύρυνση των δοκιμών σε μια σειρά πιθανών τοξικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για ένα και μόνο είδος θα προωθούσε το πεδίο σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό.

2.4.8. Εφαρμογή πολλών βιοδεικτών ως σετ.

Η σχέση ενός βιοδείκτη με άλλους δυνητικούς βιοδείκτες κατά την έκθεση σε συγκεκριμένες μολυσματικές ουσίες, σε διαφορετικά είδη και σε διαφορετικά όργανα ή ιστούς του ίδιου είδους, αποτελεί βασική συνιστώσα πριν από την ευρεία εφαρμογή τους στην περιβαλλοντική διαχείριση. Αν και πιο περίπλοκη, μια τέτοια τεχνική μπορεί να επιτρέψει τη χρήση βιοδεικτών για να δώσει μια πολύ σαφέστερη εικόνα της περιβαλλοντικής κατάστασης. Ορισμένες μελέτες έχουν ήδη αρχίσει να εξετάζουν αυτόν τον τομέα. Η συστηματική τους προσέγγιση εξετάζεται εδώ ως εξής.

(α) Ορισμένες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει διάφορα ξеноβιοτικά ως ένα εργαλείο για τη μελέτη σύνθεσης πρωτεϊνών στρες στα όργανα στόχους, προκειμένου να αξιολογηθεί η ειδικότητα του τοξικού παράγοντα-στόχου. Για παράδειγμα, ο νεφρός είναι ένας ιστός στόχος για χρόνια έκθεση σε Cd, οπότε η έκφραση HSP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης [117] και ακόμη μερικά μέταλλα όπως Hg προκαλούν περιφερειακές και κυτταρο-ειδικές εκφράσεις πρωτεΐνης στρες σε νεφρούς αρουραίων [86]. Παρομοίως, ειδικές διαφορές ιστού στη συσσώρευση των HSP70 και HSP60 σε *Mytilus edulis* που εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων χαλκού έχουν επίσης αναφερθεί από τους Sanders et al., [38]. Τέτοιες μελέτες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην επιλογή ενός συνδυασμού ιστών / οργάνων-στόχων για την αξιολόγηση των HSPs ως βιοδείκτη για τον ERA. (ευρωπαϊκός φορέας έρευνας)

(β) Ορισμένοι παράγοντες άγχους έχουν πολύ αντίθετες επιδράσεις στην έκφραση των HSP70 σε διαφορετικές περιπτώσεις. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση Ni 600M δεν έχει επίδραση στην έκφραση HSP70 σε μεταγραφικό επίπεδο σε κύτταρα HeLa [118], ενώ έχει δείξει επαρκή έκφραση στην κυτταρική γραμμή ινοβλάστης της τσιπούρας μαύρης θάλασσας σε συγκέντρωση 0,01M [10]. Ο αρσενίτης είναι ένας πολύ μικρός επαγωγέας του MT, αλλά ένας πιο αποτελεσματικός επαγωγέας των HSPs, ενώ το νικέλιο είναι ένας καλός επαγωγέας του MT, αλλά ένας φτωχός επαγωγέας των HSP [119]. Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν την εφαρμογή τέτοιων βιοδεικτών σε συνδυασμό ως σύνολο για τον ERA.

(γ) Οι αποκρίσεις τοξικότητας ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ ατόμων διαφορετικών ειδών. Υπάρχουν μερικά παραδείγματα όπου το τοξικό άγχος μεταβάλλει τα επίπεδα HSP σε μερικά όργανα (π.χ. σε βράγχια και συκώτια σε περίπτωση πέστροφας) και σε μερικές περιπτώσεις ολόκληρο τον οργανισμό όπως σε γάμπαρη (καρκινοειδή) [105]. Τέτοιες μελέτες και αυτές που έρχονται σε αντίθεση με την εγκυρότητα των HSP ως βιοδεικτών για τον ΕΧΠ μπορούν ακόμα να μας βοηθήσουν στην επιλογή των οργανισμών.

(δ) Το μοντέλο έκφρασης των HSPs δεν είναι μόνο ο συγκεκριμένος ιστός [34, 120] αλλά και το ειδικό για το είδος, όπως αποκαλύπτεται από τη μείωση, τη μέτρια αύξηση και την υπερέκφραση των HSP73 σε κύτταρα COS-7 (κύτταρα νεφρού πράσινου πιθήκου) (κύτταρα όγκου ανθρώπινου πνεύμονα) και νεφρικά κύτταρα αρουραίων, σε έκθεση σε 100, 200 ή 400M NiCl₂, αντίστοιχα, για 4 ημέρες [121]. Τέτοιες μελέτες υποδεικνύουν την επιλογή των οργανισμών ως σύνολο συνδυασμού για τον ERA.

Για να προσδιοριστεί η μεταβλητότητα των θανατηφόρων επιδράσεων των ρύπων, μόνο λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί μέχρι το τρίτο σημείο. Για παράδειγμα, οι Downs et al., [122, 123] ανέπτυξαν ένα σύστημα μοριακών βιολογικών δεικτών (MBS) βασισμένο σε 9 συγκεκριμένες κυτταρικές παραμέτρους για την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης των γαρίδων *Palaemonetes rugio* (εκτίθενται σε καύσιμο Cd) και των σαλιγκαριών *Ilyanassa obsoleta*, ατραζίνη (ζιζανιοκτόνο), καύσιμο, endosulfan και θερμικές καταπονήσεις). Δοκίμασαν HSP60, HSP70, ομόλογο άλφα Β-κρυσταλλίνης, υπεροξειδίο λιπιδίου, ολικό

επίπεδο γλουταθειόνης, ουμπικουϊτίνη, δισμουτάση μιτοχονδρίου υπεροξειδίου του μαγγανίου, μεταλλοθειονεΐνη και ομόλογο κυτοχρώματος P-450 2E. Αναφέρουν ότι το MBS ήταν διακριτό μεταξύ των απαντήσεων σε κάθε παράγοντα άγχους και στις μη καταπονημένες συνθήκες ελέγχου. δηλαδή, οι βιολογικοί δείκτες μεταλλοθειονεΐνης και ομόλογα κυτοχρώματος P450 2E διακρίνονται μεταξύ μεταλλικών και μη μεταλλικών τάσεων. Οι Ait-Aissa et al., [74] επιβεβαίωσαν με πολυμεταβλητές αναλύσεις ότι υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ αυτών των βιοδεικτών και κατέληξαν στη χρήση συμπληρωματικών βιοδεικτών ως απαραίτητη για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών θεραπειών και για την επισήμανση αλληλεπιδραστικών επιδράσεων. Εκτός από τα ζώα, οι HSP70 θα μπορούσαν ενδεχομένως να εφαρμοστούν στην ανίχνευση στρες σε υδρόβια φυτά όπως *Fucus serratus* και *Lemna minor*. Ωστόσο, θα ήταν πιο αποτελεσματικό όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με άλλες μετρήσεις για την παροχή προφίλ βιοδεικτών ή δακτυλικών αποτυπωμάτων ειδικών για τον άγχος [49].

Στην περίπτωση του εδάφους, οι Arts et al., [52] ανέφεραν ότι η απόκριση HSP60 στο νηματώδη *Plectus acuminatus* είχε ενδεικτική αξία όταν σχετίζεται με την απόκριση HSP70 σε ισόποδα και θα μπορούσε να είναι ένας κατάλληλος βιοδείκτης για λιγότερο βαριά μολυσμένα εδάφη. Παρομοίως, για ανάλυση HSP70 σε κοιλοκύτταρα, οι Homa et al., [54] ενίσχυσαν επίσης την έννοια που δόθηκε από προηγούμενες μελέτες ότι η αξία των βιολογικών δεικτών είναι υψηλότερη όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό ως σετ και όχι μεμονωμένα [93, 124].

Οι προηγούμενοι ερευνητές εξέτασαν μόνο ένα περιορισμένο αριθμό τοξικών ουσιών και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μόνο βαρέα μέταλλα ήταν υπό έρευνα. Η εφαρμογή αυτών των καταστάσεων είναι δυνατή σε ένα ήδη δοκιμασμένο περιβάλλον / τόπο με παρόμοια επίπεδα τοξικών και συνθηκών. Σε οποιαδήποτε άλλη περιοχή με διαφορετική φύση ή έκταση μόλυνσης τα αποτελέσματα μπορεί να παραμείνουν συγκεχυμένα. Ωστόσο, μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα εάν εφαρμοστεί σαν ένα ταξινομικό κλειδί.

Οι Gupta et al., [62] θεωρούσαν τις HSP ως κατάλληλους δείκτες έγκαιρης προειδοποίησης για τον κυτταρικό κίνδυνο. Υποστηρίχθηκε περαιτέρω ότι παρά την τεράστια χρήση της στην τοξικολογία, η τρέχουσα κατάσταση γνώσης στον καθορισμό ενός μηχανισμού δράσης ή στην ακριβή πρόβλεψη της τοξικότητας με βάση την έκφραση του γονιδίου στρες απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Οι ιδιότητες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ όπως (i) μέρος του κυτταρικού προστατευτικού μηχανισμού, (ii) η επαγωγίμη φύση έναντι ευρέος φάσματος χημικών ουσιών, και (iii) υψηλότερη διατήρηση σε όλο το μήκος των ταξινομικών δοκιμών έχουν αποδείξει ότι είναι πολύτιμες ως πρώτος βιοδείκτης στην αξιολόγηση του κινδύνου. Αν και η έκφραση του γονιδίου στρες έχει αποδειχθεί ελπιδοφόρα για την κατανόηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών, η βιβλιογραφία που συνδέει την ενεργοποίηση των γονιδίων στρες με το μηχανισμό τοξικότητας είναι περιορισμένη [62].

Σε μια πρόσφατη μελέτη, το προφίλ έκφρασης HSP χρησιμοποιήθηκε ως βιοδείκτης στα ψάρια για την παρακολούθηση της ποιότητας του νερού ενός ποταμού [125]. Τέσσερα γονίδια HSP, συγκεκριμένα HSP30, HSP60, HSP70 και HSP90, ενισχύθηκαν και προσδιορίστηκε η αλληλουχία τους χρησιμοποιώντας εκφυλισμένους εκκινητές. Αργότερα, αναπτύχθηκαν γονιδιακοί ειδικοί εκκινητές και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παρακολούθηση της έκφρασης των προαναφερθέντων τεσσάρων γονιδίων. Σε σύγκριση με τα ψάρια στην περιοχή αναφοράς, παρατηρήθηκε έως και 10-πλάσια διαφορά στην έκφραση των HSP 70 στο ήπαρ. Μεγαλύτερες διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση των HSP30 στα

νεφρά των ψαριών. Ωστόσο, όσον αφορά τα HSP60 και HSP90, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο επίπεδο έκφρασης. Αυτές οι διαφορές στην έκφραση HSP συσχετίζονται καλά με την ποιότητα του νερού. Οι συγγραφείς ήταν της άποψης ότι η έκφραση HSP30 και HSP70 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού [125].

Τα προφίλ μεταγραφής δύο γονιδίων HSP, δηλαδή των HSP70 και HSP90, χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες έναντι των καταστάσεων των μετάλλων και των οργανικών ενώσεων στο θαλάσσιο διάτομο *Ditylum brightwellii* (Db) [126]. Οι καλλιέργειες *D. Brightwellii* εκτέθηκαν σε διάφορες μεταλλικές ενώσεις, συγκεκριμένα, CuSO_4 , NiSO_4 , CuCl_2 και NiCl_2 και η έκφραση γονιδίου HSPs παρακολουθήθηκε χρησιμοποιώντας PCR σε πραγματικό χρόνο. Παρατηρήθηκε ότι όλες οι ελεγχόμενες μεταλλικές ενώσεις προκάλεσαν την έκφραση του γονιδίου HSP90. Ωστόσο, το πρότυπο επαγωγής ήταν διαφορετικό ανάλογα με την εξεταζόμενη μεταλλική ένωση. Όλες οι συγκεντρώσεις CuSO_4 προκάλεσαν αποτελεσματικά τη μεταγραφή του HSP90 ενώ μόνο υψηλότερες συγκεντρώσεις CuCl_2 και NiSO_4 ήταν ικανές να προκαλέσουν σημαντική αύξηση στην έκφραση. Το NiCl_2 αύξησε αρχικά την έκφραση του HSP90 κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Ωστόσο, σε πολύ υψηλό επίπεδο παρατηρήθηκε αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή, η έκφραση μειώθηκε με περαιτέρω αύξηση του επιπέδου του NiCl_2 . Η έκφραση HSP70 ακολούθησε ένα διαφορετικό μοτίβο. η έκφραση προκλήθηκε από CuSO_4 και NiSO_4 , αλλά όχι από CuCl_2 και NiCl_2 . Επιπλέον, η έκφραση πρώην δύο γονιδίων δεν εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση. Στην ίδια μελέτη αναλύθηκε επίσης η επίδραση της θερμικής καταπόνησης και των οργανικών ρύπων. Το θερμικό στρες προκαλεί έκφραση και των δύο γονιδίων. Ωστόσο, οι δοκιμασμένοι οργανικοί ρύποι δεν είχαν σημαντική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων HSP. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι HSPs συμμετέχουν διαφορετικά στην άμυνα εναντίον διαφόρων μορφών στρες. Με βάση τα πορίσματα της προαναφερθείσας μελέτης, πρέπει να εξεταστεί ένα σημαντικό σημείο. φαίνεται ότι συζυγή ανιόντα μετάλλου (SO_4 , Cl_2 , κλπ.) μπορεί να είναι υπεύθυνα για την ειδική επαγωγή γονιδίων HSP. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί από το γεγονός ότι τα μεταλλικά ιόντα συζευγμένα με SO_4 ήταν ικανά να ρυθμίζουν τη μεταγραφή των HSP70. Ωστόσο, αυτό δεν συνέβαινε για τα μέταλλα που συζεύχθηκαν με Cl_2 [126].

Το προφίλ μεταγραφής των HSP70 μελετήθηκε επίσης στα *Mytilus coruscus* σε απόκριση της πίεσης των καυσίμων και των βαρέων μετάλλων [127]. Σε όλες τις επεξεργασίες η έκφραση των HSP προκλήθηκε με διαφορετικό βαθμό μεγέθους. Η έκφραση των HSP70 αυξήθηκε σταθερά με το πέρασμα του χρόνου και έφτασε στο μέγιστο (περίπου 6 φορές αύξηση) μετά από 25 ημέρες της θεραπείας. Ωστόσο, η έκφραση άρχισε να μειώνεται μετά την απόκτηση του μέγιστου επιπέδου και την ημέρα 30, η έκφραση ήταν περίπου διπλάσια από τον έλεγχο. Παρόμοιο πρότυπο παρατηρήθηκε για τα βαρέα μέταλλα Cu^{2+} και Cd^{2+} + αλλά με μεγαλύτερη ένταση στο επίπεδο έκφρασης HSP70. Τόσο η Cu^{2+} όσο και η Cd^{2+} ενισχύουν την έκφραση σε 10 και 11 φορές, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο χρόνος μέγιστης έκφρασης ήταν διαφορετικός. στην περίπτωση του Cu^{2+} , η μέγιστη έκφραση επιτεύχθηκε την ημέρα 15 ενώ στην περίπτωση της Cd^{2+} ήταν την ημέρα 9 [127]. Αν και οι συγγραφείς έχουν υποστηρίξει τις HSP70 ως πιθανό βιοδείκτη για τα βαρέα μέταλλα και τα καύσιμα, αυτή η έννοια είναι αμφισβητήσιμη λόγω του γεγονότος ότι η έκφραση HSPs ανταποκρίνεται σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η αύξηση της θερμοκρασίας. Επιπλέον, φαίνεται, τουλάχιστον, σε αυτή τη μελέτη από τους Liu et al., [127] ότι η έκφραση HSPs έδειξε καθυστερημένη απόκριση σε τάσεις βαρέων μετάλλων, σε σύγκριση με τους υδρογονάνθρακες. Στην τελευταία περίπτωση, η έκφραση ρυθμίστηκε σε μερικές ώρες, ενώ για τα βαρέα μέταλλα, συνέβη σε

ημέρες. Σε πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες, θα είναι σχεδόν αδύνατο να συσχετιστεί η αλλαγή της έκφρασης των HSP με έναν συγκεκριμένο παράγοντα άγχους.

Η έκφραση HSP70 θεωρήθηκε ως ένας από τους βιοδείκτες για τη μελέτη των επιπτώσεων της συσσώρευσης βαρέων μετάλλων στα γαλακτοφόρα ψάρια (*Chanos chanos*) που συλλέχθηκαν από μολυσμένες περιοχές του νησιού Katturalli, Ινδία [128]. Μέσω σάρωσης ανοσοφθορισμού και Western blot, παρατηρήθηκε συσσώρευση HSP70 σε βράγχια και στο ήπαρ των γαλακτοφόρων ψαριών. Η έκφραση των HSP70 ήταν περισσότερο στα βράγχια των ψαριών που συλλέχθηκαν από μολυσμένη περιοχή σε σύγκριση με εκείνη από λιγότερο ρυπογόνο χώρο. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης των HSP70 παρατηρήθηκε στον ιστό του ήπατος των ψαριών [128]. Οι συγγραφείς έχουν δείξει πιο ρεαλιστική προσέγγιση στο να συνάψουν το συμπέρασμα που βασίζεται σε αυτή τη μελέτη. Παρά το γεγονός ότι έδειξαν αισιοδοξία όσον αφορά τη λήψη των HSPs ως βιοδείκτη, τόνισαν μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση για την αξιολόγηση της μόλυνσης των μετάλλων στο οικοσύστημα. Για να συνοψίσουμε, η HSP70 μπορεί να ληφθεί ως βιοδείκτης, ωστόσο όχι μεμονωμένα. Αντίθετα, θα ήταν πιο λογικό να το χρησιμοποιήσουμε ως βιοδείκτη μαζί με άλλες παραμέτρους όπως οι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.

Λίγες αναφορές έδειξαν επίσης την κακή ρύθμιση του γονιδίου HSP70 ως απάντηση στο άγχος των βαρέων μετάλλων. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Luo et al., [129] έχουν παρατηρήσει την επίδραση μακροχρόνιας πίεσης βαρέων μετάλλων στο *Crassostrea hongkongensis*, μέσω μιας πρωτεϊνωματικής προσέγγισης. Διαφορετικά εκφρασμένες πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν στο στρείδι που εκτέθηκε σε βαρέα μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο και ο μόλυβδος. Μία από τις διαφορετικά ρυθμισμένες πρωτεΐνες αναγνωρίστηκε ως HSP70. Σε αντίθεση με την συνήθως αναφερθείσα ρύθμιση προς τα πάνω, διαπιστώθηκε ότι η HSP70 ρυθμίζεται και προς τα κάτω στην *Crassostrea hongkongensis* [129]. Αυτό το ασυνήθιστο πρότυπο μεταγραφής αποδόθηκε στην παρατεταμένη έκθεση σε βαρέα μέταλλα. Αυτό θέτει περαιτέρω ερωτηματικά σχετικά με την εγκυρότητα των HSPs ως παγκόσμιου βιοδείκτη στρες.

3. Οι Hsp70 και ο ρόλος τους στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις

Η πρωτεόσταση των νευρώνων είναι ένα εξαιρετικά ρυθμισμένο και κρίσιμο συστατικό της νευρικής λειτουργίας. Σε αντίθεση με άλλους ιστούς και όργανα, οι απώλειες κυττάρων λόγω βλάβης και δυσλειτουργικών μηχανισμών σηματοδότησης δεν είναι μια επιλογή για τον εγκέφαλο. Οι νευρώνες εξαρτώνται επομένως από το συλλογικό κυψελοειδές μηχανισμό των μοριακών συνοδών. Οι Hsp70, είναι ένας μοριακός συνοδός που υδρολύει το ATP για να διπλώσει τις πρωτεΐνες σε λειτουργική κατάσταση, έχει εμπλακεί τόσο ως οδηγός της παθογένειας της νόσου όσο και ως θεραπευτικός στόχος για τις δραστηριότητες και τις ενώσεις που εντοπίζονται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Μέσω μελετών αλληλεπίδρασης, γενετικών μοντέλων και θεραπευτικών μικρών μορίων που χρησιμεύουν ως χημικά εργαλεία, έχουμε αποκτήσει μεγαλύτερη κατανόηση και εκτίμηση για το ρόλο των Hsp70 σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλύσουμε τις μελέτες και τα εργαλεία που διευκρίνισαν το ρόλο των μελών της οικογένειας Hsp70 σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές και θα προσφέρουν προοπτικές σε θεραπευτικές παρεμβάσεις που μπορεί να αποδειχθούν ευεργετικές για τη θεραπεία αυτών των ασθενειών.

Στην παθολογία των χαρακτηριστικών πολλών νευροεκφυλιστικών διαταραχών είναι η συσσώρευση ανώμαλων πρωτεϊνών. Αυτές οι συσσωματωμένες πρωτεΐνες έχουν διαφύγει ή έχουν μετατραπεί σε μηχανισμούς πρωτεόστασης οι οποίοι κανονικά διέπουν τον εντοπισμό και τον κύκλο εργασιών τους. Οι αιτίες που οφείλεται αυτή η διάσπαση στην πρωτεόσταση ποικίλλουν τόσο όσο οι ίδιες οι πρωτεΐνες που συσσωρεύονται. Ορισμένοι, όπως ο μικροσωληνίσκος που συνδέει την πρωτεΐνη tau (MAPT, tau) στη νόσο Alzheimer, συσσωματώνονται μετά από ανώμαλα πρότυπα φωσφορυλίωσης, ενώ άλλοι, όπως οι tau στη νόσο του Pick ή huntingtin στη νόσο του Huntington, συσσωματώνονται λόγω μεταλλάξεων ή πεπτιδικών επεκτάσεων. Οποιοσδήποτε διεργασίες και μηχανισμοί χρησιμεύουν ως ώθηση για τη συσσωμάτωση, αυτές οι πρωτεΐνες, καταλήγουν σε μη φυσιολογική ρύθμιση και συχνά παρουσιάζουν αρνητική επίδραση στη νευρική βιολογία. Οι Hsp70, ένας μοριακός συνοδός που υδρολύει το ATP για να διπλώσει πρωτεΐνες σε λειτουργική κατάσταση, με το υπόλοιπο δίκτυο μοριακών συνοδών να ρυθμίζει την αναδίπλωση πρωτεϊνών, την ταξινόμηση των κατεστραμμένων ή λανθασμένα πτυχωμένων πρωτεϊνών για αποικοδόμηση και την πρόληψη της συσσωμάτωσης πρωτεϊνών. Λόγω αυτών των κυτταρικών λειτουργιών, οι Hsp70 και άλλοι μοριακοί συνοδοί έχουν μελετηθεί καλά για το ρόλο τους σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Τόσο ως παθογόνοι παράγοντες όσο και ως δυνητικοί θεραπευτικοί παράγοντες. Η οικογένεια των Hsp70 αλληλεπιδρά με αρκετές οικογένειες συνοδών και ομοσυνοδών (δηλαδή - Hsp90 και οικογένεια DNAJ πρωτεϊνών) που επιτρέπουν στα μέλη της οικογένειας Hsp70 να αλληλεπιδρούν και να ρυθμίζουν μια μεγάλη ποικιλία διαταραγμένων και κατεστραμμένων πρωτεϊνών. Κατά την αλληλεπίδραση με μία μεταλλαγμένη ή λανθασμένα πτυχωμένη πρωτεΐνη, γίνεται μια μοριακή "απόφαση" ακολουθώντας τις οδηγίες από τις αλληλεπιδράσεις με άλλους μοριακούς συνοδούς και ομοσυνοδούς. Η απόφαση αυτή μπορεί να οδηγήσει στη διατήρηση ή την υποβάθμιση της δυνητικά παρεκκλίνουσας πρωτεΐνης. Πολύ συχνά σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές, συντρέχει συντήρηση δυνητικά επιβλαβών πρωτεϊνών. Αν και αυτό δεν είναι ένα σταθερό αποτέλεσμα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδράσεις με μοριακούς συνοδούς είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της παθολογίας. Ιδιαίτερα σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Αυτό το κεφάλαιο θα αναλύσει λεπτομερώς την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα μέλη της οικογένειας Hsp70 επηρεάζουν

διάφορες πρωτεΐνες νευροεκφυλιστικής νόσου και υπογραμμίζουν οποιοσδήποτε απόπειρες χρήσης των μελών της οικογένειας Hsp70 ως θεραπευτικούς στόχους στη θεραπεία αυτών των διαταραχών.

3.1 Νόσος του Αλτσχάιμερ και ταουοπάθειες

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή και η κύρια αιτία της άνοιας στις Ηνωμένες Πολιτείες. Παθολογικά, η AD χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη εξωνευρωνικών πλακών που αποτελούνται από αμυλοειδές βήτα (Αβ) και ενδονευρωνικά πεπλατυσμένα τμήματα του μικροσωληνίσκου που συνδέει την πρωτεΐνη tau (MAPT, tau). Η συσσώρευση της tau οδηγείται από επιθετική φωσφορυλίωση, θεωρούμενη ως κυτταρική απόκριση στην εξωκυτταρική συσσώρευση Αβ. Οι μεταλλάξεις της Tau, αν και τυπικά απουσιάζουν από το AD, είναι συνήθεις σε μια ομάδα νευροεκφυλιστικών διαταραχών που δεν είναι AD, συλλογικά γνωστές ως ταουοπάθειες. Αυτές οι διαταραχές, παρόμοιες με την AD, χαρακτηρίζουν την ενδοκυτταρική συσσώρευση tau, μειωμένη γνωστική ικανότητα και προοδευτική απώλεια νευρώνων. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν εγκεκριμένες θεραπευτικές ουσίες για τη θεραπεία της μοριακής παθογένειας του AD και δεν έχουν εγκριθεί από την FDA και όλες οι εγκεκριμένες θεραπείες είναι συντηρητικές. Πρόσφατα, έχουν σημειωθεί πρόοδοι σε αρκετά μικρά μόρια ικανά να ρυθμίζουν μοριακούς συνοδούς οι οποίοι έχουν αποδείξει ευεργετικά αποτελέσματα για μοντέλα ταουοπάθειας. Εδώ θα συζητήσουμε τους ρόλους των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στη ρύθμιση των tau και Αβ, βάσει της διαθέσιμης βιβλιογραφίας. Η πρώτη απόδειξη του ρόλου των Hsp70 στο AD αναγνωρίστηκε όταν τα επίπεδα των Hsp70 βρέθηκαν να είναι αυξημένα στους εγκεφάλους των ασθενών με AD [153]. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα Hsp70 και Hsp90 συσχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα αδιάλυτης tau και αυξημένης συσχέτισης ταυ-μικροσωληνίσκων [177]. Ένα ενδιαφέρον φαινόμενο ήταν η ταυτοποίηση ενός πληθυσμού Hsp90 στον κροταφικό φλοιό, αλλά όχι η παρεγκεφαλίδα των ασθενών με AD που είχαν αυξημένη συγγένεια με το συνένζυμο ATP [178]. Η αυξημένη συγγένεια του Hsp90 για ATP σήμαινε επίσης ότι η Hsp90 στον εγκέφαλο με AD είχε αυξημένη συγγένεια για αναστολείς Hsp90 μικρού μορίου. Η αναστολή των Hsp90 μείωσε τα διαλυτά επίπεδα tau σε κύτταρα που έλαβαν αυτές τις ενώσεις. Τα ευρήματα αυτά αντικατόπτριζαν ένα παρόμοιο φαινόμενο που βρέθηκαν σε καρκινικά κύτταρα και όγκους ασθενών που εμφάνισαν Hsp90 με αυξημένη συγγένεια για την ATP και ευαισθησία των σχετιζόμενων με Hsp90 ογκογόνων στην αναστολή Hsp90. Ωστόσο, πριν συναντήσουμε και αλληλεπιδράσαμε με Hsp90, βρέθηκε ότι το tau αλληλεπιδρά με τις Hsc70 ή Hsp70, δύο μέλη της οικογένειας κυτοσωλικών Hsp70. Τα Hsc70 και Hsp70 ρυθμίζουν τις «ταξινομικές αποφάσεις» για την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα ή μέσω των μηχανισμών αυτοφαγίας. Η αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων ή η απομάκρυνση των tau από τους μικροσωληνίσκους οδηγεί σε αλληλεπίδραση μεταξύ tau και Hsc70 [179]. Μόλις σχηματιστεί, το σύμπλοκο αυτό σταθεροποιεί το tau, προστατεύοντας από την πρωτεασωματική υποβάθμιση. Επιπροσθέτως, η παρουσία του Bcl2-συσχετιζόμενου αθανογόνου-1 (BAG-1), ενός συζυγούς Hsc70, αποτρέπει την πρωτεασωματική αποικοδόμηση των tau. Αυτό είναι, ωστόσο, αναστρέψιμο από την επαγωγή ή υπερέκφραση του Hsp70 ή από την αποσιώπηση του BAG-1. Η Hsp70, μέσω αλληλεπιδράσεων με CHIP (πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με Hsc70), μια λιγάση ουρίας E3, προάγει την ουβικουτινίωση και την tau. Μετά την ουβικουτινίωση, οι tau είναι στοχευμένες για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα [154]. Μαζί, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι Hsc70 μπορεί να διατηρήσει τις tau

ενώ η αλληλεπίδραση των tau με Hsp70 μπορεί να προωθήσει την αποικοδόμηση. Παρόμοια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί και με άλλες πρωτεΐνες-πελάτες αμφότερων των Hsp70 και Hsc70. Αυτό υποδηλώνει ότι τα νευρωνικά επίπεδα των Hsc70 και Hsp70, και ίσως ο σημαντικότερος λόγος μεταξύ αυτών των δύο πρωτεϊνών, μπορεί να είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που διέπει τη συσσώρευση ή την κάθαρση των tau. Τα χαμηλά επίπεδα κυττάρων των Hsp70 και CHIP μπορούν να ελέγξουν τα βασικά επίπεδα της "νοικοκυροσύνης" του κύκλου εργασιών και της υποβάθμισης των tau, ενός μονοπατιού που έχει καλύτερη πρόσβαση από τις tau όταν περισσότερες Hsp70 είναι διαθέσιμες για να παρουσιάσουν τις tau στο CHIP. Αυτές οι ιδέες συμφωνούν με τα ευρήματα ότι η Hsp70 ρυθμίζει διαφορετικά τις ισομορφές tau και μπορεί να λειτουργήσει κατά κύριο λόγο στη ρύθμιση των δυσλειτουργικών ισομορφών tau, [155] Τα μέλη της οικογένειας Hsp70, μέσω αλληλεπιδράσεων με ξεχωριστές πρωτεΐνες DNAI, συσχετίστηκαν επίσης με την παθολογική εξάπλωση των tau. Ένα φαινόμενο που πιστεύεται ότι αποτελεί μείζονα κινητήρια δύναμη της εξέλιξης της νόσου του Alzheimer. Το σύμπλοκο των DNAJC5 και Hsc70 βρέθηκε ότι προάγει την εξωκυτταρική απελευθέρωση του tau μέσω SNARE και SNAP-23. Αυτή η απελευθέρωση δεν περιοριζόταν στις tau, αλλά ήταν επίσης ικανή να εξάγει α-συνουκλείνη και TDP-43 (πρωτεΐνη δεσμεύσεως DNA TAR 43). Ο μηχανισμός αυτός αρχικά υποτίθεται ότι είναι προστατευτικός. Ωστόσο, οι πρόσφατες έρευνες σχετικά με τους μηχανισμούς και τα αποτελέσματα της εξάπλωσης tau σε AD και σε άλλες ταουοπάθειες [180], [126], υποδηλώνουν ότι, αν και το σύμπλοκο DNAJC5 και Hsc70 μπορεί να λειτουργεί και να προστατεύει τους νευρώνες, αναγκάζοντας την απελευθέρωση των παθογόνων ειδών tau, το DNAJC5 και το tau μπορεί να δουλεύουν, σώζοντας το κύτταρο σε βάρος του περιβάλλοντος ιστού και οργανισμού.

Επί του παρόντος, μικρά μόρια ικανά να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα Hsp70 και Hsc70 είναι υπό έρευνα ως θεραπευτικές στρατηγικές αντι-ταου. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε μελέτες που χρησιμοποιούν μοντέλα in vitro και ποντίκια με ταουοπάθεια. Οι εργασίες από τις ομάδες Dickey και Gestwicki αναγνώρισαν και χαρακτήρισαν αναστολείς μικρών μορίων, καθώς και ενεργοποιητές, των Hsc70 / Hsp70. Ενεργοποίηση σταθεροποιημένου tau Hsp70, πιθανώς παρακάμπτοντας τις tau μέσω ενός μη παραγωγικού κύκλου αναδίπλωσης ή ενεργοποιώντας επιλεκτικά Hsc70. Αντιστρόφως, η αναστολή της Hsp70 μείωσε τα επίπεδα tau τόσο in vitro όσο και in vivo, με αποτέλεσμα την ουβικουιτίνη και την υποβάθμιση των tau [156]. Επιπλέον, το «χρυσό πρότυπο» για αναστολείς μικρών μορίων των Hsp90 είναι η επαγωγή των Hsp70 μετά από θεραπεία. Έτσι, υποτίθεται ότι η αναστολή των Hsp90, η οποία μπορεί να βοηθήσει στην κάθαρση των tau, θα οδηγήσει στη συνέχεια την επαγωγή της Hsp70. αυξάνοντας έτσι τα νευρωνικά επίπεδα της Hsp70 η οποία δείχθηκε ότι προάγει την κάθαρση των tau καθώς επίσης παρέχει νευροπροστασία έναντι της απόπτωσης.

3.2 Hsp70 και Βήτα αμυλοειδές

Αν και δεν συσχετίζεται τυπικά με κυτοσολικούς συνοδούς, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η Hsp70 μπορεί να ρυθμίσει την εξωκυτταρική Αβ. Χρησιμοποιώντας ένα ανασυνδυασμένο μοντέλο, ένας συνδυασμός Hsp70 με την συν-συνοδό Hsp40 θα μπορούσε να εμποδίσει τις πρώιμες φάσεις της συσσωμάτωσης Αβ. Η δραστηριότητα αυτή εξαρτάται από τη δραστηριότητα της ΑΤΡάσης της Hsp70 καθώς θα μπορούσε να τροποποιηθεί με μικρά μόρια ικανά να ενισχύσουν ή να αναστείλουν αυτές τις λειτουργίες. Αν και αυτές οι αλληλεπιδράσεις παραμένουν ανεξερεύνητες, υποδηλώνει ότι οι εξωγενείς ή εξωκυτταρικοί συνοδοί από την οικογένεια Hsp70, εάν λειτουργούν, θα μπορούσαν να ρυθμίσουν τη συσσώρευση και την παθογένεια των Αβ σε ασθενείς με AD.

3.3 Νόσος του Πάρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (PD) είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή που προκαλείται από μειωμένα επίπεδα ντοπαμίνης στον εγκέφαλο από τους κατεστραμμένους νευρώνες. Το PD επηρεάζει το 1% όλων των ατόμων ηλικίας άνω των 60 ετών και περιλαμβάνει συμπτώματα όπως αργή κίνηση, δυσκαμψία και απώλεια ισορροπίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η PD και η πρόοδος για τη δημιουργία άνοιας σε προσβεβλημένα άτομα. Ενώ μερικά φάρμακα όπως οι προαγωγείς ντοπαμίνης και τα φάρμακα κατά του τρόμου μπορούν να βοηθήσουν στη συμβολή των συμπτωμάτων του PD, δεν υπάρχει επί του παρόντος καμία θεραπεία για την πλήρη θεραπεία της νόσου [157]. Η εξέλιξη της PD είναι το αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των πρίον πρωτεϊνών που ομοιάζουν με: α-συνουκλεΐνη (α-syn) και Parkin, που βρίσκονται στις προσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων. Η συσσώρευση των α-syn στους νευρώνες προκαλεί τον εκφυλισμό μέσω της απώλειας των δενδριτικών σπονδύλων. Αυτά τα ανώμαλα συσσωματώματα πρωτεϊνών α-syn και Parkin στην PD αναφέρονται ως σωμάτια Lewy ή νευρικοί νεύροι ανάλογα με τη θέση τους. Η PD προχωρά επίσης από μεταλλάξεις στην πλούσια σε λευκίνη κινάση επανάληψης 2 (LRRK2). Οι μεταλλάξεις στο LRRK2 είναι η συνηθέστερη αιτία του αυτοσωματικού κυρίαρχου PD και διαπιστώνεται ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις LRRK2 έχουν συσσωματώματα α-syn συσσώρευσης, συσσωματώματα tau (που συνήθως απαντώνται στη νόσο Alzheimer) και / ή θετικά εγκλεισμένα με ουβικουΐνη.

3.4 Hsp70 και Alpha-Synuclein

Η πρόοδος της PD είναι το αποτέλεσμα της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών που ομοιάζουν με πρίον α-συνουκλεΐνη (α-syn) στην προσυναπτική τερματική και δενδριτική σπονδυλική στήλη. α-syn είναι μια διαταραγμένη πρωτεΐνη η οποία, παρόμοια με την tau, μπορεί να σχηματίσει τοξικά ολιγομερή είδη [181]. Η συσσώρευση των α-syn προάγει τον νευρικό εκφυλισμό μέσω απώλειας δενδριτικών αγκώνων. Αυτά τα ανώμαλα συσσωματώματα των α-syn στην PD σχηματίζουν συσσωρευμένες δομές συλλογικά γνωστές ως σώματα Lewy ή Lewy νευρίτες ανάλογα με τη θέση τους. Ένας σημαντικός ρόλος στα μοριακά ζεύγη είναι η διαμεσολάβηση της αποπροσαρμογής των πρωτεϊνών και η μείωση της συσσώρευσης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Θεωρείται ότι οι συνοδοί αποτελούν μέρος ενός κυτταρικού οπλοστασίου που προστατεύει από την τοξικότητα των α-syn και τα αυξανόμενα επίπεδα Hsp70 μέσω ενός διαγονιδίου ή χημικού ενεργοποιητή θα προστατεύουν τα κύτταρα από τον νευροεκφυλισμό.

Παρόμοια με τις tau, οι Hsp70 και οι CHIP, καθώς και οι Hsp90, αλληλεπιδρούν με την α -συνουκλεΐνη. Οι Hsp70 έχει αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμες για τη ρύθμιση της γενικής συσσωμάτωσης των α -syn. Επιπλέον, μια δημοσίευση το 2017 προσδιόρισε ένα σύμπλοκο μεταξύ των Hsp70 και DNAJB6 ως ένα ισχυρότερο αναστολέα της συσσωμάτωσης α -syn απ'ότι οι Hsp70 μόνο [158]. Οι CHIP, μια λιγάση ουμπικουϊτίνης, που συχνά, με Hsp70, διευκολύνει την αποικοδόμηση συσσωρευμένων πρωτεϊνών μέσω του συστήματος ubiquitin-proteasome (UPS), έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τις α -syn και Hsp70. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική από τη στιγμή που η υπερέκφραση των CHIP παρατηρήθηκε για τη μείωση του υψηλού μοριακού βάρους ολιγομερών κατά βάρος α -syn. Αυτά τα ολιγομερή στη συνέχεια εκκαθαρίστηκαν τόσο από το πρωτεάσωμα όσο και από το λυσόσωμα [159]. Οι Hsp90 επηρεάζουν επίσης τη συσσωμάτωση α -syn όπως προσδιορίζεται από *in vitro* μελέτες. Σε αυτές τις μελέτες, η αλληλεπίδραση Hsp90 με μονομερή α -syn εμπόδισε την α -syn να αλληλεπιδράσει με κυστίδια της μεμβράνης. Επιπρόσθετα, αυτή η αλληλεπίδραση προήγαγε τον σχηματισμό ινιδίων α -syn κατά τρόπο εξαρτώμενο από ATP [182]. Δυστυχώς, μόνο τα έμμεσα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η Hsp70 πιθανότατα δεσμεύει μονομερείς μορφές διαλυτής α -συνουκλεΐνης: μετά την εξάντληση Hsp70, οι αντιδράσεις α -συνουκλεΐνης επαναλήφθηκαν με ρυθμό παρόμοιο με τις αρχικές αντιδράσεις μονομερούς [183]. Ενώ το πεδίο συνεχίζει να διερευνά τους πιθανούς μηχανισμούς της επαγόμενης από α -συνουκλεΐνη τοξικότητας, *in vitro* μελέτες υποδεικνύουν ότι η Hsp70 και η CHIP πιθανώς αλληλεπιδρούν σε μια δυναμική διαδικασία για να ρυθμίσουν τη συναρμολόγηση και την αποικοδόμηση ινιδίων α -συνουκλεΐνης.

In vivo μελέτες, από τη μελέτη ιστού ασθενούς PD ή ενός μοντέλου *drosophila* με α -syn συσσώρευση, πρότεινε ότι η υπερέκφραση της Hsp70 μπορεί να είναι απόκριση στη συσσώρευση του α και μια προσπάθεια από το κύτταρο να αναστέλλει την τοξικότητα α -syn. Θεωρείται ότι η κυτταρική προσπάθεια να μετριάζεται το πρωτεοτοξικό στρες σε μοντέλα PD περιλαμβάνει την πρόσληψη μοριακών συνοδών, συμπεριλαμβανομένης της Hsp70. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από μία από τις πολλές μελέτες που δείχνουν πως η υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης στο *substantia nigra pars compacta* (SNpc) ποντικών οδήγησε σε αυξημένο επίπεδο mRNA Hsp70, όπως προσδιορίστηκε με ποσοτική PCR σε νευρώνες που ανακτήθηκαν με μικροσκοπία δέσμησης λέιζερ [41]. Μια άλλη υποστηρικτική μελέτη έδειξε ότι η χρονική απεικόνιση της φθορίζουσας επισημάνσεως α -syn έδειξε ότι ο σχηματισμός συσσωματώματος και η τοξικότητα που επάγεται από μια ακραία κολοβωμένη μορφή α -syn θα μπορούσαν να μειωθούν με την ταυτόχρονη έκφραση της Hsp70 σε ζωντανά κύτταρα [160]. Σε διαγονιδιακές μύγες με νευρωνική κατευθυνόμενη έκφραση α -syn παρουσίασαν χαρακτηριστικά συσσώρευσης α -syn παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν στην PD, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας ντοπαμινεργικών νευρώνων από ενήλικες, νηματοειδών ενδορινικών εγκλεισμάτων που περιέχουν α -syn και κινητικής δυσλειτουργίας. Η μελέτη έδειξε ότι οι μύγες που εκφράζουν άγριου τύπου (μη μεταλλαγμένες) α -syn στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες παρουσίασε μείωση των νευρώνων κατά 50% μετά από 20 ημέρες. Όταν η α -syn άγριου τύπου συν-εκφράστηκε με ανθρώπινη Hsp70, δεν παρατηρήθηκε απώλεια των νευρώνων των πτηνών στις 20 ημέρες. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα σώματα Lewy βρίσκονταν ακόμα παρόντα στους νευρώνες μετά την συν-έκφραση Hsp70, γεγονός που οδήγησε στην πεποίθηση ότι το Hsp70 λειτουργεί προστατεύοντας ντοπαμινεργικούς νευρώνες από τον εκφυλιστικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την τοξικότητα α -syn. Τα σώματα Lewy που βρέθηκαν παρόντα στους νευρώνες μετά από τη συν-έκφραση του Hsp70 δεν ήταν τοξικά, αλλά αντ' αυτού αδρανή. Τα τοξικά είδη των α -syn φαίνεται να είναι αποκλειστικά σε διαλυτές μορφές [161].

Οι Hsp70 έχουν εξερευνηθεί και από άλλους τύπους μοντέλων, συμπεριλαμβανομένου ενός μοντέλου ζυμομυκήτων PD. Κανονικά, η α -συνουκλεΐνη άγριου τύπου, μαζί με μεταλλαγμένες α -syn (όπως οι A53T και A30P), θα προκαλέσουν απόπτωση σε ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Σε αυτό το πείραμα μοντέλου ζυμομύκητα, ο κυτταρικός θάνατος παρατηρήθηκε με αποπτωτικούς δείκτες όπως η εξωτερικοποίηση της φωσφατιδυλσερίνης προκαλώντας ασυμμετρία μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και συσσώρευση αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Όταν συνεκφράζονται με Hsp70, τα κύτταρα ζυμομύκητα που εκφράζουν α -syn δεν έδειξαν κανένα από τους αποπτωτικούς δείκτες που εμφανίστηκαν προηγουμένως. Οι Hsp70, ωστόσο, δεν μείωσαν το επίπεδο έκφρασης των α -syn, υποδεικνύοντας ότι οι Hsp70 προκάλεσαν προστατευτικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για την αναστολή της επαγόμενης από α -syn απόπτωσης. Ένα άλλο μοντέλο PD που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση των αποτελεσμάτων του hsp70 περιλάμβανε ένα μοντέλο κυτταρικής καλλιέργειας της α -syn συσσωμάτωσης και σχηματισμού συμπερίληψης. Η συν-έκφραση των Hsp70 σε αυτό το μοντέλο οδήγησε σε μειωμένο σχηματισμό συσσωματωμάτων και κατέστρεψε τα αδιάλυτα στο απορρυπαντικό κλάσματα των α -syn [162]. Ένα μοντέλο αρουραίου της PD έδειξε πώς η επαγωγή της Hsp70 μείωσε τη νευροτοξικότητα σε εγκεφαλικές φέτες, που τελικά προκλήθηκαν από τη μιτοχονδριακή τοξίνη ροτενόνη. Μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της απόκρισης θερμικού σοκ, όπως μέσω της γελδαναμυκίνης (GA) η οποία επάγει την έκφραση των Hsp70 μέσω της αναστολής των Hsp90, μπορεί να είναι θεραπευτικώς σχετική για τη θεραπεία της παθολογικής κατάστασης. Παρουσιάζοντας τις Hsp70 μας έχει δείξει ότι επιταχύνει την αποικοδόμηση της α -syn μέσω CMA και έτσι προστατεύει τα κύτταρα από τον νευροεκφυλιστικό θάνατο. Αν και η Hsp70 μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση του α -syn άγριου τύπου μέσω CMA, οι μεταλλαγμένες μορφές α -syn, όπως οι A53T και A30P, είναι άνοσοι σε αποικοδόμηση με αυτοφαγία με μεσολάβηση πρόσδεσης και μπορεί ακόμη και να αναστέλλουν την οδό CMA (αυτοφαγία συνοδού).

3.5 Hsp70 και LRRK2

Παρά την επικράτηση και την εστίαση στην α -syn ως παθολογική κινητήρια δύναμη του PD, η α -syn δεν είναι μόνη στην πρωτεϊνοπάθεια η οποία είναι η PD. Οι μεταλλάξεις στο LRRK2 είναι η συνηθέστερη αιτία του αυτοσωματικού κυρίαρχου PD και διαπιστώνεται ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις LRRK2 έχουν συσσωματώματα α -syn, αδρανή tau (που συνήθως συναντώνται στη νόσο του Alzheimer) και / ή θετικές εγκλείσεις ουβικουιτίνης [163]. Η έκφραση LRRK2 σε έμβρυα Zebrafish αύξησε την ουβικουιτίνη GFP. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι το LRRK2 είναι πιο προσιτό σε παρουσία Hsp70 και ότι ορισμένα είδη LRRK2, όπως τα μονομερή ή ολιγομερή LRRK2 μπορεί να μεσολαβούν στη συσσώρευση άλλων πρωτεϊνών. Οι CHIP μπορεί να δεσμεύονται σε πολλαπλούς τομείς LRRK2 και να προάγουν την αποικοδόμηση LRRK2 σε κύτταρα HEK293. Περαιτέρω, τα επίπεδα ενεργότητας Hsp90 και CHIP είναι καθοριστικοί παράγοντες της τοξικότητας που προκαλείται από LRRK2. Την υπερέκφραση CHIP και αυξημένους ρυθμούς αποικοδόμησης LRRK2 σε κύτταρα HEK293 και επίσης μείωσε την μεσολαβούμενη από LRRK2 τοξικότητα σε κύτταρα SH-SY5Y και κύτταρα HeLa.

Μηχανισμοί παρόμοιοι με, αλλά διακριτοί από την συσσωμάτωση α -συνουκλεΐνης μπορεί να καθορίζουν τη λειτουργία και τη σταθερότητα της πλούσιας σε λευκίνη κινάσης 2 (LRRK2) στη νόσο του Parkinson. Η υποκατάσταση LRRK2 G2019S είναι η πιο κοινή σποραδική και κληρονομική μετάλλαξη που προκαλεί PD

και σχετίζεται με κυρίαρχα κληρονομική PD. Οι εγκλεισμένες LRRK2, παρόμοιες με τις α-syn που περιέχουν Lewy σώματα που βρίσκονται σε ασθενείς με Parkinson, περιέχουν επίσης μοριακούς συνοδούς. Συγκεκριμένα, οι Hsp70 και CHIP και οι BAG2 βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με LRRK2. Εξετάζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ LRRK2 και BAG2, ανακαλύφθηκε ότι η LRRK2 δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το BAG2 [164]. Ωστόσο, η υπερέκφραση του Hsc70 προήγαγε την αλληλεπίδραση του LRRK2 με το BAG2, υποδηλώνοντας ότι το BAG2 αλληλεπιδρά με το LRRK2 ειδικά μέσω της Hsc70. Αυτό το πείραμα, ωστόσο, οδήγησε σε ένα πείραμα που κατέδειξε ότι η υπερέκφραση των Hsc70 ενίσχυσε τα αποτελέσματα του LRRK2 στη συσσώρευση πρωτεϊνών αλλά δεν επηρέασε τα επίπεδα των διαλυτών LRRK2. Μια επίδραση παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στη βιολογία του όπου οι Hsc70 σταθεροποίησε τις tau, αλλά οι Hsp70 μείωσαν τη συσσώρευση του [164]. Όταν υπερεκφράστηκαν με Hsp70, η συσσωμάτωση WT LRRK2 μειώθηκε. Δεδομένου ότι οι Hsp70 μειώνουν τη συσσωμάτωση LRRK2 και αυξάνει τη θετική επίδρασή της σε επίπεδα πρωτεΐνης, η συσσώρευση πρωτεϊνών που προκαλείται από LRRK2 οφείλεται στην υψηλότερη προσπελασιμότητα παρουσία Hsp70 [184].

Τα χαρακτηριστικά των περισσότερων μορφών PD εξαρτώνται κυρίως από την α-syn, η οποία έφερε την ιδέα ότι η παρατήρηση των επιδράσεων των LRRK2 σε επίπεδα α-syn θα οδηγούσε σε ένα ακριβέστερο αντιπροσωπευτικό μοντέλο LRRK2. Αυτή η ιδέα οδήγησε σε μία μελέτη στην οποία οι LRRK2 (WT LRRK2) άγριου τύπου και η μεταλλαγμένη LRRK2 (GSLRRK2) διαμολύνθηκαν σε κύτταρα HeLa και πρωτεύοντες νευρώνες ποντικού για να παρατηρήσουν τα αποτελέσματά τους σε επίπεδα α-syn. Το μεταλλαγμένο γονίδιο, GSLRRK2, έχει βρεθεί ότι είναι η συνηθέστερη αιτία κληρονομικού PD και είναι τοξικό για τα κύτταρα λόγω της υπερβολικής ποσότητας της δραστηριότητας κινάσης. Η υπερέκφραση WT LRRK2 και GSLRRK2 οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα μεταλλαγμένων α-syn καθώς και αυξημένων ποσοτήτων ουβικουιτίνης πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας ότι το μεταλλαγμένο LRRK2 βλάπτει την πρωτεϊνική αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Αυτά τα δεδομένα οδηγούν σε ένα πείραμα που έδειξε ότι η συν-έκφραση της Hsp70 ενίσχυσε τα αποτελέσματα της αναστολής του πρωτεασώματος LRRK2 και την επακόλουθη συσσώρευση ουβικουιτίνης πρωτεϊνών. Ωστόσο, όταν υπερεκφράστηκαν με Hsp70, τόσο η συσσωμάτωση WT LRRK2 όσο και η συσσωμάτωση GSLRRK2 μειώθηκαν [164]. Ελέγχθηκε επίσης για να διαπιστωθεί εάν η συν-έκφραση των Hsp70 επηρέασε τη συσσώρευση GFP με τη μεσολάβηση LRRK2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση Hsp70 αύξησε τη συσσώρευση GFP με τη μεσολάβηση LRRK2 σε σύγκριση με τον έλεγχο. Αυτές οι έρευνες υποδεικνύουν ότι οι Hsp70 επέτρεψαν στην LRRK2 να είναι πολύ πιο προσιτή ως ένας προαγωγός συσσωμάτωσης πρωτεΐνης ή αναστολέας του πρωτεασώματος όταν είναι μονομερής ή ολιγομερής μορφής [164]. Ο μηχανισμός για τον τρόπο με τον οποίο οι Hsp70 υποβαθμίζουν την UPS του LRRK2 είναι ασαφής. Ωστόσο, αυτό το παράδειγμα μετά από αλληλεπίδραση με το Hsp70 υποδηλώνει ότι, αντίθετα με το tau, η Hsp70 μπορεί να μην χρησιμεύει πάντα για να ωφελήσει κύτταρα και νευρώνες που εκφράζουν μεταλλαγμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες.

3.6 HD και PolyQ

Σε αντίθεση με τις PD και AD, η ασθένεια του Huntington (HD) και η σπόνδυλο-παρεγκεφαλιδική αταξία (SCA) αποτελούν μέρος μιας οικογένειας νευροεκφυλιστικών διαταραχών που συνδέεται με τη συσσώρευση πρωτεϊνών με πολυγλουταμινικές επεκτάσεις (polyQ). Αυτές οι ασθένειες (διαταραχές polyQ) είναι γενετικά καθοδηγούμενες αυτοσωμικές κυρίαρχες ασθένειες. Ο κοινός παράγοντας είναι η παρουσία επαναλαμβανόμενων CAG οι οποίες μπορούν γενικά να αυξηθούν σε αριθμό. Η έκλυση

πολυγλουταμινών των πρωτεϊνών της αταξίνης προκαλεί ένα φάσμα προοδευτικών νευροεκφυλιστικών νόσων που σήμερα αποδίδονται σε μεταλλάξεις σε πάνω από 29 γονίδια. Τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η οικογένεια Hsp70 των συνοδών και των σχετικών ομοσυνοδών ρυθμίζει τη μεταλλαγμένη βιολογία της αταξίνης. Παρόμοια με την επεκταθείσα tau και polyQ, οι Hsp70 και Hsp40 απέτρεψαν τη συσσωμάτωση της μεταλλαγμένης αταξίνης-1. Οι Hsp70 βρέθηκαν να είναι προστατευτικές σε αρκετά in vivo μοντέλα πολυαταξίας [166]. Και πάλι παρόμοια με τις tau και α -syn, η πρωτεασοματική αποικοδόμηση της πολυακρυσταλλωμένης αταξίνης ρυθμίζεται από την ουβικουτίνη CHIP [165]. Αυτή η αλληλεπίδραση, κάτω από συνθήκες στρες, ρυθμίζεται από τις Hsp70. Σε HD, σχεδόν όλες οι περιπτώσεις προκαλούνται από κληρονομικά επεισόδια του αυξημένου CAG γονιδίου huntingtin, μόνο το 10% των περιπτώσεων οφείλεται σε άλλη μετάλλαξη γονιδίων [167]. Αυξημένες επαναλήψεις CAG σχηματίζουν μια αδιάλειπτη σειρά γλουταμινών που διαταράσσουν τη δομή της πρωτεΐνης. Αυτή η διαταραχή, με τη σειρά της, οδηγεί σε τοξική συσσωμάτωση.

Ο ασθενής της νόσου Huntington περιέχει 36-180 επαναλήψεις γλουταμίνης ενώ τα μη προσβεβλημένα άτομα φέρουν μόνο 6-39 επαναλήψεις [185]. Καθώς η νόσος του Huntington είναι κληρονομική, η γενετική εξέταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ενός μεταλλαγμένου γονιδίου huntingtin. Παρομοίως σε άλλες διαταραχές εκτονώσεως του πολυοργανισμού, τόσο η Hsp70 όσο και οι Hsp40 έδειξαν ότι περιορίζουν την ανώμαλη συσσώρευση huntingtin και ότι η CHIP λιγάση ουβικουτίνης αποδείχθηκε ότι προάγει την αποικοδόμηση των polyQ huntingtin. Η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων CHIP μείωσε τη συσσώρευση των huntingtin και την μειωμένη τοξικότητα που προκαλούν. Τα μοντέλα ζυμομυκήτων έδειξαν παρόμοιους ρόλους τόσο για τις Hsp70 όσο και για τις Hsp40 συν-εκφρασμένα σε μοντέλο ζυμομύκητα polyQ huntingtin. Τόσο οι Hsp70 όσο και οι Hsp40 ανέστειλαν τον σχηματισμό αδιάλυτων ινιδίων huntingtin και, αντ' αυτού, προήγαγαν τον σχηματισμό διαλυτών εγκλεισμάτων. Αυτό το πρότυπο είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε με το tau και α -synuclein: η ικανότητα των Hsp70 και των συναφών συνοδών να προωθήσουν τον σχηματισμό αποικοδόμησης ή συσσωμάτωσης (Σχήμα 1). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε in vitro [185]. Το 2010, οι Lotz et al., επισήμαναν, ότι οι Hsp70 ανέστειλαν τον σχηματισμό συσσωματωμένης πρωτεΐνης huntingtin μέσω αλληλεπίδρασης με Hsp40. Αργότερα το 2015, οι Monsellier et al., [168] έδωσε έναν χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης Hsp70 / Hsp40 / huntingtin. Η ομάδα αυτή διαπίστωσε ότι η Hsp70 αλληλεπιδρά με τα 17 αμινοξέα στο N-τερματικό άκρο της πρωτεΐνης huntingtin και με την Hsp40 και μπορεί να αναστείλει τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης huntingtin [168]. Οι Hsc70 έχουν επίσης συσχετισθεί με αδιάλυτα συσσωματώματα κυνηγετικών κυττάρων τόσο σε μοντέλα κυτταροκαλλιέργειας όσο και σε ιστό ασθενών HD. Αυτό υποδηλώνει ένα ρόλο για τις Hsc70 στη συσσώρευση του πολυκατασταλαμένου huntingtin αν αλληλεπιδράσουν με Hsp70. Ωστόσο, το εργαστήριο Morimoto ανακάλυψε έναν ενδιαφέρον ρόλο για την Hsc70 στην παθοφυσιολογία των διαταραχών polyQ. Μία προηγούμενη μελέτη διαπίστωσε ότι οι πολυαιθυλενογλυκολικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της huntingtin, της SOD1 και της αταξίνης, θα μπορούσαν να απομονώσουν ένα ομόλογο Hsp40 ζυμομυκήτων, το Sis1p. Αυτή η δέσμευση εμπόδισε τη μεταφορά πρωτεϊνών στον πυρήνα για πρωτεασομική αποικοδόμηση. οδηγώντας ενδεχομένως σε τοξικότητες που σχετίζονται με τη συσσώρευση πολυαιθυλενογλυκολιωμένων πρωτεϊνών όπως οι huntingtin. Η αυξημένη έκφραση του Sis1p αποκαθιστά την ανασταλμένη πυρηνική μεταφορά [169]. Οι Hsc70 ρυθμίζουν την ενδοκυττάρωση που προκαλείται από clatherin (CME). Μια νευρωνική διαδικασία απαραίτητη για την εσωτερίκευση υποδοχέων μεμβράνης όπως ο υποδοχέας AMPA (α -αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλ-4-ισοξαζολοπροπιονικό οξύ). Η συσσωμάτωση των διασυνδεδεμένων με polyQ πρωτεϊνών απομόνωσε τις Hsc70 μακριά από την μεμβράνη προκαλώντας ελλείμματα στην CME (Σχήμα 5). Η

αύξηση των επιπέδων Hsc70 αποκαθιστά αυτά τα ελλείμματα. Αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να οδηγήσει σε πολλά από τα γνωστικά και νευρωνικά ελλείμματα που παρατηρήθηκαν στις διαταραχές του polyQ, καθώς και σε οποιαδήποτε άλλη νευροεκφυλιστική διαταραχή που χαρακτηρίζει τη συσσώρευση πρωτεϊνών Hsc70.

3.7 Αμυοτροφική ετερόπλευρη σκλήρυνση

Αμυοτροφική ετερόπλευρη σκλήρυνση (ALS), που ονομάζεται επίσης ασθένεια Charcot ή Lou Gehrig's ασθένεια, είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που προκαλείται από την προοδευτική απώλεια φλοιώδους και νωτιαίου κινητικού των νευρώνων. Το ALS είναι μια νόσος με καθυστερημένη εμφάνιση που εμφανίζεται γύρω στην ηλικία των 60 ετών. Τα αρχικά συμπτώματα μπορεί να είναι τόσο αβλαβή όσο ο πόνος στους μύες των ποδιών, το σκόνδυμα κατά το τρέξιμο και η δυσκολία κατά την κατάποση. Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, η αδυναμία στους μύες εξαπλώνεται και τα συμπτώματα γίνονται πιο εμφανή [170]. Λόγω της αθωότητας και των παρόμοιων συμπτωμάτων με άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, είναι δύσκολο να εντοπιστεί η ALS στο αρχικό στάδιο. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις θεωρούνται σποραδικές, το 5-10% των περιπτώσεων είναι οικογενειακές ALS (fALS) που κληρονομούνται από τους γονείς του ασθενούς [171]. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει καμία θεραπεία για το ALS, το Riluzole είναι το μόνο φάρμακο που έχει εγκριθεί από την FDA για το ALS, ωστόσο, έχει μόνο μέτρια επίδραση στην επιβίωση του ασθενούς.

Η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (SOD1) είναι η πιο συνηθισμένη αιτία της οικογενειακής ALS. Το SOD1 προστατεύει τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες μετατρέπουν τα υπεροξείδια στο οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σε 20% των οικογενειών ασθενών με ALS, το SOD1 μεταλλάσσεται και συσσωματώνεται σε αδιάλυτα ενδοκυτταρικά εγκλείσματα προκαλώντας ένα τοξικό κέρδος της λειτουργίας, όπως επιβεβαιώνεται από ζωικά μοντέλα αδρανοποιημένων με δισμουτάση SOD1 [172]. Το μεταλλαγμένο SOD1 συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια του νωτιαίου μυελού προωθώντας τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την ανώμαλη παραγωγή ATP και την απόπτωση. Το μεταλλαγμένο SOD1 ρυθμίζεται από την οικογένεια Hsp70. Μέσω των αλληλεπιδράσεων με CHIP, οι Hsp70 μπορεί να προκαλέσουν την πρωτεασωματική αποικοδόμηση του SOD1 μέσω του UPS. Η Hsc70, ωστόσο, ευρέθη ότι συσχετίζεται με SOD1 σε ενδοκυτταρικά συσσωματώματα fALS [173]. Αυτό δείχνει ότι το SOD1 μπορεί να ρυθμίζεται διαφορετικά από τα Hsp70 και Hsc70, μια κατάσταση παρόμοια με την tau πρωτεΐνη στο AD συσσώρευση, ενώ η SOD1 που αλληλεπιδρά με την Hsp70 προάγει την ουβικουιτίνη και την υποβάθμιση του SOD1. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από δεδομένα από μοντέλα κινητικών νευρώνων της μεταλλαγμένης έκφρασης SOD1 που έδειξαν ότι η ανύψωση της έκφρασης Hsp70 προήγαγε μια μείωση στο συσσωματωμένο SOD1. Αυτό, με τη σειρά του, μειώνει την τοξικότητα σε αυτό το μοντέλο [174]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του HSF-1, μετά την αναστολή της Hsp90 με το παράγωγο geldanamycin 17-AAG, κατέδειξε επίσης κυτταροπροστατευτικά αποτελέσματα που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα Hsp70, μαζί με άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ [175]. Ωστόσο, η άμεση υπερέκφραση της Hsp70 in vivo δεν ανακεφαλαιώνει τα in vitro αποτελέσματα [127]. Ωστόσο, τα μοντέλα ALS in vivo παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα όταν ενεργοποιήθηκε το Hsf-1 [176]. Αυτές οι μελέτες επεξεργάστηκαν μοντέλα ποντικού fALS που χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις SOD1 με arimocloamol, έναν επαγωγέα απόκρισης θερμικού σοκ. Η θεραπεία με arimocloamol είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των συσσωματωμάτων SOD1,

καθυστέρησε την εξέλιξη του φαινοτύπου μεταλλαγμένου SOD1 και τελικά αύξησε τη διάρκεια ζωής των επεξεργασμένων μεταλλαγμένων SOD1 ποντικών. Επί του παρόντος (2017), το agimocloamol βρίσκεται υπό διερεύνηση Φάσης II / III για ασθενείς που πάσχουν από fALS που προκαλείται από μεταλλαγμένο SOD1. Έτσι, η αύξηση των επιπέδων ή της δραστηριότητας της Hsp70, σε συνδυασμό με τις άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ, μπορεί να είναι μια αποτελεσματική στρατηγική για τη θεραπεία των μεταλλαγμένων fALS που κατευθύνονται από SOD1.

3.8 Συμπερασματικά

Η οικογένεια μοριακών συνοδών Hsp70 αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετικά προσαρμοστικό και περιττό δίκτυο. Κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, η οικογένεια Hsp70, δηλαδή η Hsc70, εργάζονται για να διατηρήσουν την κυτταρική πρωτεόσταση και για να εξασφαλίσουν την σωστή κυτταρική λειτουργία. Ωστόσο, παρά την προσαρμοστική φύση αυτού του μηχανισμού, όταν ένα κύτταρο ή ένας νευρώνας μεταβαίνουν από "φυσιολογική" σε ασθενή κατάσταση, οι Hsp70 και οι άλλοι μοριακοί συνοδοί φαίνεται να προσαρμόζονται ανεπαρκώς στις νέες πρωτεϊνωματικές συνθήκες αυτού του περιβάλλοντος ασθένειας. Οι Hsc70 συχνά ενάντια στον νευρώνα διατηρώντας και ενδεχομένως διευκολύνοντας τη συσσώρευση τοξικών πρωτεϊνών που είναι επιρρεπείς σε συσσωμάτωση. Αυτές οι ενέργειες όχι μόνο δεν είναι προς το συμφέρον του κυττάρου, αλλά και λειτουργούν εναντίον του οργανισμού. Οι Hsp70, ωστόσο, φαίνονται αρκετά ικανές να ανακουφίσουν τους φαινοτύπους ασθένειας που άρχισαν με τη συσσώρευση τοξικών συσσωματωτικών πρωτεϊνών. Αυτές είναι σημαντικές εκτιμήσεις όταν προσπαθείτε να στοχεύσετε τις ενέργειες ενός μέλους οικογένειας Hsp70 ως θεραπεία για ασθένεια. Η αναστολή της Hsp70 μπορεί να είναι επωφελής, ενεργώντας για να επιβραδύνει ή να αποτρέψει τη συσσώρευση παθογόνων πρωτεϊνών. Ωστόσο, μικρά μόρια ικανά να αναστέλλουν τις Hsc70 μπορεί επίσης να είναι ικανά να αναστέλλουν τις Hsp70. Οι Hsp70, όπως καταλαβαίνουμε, είναι αρκετά ισχυρές και ικανές να καθαρίζουν συσσωρευμένες πρωτεΐνες και είναι ένας γνωστός ρυθμιστής των μηχανισμών προ-επιβίωσης (αντι-αποπτωτικών). Έτσι, οποιοδήποτε ιδανικό θεραπευτικό θα ήταν ικανό να αναστέλλει την Hsc70 ενώ ενεργοποιεί ή επάγει Hsp70. Ένας πιθανός μηχανισμός για αυτό μπορεί ήδη να υπάρχει σε γενετικό επίπεδο. Η σίγαση των Hsc70 έχει αποδειχθεί ότι επάγει την έκφραση των Hsp70 [179]. Έτσι, εργαλεία όπως οι τεχνολογίες CRISPR ή οι αναστολείς της μετάφρασης των μορφολινών δείχνουν ικανά να μειώσουν την ενδοκυτταρική δεξαμενή των Hsc70 και μπορεί να αυξήσουν επαρκώς τα επίπεδα Hsp70. Είναι, ωστόσο, ζωτικής σημασίας, για μελλοντικές μελέτες, να διασαφηνιστούν οι θεραπευτικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με την αναστολή ή καταστολή των Hsc70 σε ασθενείς με νευροτοξικές πρωτεϊνοπάθειες.

4. Συζήτηση

Όλες οι μελέτες, είτε υποστηρίζουν είτε αντιβαίνουν την εγκυρότητα των HSPs ως βιοδείκτη επίδρασης ή έκθεσης, είναι χρήσιμες για τον καθορισμό των ορίων βιολογικής έκθεσης των τοξικών ουσιών και για τη δημιουργία συνειδητοποίησης σχετικά με τις βιολογικές τους επιδράσεις. Αν και κάποιες αντιφατικές μελέτες απορρίπτουν την υπόσταση των HSPs ως βιοδείκτες σε διάφορες καταστάσεις, από την άλλη πλευρά, ενισχύουν την πιο κατάλληλη εφαρμογή των HSPs ως βιοδείκτες προτείνοντας τους τύπους οργανισμών ή τις συνθήκες όπου οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι λιγότερο κατάλληλες ή χρήσιμες. Επιπλέον, οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν επίσης ορισμένους νέους τομείς έρευνας στους ήδη προτεινόμενους οργανισμούς μοντέλων για τον ERA. Για παράδειγμα, η αναζήτηση για διακυμάνσεις εποχιακές, ατομικές, σεξουαλικές και με βάση το φύλο στα επίπεδα μόνο των HSP70 καθώς και σε συνδυασμό με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, αλατότητα, pH, οξυγόνο / υποξία κλπ.) με έμφαση στην απορρόφηση, τη συσσώρευση, την αποτοξίνωση, τις συνεργιστικές επιδράσεις, τα επίπεδα κατωφλίου και την κινητική επαγωγής των HSP στα προτεινόμενα μοντέλα είναι όλοι τομείς έγκυρης περαιτέρω εξέτασης. Περαιτέρω, θα πρέπει να διερευνηθεί η "συμπεριφορά των βιολογικών δεικτών σε ένα σύνολο οργανισμών" βάσει αυτών των κατευθυντήριων γραμμών προτού υποβληθεί πρόταση για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου. Επιπλέον, θα πρέπει επίσης να εξεταστεί η σχετική ευαισθησία της NORTH ή Western blotting για την εξακρίβωση της ταυτότητας των δύο τεχνικών για μελέτες βιοδεικτών σε προτεινόμενα οργανικά μοντέλα. Αν και τα επίπεδα των HSPs αυξάνονται με τρόπο που εξαρτάται από τη δόση και το χρόνο, αυτό είναι μόνο μέχρι ένα συγκεκριμένο όριο κάθε τοξικότητας, μετά το οποίο μειώνεται η έκφρασή τους. Αυτή η πτυχή έχει υψηλό δυναμικό για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση των μελετών θα πρέπει να διεξάγεται αρχικά για διαφορετικά χρονικά διαστήματα μαζί με τη λειτουργία των ελέγχων. Συμπερασματικά, παραμένουν δύο κύριες αντιρρήσεις. Το πρώτο είναι ότι οι συνεργιστικές επιδράσεις των τοξικών ουσιών μεταξύ τους, αλλά και με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, είναι αρκετά ισχυρές ώστε να διαταράξουν την εγκυρότητα των HSP ως βιοδείκτη τοξικότητας, έκθεσης ή επίδρασης. Αυτό είναι δεδομένου ότι το περιβάλλον λειτουργεί ως ένα «σύνολο» ως ένα δυναμικό και κυμαινόμενο σύστημα και ως εκ τούτου οι παράγοντες του αποτυγχάνουν να λειτουργούν μεμονωμένα ή σε τακτικές ακολουθίες. Η δεύτερη δυσκολία έγκειται στην έκφρασή τους σε ποικίλες καταστάσεις στρες που δεν σχετίζονται με την τοξικότητα και, ως εκ τούτου, στον τρόπο απομόνωσης και εξακρίβωσης της αιτίας από την απόκριση.

Από πρόσφατες μελέτες, γίνεται φανερό ότι οι HSP δείχνουν μεταβλητή απόκριση σε διάφορους οργανισμούς και ακόμη και σε διαφορετικούς παράγοντες πίεσης. Ως εκ τούτου, πριν από την εφαρμογή ως βιοδείκτης, η απόκριση τους θα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά έναντι διαφορετικών παραγόντων καταπόνησης. Επιπλέον, θα μπορούσαν να γίνουν ψευδείς ερμηνείες εάν χρησιμοποιούνται αποκλειστικά HSPs ως βιοδείκτες. Ωστόσο, μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι πιο αποφασιστική.

Έτσι, είναι σαφές ότι, επί του παρόντος, οι μελέτες πρωτεϊνών θερμικού σοκ παραμένουν ανίκανες να δώσουν περισσότερο από μια συνολική γενική εικόνα του περιβάλλοντος αντί για ακριβέστερες πληροφορίες σχετικά με ένα συγκεκριμένο τοξικό ή ρύπο. Απαιτείται μια πολύ συστηματικότερη μελέτη, με έμφαση στη διεύρυνση της δοκιμής μιας σειράς πιθανών τοξικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για έναν περιορισμένο αριθμό βασικών ειδών-στόχων. Επιπλέον, υπάρχει ανάγκη αναζήτησης οργάνων στόχων ειδικών για ένα συγκεκριμένο τοξικό. Με μια τέτοια συστηματική και εστιασμένη προσέγγιση, αυτοί οι βιοδείκτες θα μπορούσαν ενδεχομένως να αυξηθούν, όταν εφαρμοστούν σε σύνολα, από τις

τρέχουσες γενικές ενδείξεις που παρέχουν για να γίνουν τεχνικές που παρέχουν πολύ πιο συγκεκριμένα, χρήσιμα και ακριβή δεδομένα εύκολα εφαρμόσιμα στην περιβαλλοντική διαχείριση.

Συντομογραφίες

α-syn α-synuclein

Aβ Amyloid beta

AD Alzheimer's disease

ALS Amyotrophic lateral sclerosis

AMPA α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

BAG-1 Bcl2-associated athanogene-1

CHIP c-terminus of Hsc70 interacting protein

CME Clatherin-mediated endocytosis

fALS Familial Amyotrophic lateral sclerosis

GA Geldanamycin

HD Huntington's disease

Hsc Heat shock cognate

Hsp Heat shock protein

LRRK2 Leucine-rich repeat kinase 2

MAPT, tau Microtubule associating protein tau

PCR Polymerase chain reaction

PD Parkinson's disease

polyQ Polyglutamine-expansions

SCA Spinocerebellar ataxia

SNpc Substantia nigra pars compacta

SOD1 Superoxide dismutase 1

TDP-43 TAR DNA binding protein 43

UPS Ubiquitin-proteasome system

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ επιδεικνύουν αξιοσημείωτες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους υπό ποικίλες τοξικές συνθήκες. Μια περίοδος έρευνας που επεκτάθηκε σε πέντε δεκαετίες αποκάλυψε το μοριακό τους χαρακτηρισμό, τη γονιδιακή ρύθμιση, τα πρότυπα έκφρασης, την μεγάλη ομοιότητα σε διάφορες ομάδες και το ευρύ φάσμα λειτουργικών δυνατοτήτων. Οι λειτουργίες τους περιλαμβάνουν προστασία και ανοχή έναντι κυτταροτοξικών καταστάσεων μέσω της δραστηριότητας της μοριακής συνοδείας τους, διατηρώντας τη σταθερότητα του κυτταροσκελετού και βοηθώντας στην κυτταρική σηματοδότηση. Ωστόσο, ο ρόλος τους ως βιολογικών δεικτών για την παρακολούθηση της εκτίμησης περιβαλλοντικών κινδύνων είναι αμφισβητούμενος λόγω ορισμένων αντικρουόμενων, έγκυρων και μη έγκυρων εκθέσεων. Οι τρέχουσες γνώσεις σχετικά με την ερμηνεία των επιπέδων έκφρασης των HSP συζητήθηκαν στην παρούσα ανασκόπηση. Η υποψηφιότητα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως βιοδείκτες τοξικότητας είναι μέχρι στιγμής αναξιόπιστη λόγω των συνεργιστικών επιδράσεων των τοξικών και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η υιοθέτηση πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως "κοστούμι βιολογικών δεικτών σε ένα σύνολο οργανισμών" απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

5.1. SUMMARY

Heat shock proteins exhibit remarkable changes in their expression levels under a variety of toxic conditions. A research period extended to five decades has revealed molecular characterization, gene regulation, expression patterns, high similarity across groups, and a wide range of functional capabilities. Their functions include protection and tolerance against cytotoxic states through their molecular escort activity, maintaining cytoskeletal stability and aiding cellular signaling. However, their role as biological indicators for monitoring the environmental risk assessment is controversial due to some conflicting, valid and inappropriate reports. Current knowledge about the interpretation of HSP expression levels was discussed in this review. The application of heat shock proteins as biomarkers of toxicity is so far unreliable due to the synergistic effects of toxic and other environmental factors. The adoption of heat shock proteins as a "suit of biological markers in a set of organisms" requires further investigation.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Wicherek and J. P. Oudinet, "Environment and health-studies using biomarkers," *Folia Medica Cracoviensia*, vol. 38, no. 3-4, pp. 133–144, 1997.
- [2] M. Ponomarenko, I. Stepanenko, and N. Kolchanov, "Heat shock proteins," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, pp. 402–405, 2nd edition, 2013.
- [3] F. A. Ritossa, "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila," *Experientia*, vol. 18, no. 12, pp. 571–573, 1962.
- [4] A. Tissieres, H. K. Mitchell, and U. M. Tracy, "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs," *Journal of Molecular Biology*, vol. 84, no. 3, pp. 389–398, 1974.
- [5] S. P. Place and G. E. Hofmann, "Temperature interactions of the molecular chaperone Hsc70 from the eurythermal marine goby *Gillichthys mirabilis*," *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, no. 15, pp. 2675–2682, 2001.
- [6] S. Franzellitti and E. Fabbri, "Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 336, no. 4, pp. 1157–1163, 2005.
- [7] A. N. Boone and M. M. Vijayan, "Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 132, no. 2, pp. 223–233, 2002.
- [8] C. Singer, S. Zimmermann, and B. Sures, "Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures," *Aquatic Toxicology*, vol. 75, no. 1, pp. 65–75, 2005.
- [9] E. Warchałowska-Słiwa, M. Niklińska, A. Gorlich, P. Michailova, and E. Pyza, "Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas," *Environmental Pollution*, vol. 133, no. 2, pp. 373–381, 2005.
- [10] E. E. Deane and N. Y. S. Woo, "Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts," *Aquatic Toxicology*, vol. 79, no. 1, pp. 9–15, 2006.
- [11] I. Low-Friedrich and W. Schoeppe, "Effects of calcium channel blockers on stress protein synthesis in cardiac myocytes," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 17, no. 5, pp. 800–806, 1991.
- [12] J. Liu, K. S. Squibb, M. Akkerman, G. F. Nordberg, M. Lipsky, and B. A. Fowler, "Cytotoxicity, zinc protection, and stress protein induction in rat proximal tubule cells exposed to cadmium chloride in primary cell culture," *Renal Failure*, vol. 18, no. 6, pp. 867–882, 1996.
- [13] S. Aissa, J.-M. Porcher, A.-P. Arrigo, and C. Lambre, "Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity," *Toxicology*, vol. 145, no. 2-3, pp. 147–157, 2000.

- [14] D. Wirth, E. Christians, C. Munaut, C. Dessy, J. M. Foidart, and P. Gustin, "Differential heat shock gene HSP70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice," *Cell Stress Chaperones*, vol. 7, pp. 387–395, 2002.
- [15] F. Trautinger, I. Kindas-Mugge, R. M. Knobler, and H. Honigsmann, "Stress proteins in the cellular response to ultra violet radiation," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 35, no. 3, pp. 141–148, 1996.
- [16] H. Lin, M. Opler, M. Head, M. Blank, and R. Goodman, "Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 66, pp. 482–488, 1997.
- [17] H. Yamada and S. Koizumi, "Effect of ultraviolet irradiation on the protein synthesis of human skin cells: a study with a monochromatic ultraviolet irradiation apparatus," *Industrial Health*, vol. 41, no. 2, pp. 88–93, 2003.
- [18] H. Yamada, M. Murata, K. Suzuki, and S. Koizumi, "Ultraviolet irradiation increases the sensitivity of cultured human skin cells to cadmium probably through the inhibition of metallothionein gene expression," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 200, no. 3, pp. 251–257, 2004.
- [19] C. G. Cranfield, A. Dawe, V. Karloukovski, R. E. Dunin -Borkowski, D. de Pomerai, and J. Dobson, "Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans*," *Proceedings of the Royal Society*, vol. 271, supplement 6, pp. S436–S439, 2004.
- [20] T. Abe, T. Konishi, T. Katoh et al., "Induction of heat shock 70 mRNA by cadmium is mediated by glutathione suppressive and non-suppressive triggers," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1201, no. 1, pp. 29–36, 1994.
- [21] T. Abe, K. Yamamura, S. Gotoh, M. Kashimura, and K. Higashi, "Concentration-dependent differential effects of N-acetyl-L-cysteine on the expression of HSP70 and metallothionein genes induced by cadmium in human amniotic cells," *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, vol. 1380, no. 1, pp. 123–132, 1998.
- [22] Z. Guo, A. Ersoz, D. A. Butterfield, and M. P. Mattson, "Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: Preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid β -peptide, iron, and 3-nitropropionic acid," *Journal of Neurochemistry*, vol. 75, no. 1, pp. 314–320, 2000.
- [23] G. de Boeck, B. de Wachter, A. Vlaeminck, and R. Blust, "Effect of cortisol treatment and/or sublethal copper exposure on copper uptake and heat shock protein levels in common carp, *Cyprinus carpio*," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, pp. 1122–1126, 2003.
- [24] H. B. Chen, Y. Chan, A. C. Hung, Y. Tsai, and S. H. Sun, "Elucidation of ATP-stimulated stress protein expression of RBA- 2 type-2 astrocytes: ATP potentiate HSP60 and Cu/Zn SOD expression and stimulates pl shift of peroxiredoxin II," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 97, no. 2, pp. 314–326, 2006.
- [25] J. R. Nevins, "Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product," *Cell*, vol. 29, no. 3, pp. 913–919, 1982.

- [26] J. L. Zimmerman, W. Petri, and M. Meselson, "Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock," *Cell*, vol. 32, no. 4, pp. 1161–1170, 1983.
- [27] B. J. Wu and R. I. Morimoto, "Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 18, pp. 6070–6074, 1985.
- [28] P. M. Filipe and A. C. Fernandes, "Stress proteins," *Acta medica portuguesa*, vol. 7, no. 12, pp. 711–715, 1994.
- [29] E. Mocchegiani, L. Costarelli, R. Giacconi et al., "Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 127, no. 6, pp. 517–525, 2006.
- [30] R. I. Morimoto and M. Gabriella Santoro, "Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection," *Nature Biotechnology*, vol. 16, no. 9, pp. 833–838, 1998.
- [31] S. Kantengwa and B. S. Polla, "Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* induces a selective stress response in human monocytes macrophages (M ϕ): modulation by M ϕ differentiation and by iron," *Infection and Immunity*, vol. 61, no. 4, pp. 1281–1287, 1993.
- [32] A. Neuer, S. D. Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks, and S. S. Witkin, "The role of heat shock proteins in reproduction," *Human Reproduction Update*, vol. 6, no. 2, pp. 149–159, 2000.
- [33] L. Pospíšil and J. Čanderle, "Heat shock protein (hsp60) of chlamydial origin and fertility disturbances," *Ceska Gynekologie*, vol. 68, no. 3, pp. 186–190, 2003.
- [34] V. Ramaglia, G. M. Harapa, N. White, and L. T. Buck, "Bacterial infection and tissue-specific Hsp72, -73 and -90 expression in western painted turtles," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 138, no. 2, pp. 139–148, 2004.
- [35] R. A. Kroes, K. Abravaya, J. Seidenfeld, and R. I. Morimoto, "Selective activation of human heat shock gene transcription by nitrosourea antitumor drugs mediated by isocyanate-induced damage and activation of heat shock transcription factor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 11, pp. 4825–4829, 1991.
- [36] W. Hu, W. Wu, C. E. Verschraegen et al., "Proteomic identification of heat shock protein 70 as a candidate target for enhancing apoptosis induced by farnesyl transferase inhibitor," *Proteomics*, vol. 3, no. 10, pp. 1904–1911, 2003.
- [37] C. Brochu, A. Halmeur, and M. Ouellette, "The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 9, no. 3, pp. 294–303, 2004.
- [38] B. M. Sanders, L. S. Martin, S. R. Howe, W. G. Nelson, E. S. Hegre, and D. K. Phelps, "Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 125, no. 2, pp. 206–213, 1994.

- [39] J. E. Kammenga, M. S. J. Arts, and W. J. M. Oude-Breuil, "HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 34, no. 3, pp. 253–258, 1998.
- [40] B. J. Cochrane, R. B. Irby, and T. W. Snell, "Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Comparative*, vol. 98, no. 2-3, pp. 385–390, 1991.
- [41] B. M. Sanders and L. S. Martin, "Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples," *Science of the Total Environment*, vol. 139-140, pp. 459–470, 1993.
- [42] C. Porte, X. Biosca, M. Sole, and J. Albaiges, "The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain)," *Environmental Pollution*, vol. 112, no. 2, pp. 261–268, 2001.
- [43] I. Werner, S. J. Teh, S. Datta, X. Lu, and T. M. Young, "Biomarker responses in *Macoma nasuta* (Bivalvia) exposed to sediments from northern San Francisco Bay," *Marine Environmental Research*, vol. 58, no. 2–5, pp. 299–304, 2004.
- [44] H. C. Schroder, R. Batel, H. M. A. Hassanein et al., "Correlation between the level of the potential biomarker, heat-shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limanda limanda*: a field study in the North Sea and the English Channel," *Marine Environmental Research*, vol. 49, no. 3, pp. 201–215, 2000.
- [45] T. Heresztyn and B. C. Nicholson, "Heat shock protein 70 levels in rainbow trout primary epidermal cultures in response to 2,4-dichloroaniline exposure: a novel in vitro aquatic toxicity marker," *Environmental Toxicology*, vol. 16, no. 3, pp. 253–259, 2001.
- [46] E. Fulladosa, E. Deane, A. H. Y. Ng, N. Y. S. Woo, J. C. Murat, and I. Villaescusa, "Stress proteins induced by exposure to sublethal levels of heavy metals in sea bream (*Sparus sarba*) blood cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 20, no. 1, pp. 96–100, 2006.
- [47] M. Guizani, Y. Nogoshi, F. Ben Fredj, J. Han, H. Isoda, and N. Funamizu, "Heat shock protein 47 stress responses in Chinese hamster ovary cells exposed to raw and reclaimed wastewater," *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 14, no. 2, pp. 492–498, 2012.
- [48] J. Bierkens, J. Maes, and F. Vander Plaetse, "Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure environmental pollutants," *Environmental Pollution*, vol. 101, no. 1, pp. 91–97, 1998.
- [49] H. E. Ireland, S. J. Harding, G. A. Bonwick, M. Jones, C. J. Smith, and J. H. Williams, "Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*," *Biomarkers*, vol. 9, no. 2, pp. 139–155, 2004.
- [50] J. S. Miller-Morey and F. M. Van Dolah, "Differential responses of stress proteins, antioxidant enzymes, and photosynthetic efficiency to physiological stresses in the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 138, no. 4, pp. 493–505, 2004.

- [51] J. E. Kammenga, R. Dallinger, M. H. Donker et al., "Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment," *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 164, pp. 93–147, 2000.
- [52] M.S. J.Arts, R.O. Schill, T. Knigge, H. Eckwert, J. E. Kammenga, and H. Kohler, "Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK," *Ecotoxicology*, vol. 13, no. 8, pp. 739–755, 2004.
- [53] D.Nadeau, S. Corneau, I. Plante, G. Morrow, and R.M. Tanguay, "Evaluation for HSP70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*," *Cell Stress Chaperones*, vol. 6, pp. 153–163, 2001.
- [54] J. Homa, E. Olchawa, S. R. Sturzenbaum, A. John Morgan, and B. Plytycz, "Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions," *Environmental Pollution*, vol. 135, no. 2, pp. 275–280, 2005.
- [55] L. H. Damelin, "Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals," *Human and Experimental Toxicology*, vol. 19, no. 7, pp. 420–430, 2000.
- [56] C. A.Mandon, C. Diaz, A.-P. Arrigo, and L. J. Blum, "Chemical stress sensitive luminescent human cells: molecular biology approach using inducible *Drosophila melanogaster* hsp22 promoter," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 335, no. 2, pp. 536–544, 2005.
- [57] A. Nazir, D. K. Saxena, and D. Kar Chowdhuri, "Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals," *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1621, no. 2, pp. 218–225, 2003.
- [58] I. Mukhopadhyay, A. Nazir, D. K. Saxena, and D. K. Chowdhuri, "Toxicity of cypermethrin: Hsp70 as a biomarker of response in transgenic *Drosophila*," *Biomarkers*, vol. 7, no. 6, pp. 501–510, 2002.
- [59] I. Mukhopadhyay, D. K. Saxena, and D. K. Chowdhuri, "Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ)," *Environmental Health Perspectives*, vol. 111, no. 16, pp. 1926–1932, 2003.
- [60] P. H. Krone, S. R. Blechinger, T. G. Evans, J. A. Ryan, E. J. Noonan, and L. E. Hightower, "Use of fish liver PLHC-1 cells and zebrafish embryos in cytotoxicity assays," *Methods*, vol. 35, no. 2, pp. 176–187, 2005.
- [61] S.H. Seok, J.H. Park, M.W. Baek et al., "Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish," *Journal of Biotechnology*, vol. 126, no. 3, pp. 406–413, 2006.
- [62] S. C. Gupta, A. Sharma, M. Mishra, R. K. Mishra, and D. K. Chowdhuri, "Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?" *Life Sciences*, vol. 86, no. 11-12, pp. 377–384, 2010.
- [63] S. C. Gupta, H. R. Siddique, N. Mathur, R. K. Mishra, D. K. Saxena, and D. K. Chowdhuri, "Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: 70 kDa heat shock protein as a marker of cellular damage," *Toxicology*, vol. 238, no. 1, pp. 1–14, 2007.

- [64] S. C. Gupta, H. R. Siddique, N. Mathur et al., "Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species," *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1770, no. 9, pp. 1382–1394, 2007.
- [65] H.R. Siddique, S.C.Gupta, K.Mitra et al., "Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster*: role of ROS in modulation of HSP70, oxidative stress and apoptosis," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 28, no. 6, pp. 734–748, 2008.
- [66] H. R. Siddique, K. Mitra, V. K. Bajpai, K. Ravi Ram, D. K. Saxena, and D. K. Chowdhuri, "Hazardous effect of tannery solid waste leachates on development and reproduction in *Drosophila melanogaster*: 70 kDa heat shock protein as a marker of cellular damage," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no. 6, pp. 1652–1662, 2009.
- [67] D. Bhargav, M. Pratap Singh, R. C. Murthy et al., "Toxic potential of municipal solid waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): hsp70 as a marker of cellular damage," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 69, no. 2, pp. 233–245, 2008. [68] M. P. Singh, M. M. K. Reddy, N. Mathur, D. K. Saxena, and D. K. Chowdhuri, "Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 235, no. 2, pp. 226–243, 2009.
- [68] Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Oct 4;92(19):1564-72.
- [69] I. Nisamedtinov, G. G. Lindsey, R. Karreman et al., "The response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to sudden vs. gradual changes in environmental stress monitored by expression of the stress response protein Hsp12p," *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 6, pp. 829–838, 2008.
- [70] Y. L. Wu, X. Pan, S. P. Mudumana, H. Wang, P. W. Kee, and Z. Gong, "Development of a heat shock inducible gfp transgenic zebrafish line by using the zebrafish hsp27 promoter," *Gene*, vol. 408, no. 1-2, pp. 85–94, 2008.
- [71] F.A. C. Wieganta, J. E. M. Souren, J. van Rijn, and R. van Wijk, "Stressor-specific induction of heat shock proteins in rat hepatoma cells," *Toxicology*, vol. 94, no. 1–3, pp. 143–159, 1994.
- [72] P. E. Mirkes, B. Doggett, and L. Cornel, "Induction of a heat shock response (HSP 72) in rat embryos exposed to selected chemical teratogens," *Teratology*, vol. 49, no. 2, pp. 135–142, 1994. [73] F. Croute, B. Beau, C. Arrabit et al., "Pattern of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short- or long term exposure to cadmium," *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, no. 1, pp. 55–60, 2000.
- [73] Wang J, et al. (1993) Analysis of the function of the 70-kilodalton cyclase-associated protein (CAP) by using mutants of yeast adenyl cyclase defective in CAP binding. *Mol Cell Biol* 13(7):4087-97
- [74] S. Ait-Aïssa, O. Ausseil, O. Palluel, E. Vindimian, J. Garnier- Laplace, and J. Porcher, "Biomarker responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17 β - oestradiol," *Biomarkers*, vol. 8, no. 6, pp. 491–508, 2003.

- [75] S. M. Efremova, B. A. Margulis, I. V. Guzhova et al., "Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant," *Aquatic Toxicology*, vol. 57, no. 4, pp. 267–280, 2002.
- [76] G. Agell, M. Uriz, E. Cebrian, and R. Marti "Does stress protein induction by copper modify natural toxicity in sponges?" *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, no. 11, pp. 2588–2593, 2001.
- [77] G. Agell, X. Turon, S. De Caralt, S. Lopez-Legentil, and M. J. Uriz, "Molecular and organism biomarkers of copper pollution in the ascidian *Pseudodistoma crucigaster*," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 48, no. 7-8, pp. 759–767, 2004.
- [78] T. N. Guecheva, B. Erdtmann, M. S. Benfato, and J. A. P. Henriques, "Stress protein response and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia (Girardia) schubarti* exposed to copper," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56, no. 3, pp. 351–357, 2003.
- [79] D. Webb and M. M. Gagnon, "The value of stress protein α 70 as an environmental biomarker of fish health under field conditions," *Environmental Toxicology*, vol. 24, no. 3, pp. 287–295, 2009.
- [80] C. Urani, P. Melchiorretto, F. Morazzoni, C. Canevali, and M. Camatini, "Copper and zinc uptake and HSP70 expression in HepG2 cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 15, no. 4-5, pp. 497–502, 2001.
- [81] S. N. Pedersen, A.-K. Lundebye, and M. H. Depledge, "Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals," *Aquatic Toxicology*, vol. 37, no. 2-3, pp. 183–200, 1997.
- [82] J. M. Matz, M. J. Blake, J. T. Saari, and A. M. Bode, "Dietary copper deficiency reduces heat shock protein expression in cardiovascular tissues," *FASEB Journal*, vol. 8, no. 1, pp. 97–102, 1994.
- [83] P. F. La Porte, "Mytilus trossulus hsp70 as a biomarker for arsenic exposure in the marine environment: laboratory and real-world results," *Biomarkers*, vol. 10, no. 6, pp. 417–428, 2005.
- [84] W. F. Salminen Jr., R. Voellmy, and S. M. Roberts, "Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: the potential role of heat shock protein induction," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 147, no. 2, pp. 247–258, 1997.
- [85] F. A. C. Wiegant, J. van Rijn, and R. vanWijk, "Enhancement of the stress response by minute amounts of cadmium in sensitized Reuber H35 hepatoma cells," *Toxicology*, vol. 116, no. 1–3, pp. 27–37, 1997.
- [86] P. L. Goering, B. R. Fisher, B. T. Noren, A. Papaconstantinou, J. L. Rojko, and R. J. Marler, "Mercury induces regional and cell specific stress protein expression in rat kidney," *Toxicological Sciences*, vol. 53, no. 2, pp. 447–457, 2000.
- [87] R. Furuya, H. Kumagai, and A. Hishida, "Acquired resistance to re challenge injury with uranyl acetate in LLC-PK1 cells," *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 129, no. 3, pp. 347–355, 1997.
- [88] N. Honda and M. Sudo, "Resistance to uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits: renal function and morphology," in *Acute Renal Failure*, H. E. Eliahou, Ed., p. 105, John Libbey, London, UK, 1982.

- [89] S. Mizuno, K. Fujita, R. Furuy et al., "Association of HSP73 with the acquired resistance to uranyl acetate-induced acute renal failure," *Toxicology*, vol. 117, no. 2-3, pp. 183–191, 1997.
- [90] H. Liu, R. Lightfoot, and J. L. Stevens, "Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 9, pp. 4805–4812, 1996.
- [91] L. A. Opanashuk and J. N. Finkelstein, "Relationship of lead induced proteins to stress response proteins in astroglial cells," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 42, no. 5, pp. 623–632, 1995.
- [92] F. A. C. Wiegant, I. Y. Malyshev, A. L. Kleschyov, E. Van Faassen, and A. F. Vanin, "Dinitrosyl iron complexes with thiol containing ligands and S-nitroso-D,L-penicillamine as inductors of heat shock protein synthesis in H35 hepatoma cells," *FEBS Letters*, vol. 455, no. 1-2, pp. 179–182, 1999.
- [93] T. Lukkari, M. Taavitsainen, M. Soimasuo, A. Oikari, and J. Haimi, "Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure," *Environmental Pollution*, vol. 129, no. 3, pp. 377–386, 2004.
- [94] E. Scofield, R. T. Bowyer, and L. K. Duffy, "Baseline levels of Hsp 70, a stress protein and biomarker, in halibut from the Cook Inlet region of Alaska," *Science of the Total Environment*, vol. 226, no. 1, pp. 85–88, 1999.
- [95] P. L. Klerks and J. S. Weis, "Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review," *Environmental Pollution*, vol. 45, no. 3, pp. 173–205, 1987.
- [96] S. Shpund and D. Gershon, "Alterations in the chaperone activity of HSP70 in aging organisms," *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol. 24, no. 2, pp. 125–131, 1997.
- [97] K. A. Hoekstra, D. V. Godin, J. Kurtu, and K.M. Cheng, "Effects of oxidant-induced injury on heme oxygenase and glutathione in cultured aortic endothelial cells from atherosclerosis susceptible and -resistant Japanese quail," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 254, no. 1-2, pp. 61–71, 2003.
- [98] P. D. B. Filzek, D. J. Spurgeon, G. Broll et al., "Pedological characterization of sites along a transect from a primary cadmium/lead/zinc smelting works," *Ecotoxicology*, vol. 13, no. 8, pp. 725–737, 2004.
- [99] T. Ikemoto, T. Kunito, H. Tanaka, N. Baba, N. Miyazaki, and S. Tanabe, "Detoxification mechanism of heavy metals in marine mammals and seabirds: interaction of selenium with mercury, silver, copper, zinc, and cadmium in liver," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 47, no. 3, pp. 402–413, 2004.
- [100] T. E. Eichler, R. F. Ransom, and W. E. Smoyer, "Differential induction of podocyte heat shock proteins by prolonged single and combination toxic metal exposure," *Toxicological Sciences*, vol. 84, no. 1, pp. 120–128, 2005.
- [101] N. Saydam, F. Steiner, O. Georgiev, and W. Schaffner, "Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 34, pp. 31879–31883, 2003.

- [102] E. Fulladosa, F. Delmas, L. Jun, I. Villaescusa, and J. C. Murat, "Cellular stress induced in cultured human cells by exposure to sludge extracts from water treatment plants," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 53, no. 1, pp. 134–140, 2002.
- [103] A. Luedeking and A. Koehler, "Regulation of expression of multi xenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*," *Aquatic Toxicology*, vol. 69, no. 1, pp. 1–10, 2004.
- [104] T. Verslycke, M. Vangheluwe, D. Heijerick, K. de Schampelaere, P. van Sprang, and C. R. Janssen, "The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity," *Aquatic Toxicology*, vol. 64, no. 3, pp. 307–315, 2003.
- [105] R. Triebskorn, S. Adam, H. Casper et al., "Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms," *Ecotoxicology*, vol. 11, pp. 451–465, 2002.
- [106] I. Werner and D.E. Hinton, "Spatial profiles of hsp70 proteins in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*) in Northern San Francisco Bay may be linked to natural rather than anthropogenic stressors," *Marine Environmental Research*, vol. 50, no. 1–5, pp. 379–384, 2000.
- [107] D. Tran, J.-P. Bourdineaud, J.-C. Massabuau, and J. Garnier-Laplace, "Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: induction of multi xenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, no. 9, pp. 2278–2284, 2005.
- [108] J. Bierkens, W. van de Perre, and J. Maes, "Effect of different environmental variables on the synthesis of Hsp70 in *Raphidocelis subcapitata*," *Comparative Biochemistry and Physiology: A Molecular & Integrative Physiology*, vol. 120, no. 1, pp. 29–34, 1998.
- [109] N. Bodin, T. Burgeot, J. Y. Stanisiere et al., "Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 138, no. 4, pp. 411–427, 2004.
- [110] M. S. Hossain and Y. S. A. Khan, "Trace metals in Penaeid shrimp and Spiny lobster from the Bay of Bengal," *Science Asia*, vol. 27, pp. 165–168, 2001.
- [111] B. Hamer, D. P. Hamer, W. E. G. Muller, and R. Batel, "Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study," *Environment International*, vol. 30, no. 7, pp. 873–882, 2004.
- [112] E. Pyza, P. Mak, P. Kramarz, and R. Laskowski, "Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 38, no. 3, pp. 244–251, 1997.
- [113] J. L. Yoo and D. M. Janz, "Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological responses in fishes inhabiting a metal-contaminated creek," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 45, no. 1, pp. 110–120, 2003.
- [114] H. Ovelgonne, M. Bitorina, and R. van Wijk, "Stressor-specific activation of heat shock genes in H35 rat hepatoma cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 135, no. 1, pp. 100–109, 1995.

- [115] J. H. Ovelgonne, J. E. M. Souren, F. A. C. Wiegant, and R. van Wijk, "Relationship between cadmium-induced expression of heat shock genes, inhibition of protein synthesis and cell death," *Toxicology*, vol. 99, no. 1-2, pp. 19–30, 1995.
- [116] S. R. Sturzenbaum, M. S. J. Arts, and J. E. Kammenga, "Molecular cloning and characterization of Cpn60 in the free-living nematode *Plectus acuminatus*," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 10, no. 2, pp. 79–85, 2005.
- [117] P. L. Goering, C. L. Kish, and B. R. Fisher, "Stress protein synthesis induced by cadmium-cysteine in rat kidney," *Toxicology*, vol. 85, no. 1, pp. 25–39, 1993.
- [118] M. Murata, P. Gong, K. Suzuki, and S. Koizumi, "Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 180, pp. 105–113, 1999.
- [119] J.W. Bauman, J. Liu, and C.D. Klaassen, "Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals," *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 21, no. 1, pp. 15–22, 1993.
- [120] K. S. Ali, L. Dorgai, M. Abraham, and E. Hermes, "Tissue and stressor-specific differential expression of two hsc70 genes in carp," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 307, no. 3, pp. 503–509, 2003.
- [121] N. Hfaiedh, M. S. Allagui, A. El Feki et al., "Effects of nickel poisoning on expression pattern of the 72/73 and 94 kDa stress proteins in rat organs and in the COS-7, HepG2, and A549 cell lines," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 19, no. 1, pp. 12–18, 2005.
- [122] C. A. Downs, J. E. Fauth, and C. M. Woodley, "Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system," *Marine Biotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 380–397, 2001.
- [123] C. A. Downs, R. T. Dillon Jr., J. E. Fauth, and C. M. Woodley, "A molecular biomarker system for assessing the health of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 259, no. 2, pp. 189–214, 2001.
- [124] W. M. de Coen and C. R. Janssen, "A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, no. 9, pp. 2195–2201, 2003.
- [125] L. H. An, K. Lei, and B. H. Zheng, "Use of heat shock protein mRNA expressions as biomarkers in wild crucian carp for monitoring water quality," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 37, no. 1, pp. 248–255, 2014.
- [126] R. Guo, M. A. Lee, and J. S. Ki, "Different transcriptional responses of heat shock protein 70/90 in the marine diatom *Ditylum brightwellii* exposed to metal compounds and endocrine-disrupting chemicals," *Chemosphere*, vol. 92, no. 5, pp. 535–543, 2013.
- [127] H. H. Liu, J. Y. He, C. F. Chi, and J. Shao, "Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors," *Gene*, vol. 543, no. 1, pp. 166–117, 2014.

- [128] S. Rajeshkumar, J. Mini, and N. Munuswamy, "Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, Chennai, India," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 98, pp. 8–18, 2013.
- [129] L. Luo, C. Ke, X. Guo, B. Shi, and M. Huang, "Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary," *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 38, no. 2, pp. 318–329, 2014.
- [130] B. D. Moffat and T. W. Snell, "Rapid toxicity assessment using an in vivo enzyme test for *Brachionus plicatilis* (rotifera)," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 30, no. 1, pp. 47–53, 1995.
- [131] P. Michailova, N. Petrova, S. Bovero, G. Sella, and L. Ramella, "Structural and functional rearrangements in polytene chromosomes of Chironomids (Diptera) as biomarkers for heavy metal pollution in aquatic ecosystems," in *Proceedings of the International Conference on Heavy Metals in the Environment*, pp. 70–79, University of Michigan, Ann Arbor, Mich, USA, 2000.
- [132] P. Li, X. Xiong, G. Yang, W. Liu, H. Xu, and P. Tai, "Application of terrestrial invertebrates biomarkers in soil pollution ecology study," *Chinese Journal of Applied Ecology*, vol. 14, no. 12, pp. 2347–2350, 2003.
- [133] J. G. Bundy, D. J. Spurgeon, C. Svendsen et al., "Environmental metabonomic: applying combination biomarker analysis in earthworms at a metal contaminated site," *Ecotoxicology*, vol. 13, no. 8, pp. 797–806, 2004.
- [134] M. P. Cajaraville, M. J. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete, and A. Viarengo, "The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach," *Science of the Total Environment*, vol. 247, no. 2-3, pp. 295–311, 2000.
- [135] C. Wagner, R. Steffen, C. Koziol et al., "Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria)," *Marine Biology*, vol. 131, no. 3, pp. 411–421, 1998.
- [136] G. Wilczek, "Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders from industrially polluted areas exposed to high temperature and dimethoate," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 141, no. 2, pp. 194–206, 2005.
- [137] Smith KT, Workman JL (2012) Chromatin Proteins: Key Responders to Stress.
- [138] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Jun;16(6):574-81.
- [139] Pilon, M and Schekman, R. Protein translocation: How Hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679-682 (1999).
- [140] Bukau and Horwich, The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. (1998).
- [141] Gething, L., Attitudes to people with disabilities (1992).

[142] Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 1992 Jul 1;52(13):3648-54.

[143] Ferrarini et al., 1992, Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells.

[144] Moro and Muga, 1996, Thermal adaptation of the yeast mitochondrial Hsp70 system is regulated by the reversible unfolding of its nucleotide exchange factor.

[145] Leung and Hightower, 1999, A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family.

[146] Phillips and Silhavy, 1990, Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*.

[147] Elefant and Palter 1999, Tissue-specific expression of dominant negative mutant *Drosophila* HSC70 causes developmental defects and lethality.

[148] Creppy, 2002, Monitoring of mycotoxin biomarkers in the Czech Republic.

[149] Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007, New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor.

[150] McCarthy and Shugart, 1990, Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview.

[151] Blaise and Gagne, 2007, Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity.

[152] Westerheide and Morimoto, 2005, Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation.

[153] Yoo, B. C., Seidl, R., Cairns, N., & Lubec, G. (1999). Heat-shock protein 70 levels in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*.

Supplementum, 57, 315–322.

[154] Dickey, C. A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R. M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C. B., et al. (2007). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 648–658.

[155] Voss, K., Combs, B., Patterson, K. R., Binder, L. I., & Gamblin, T. C. (2012). Hsp70 alters tau function and aggregation in an isoform specific manner. *Biochemistry*, 51, 888–898.

[156] Abisambra, J., Jinwal, U. K., Miyata, Y., Rogers, J., Blair, L., Li, X., Seguin, S. P., Wang, L., Jin, Y., Bacon, J., et al. (2013). Allosteric heat shock protein 70 inhibitors rapidly rescue synaptic plasticity deficits by reducing aberrant tau. *Biological Psychiatry*, 74, 367–374.

[157] Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 79, 368–376.

[158] Aprile, F. A., Sormanni, P., & Vendruscolo, M. (2015). A rational design strategy for the selective activity enhancement of a molecular chaperone toward a target substrate. *Biochemistry*, 54, 5103–5112.

[159] Tetzlaff, J. E., Putcha, P., Outeiro, T. F., Ivanov, A., Berezovska, O., Hyman, B. T., & McLean, P. J. (2008). CHIP targets toxic alpha-synuclein oligomers for degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 17962–17968.

[160] Opazo, F., Krenz, A., Heermann, S., Schulz, J. B., & Falkenburger, B. H. (2008). Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging. *Journal of Neurochemistry*, 106, 529–540.

[161] Fukuzono, T., Pastuhov, S. I., Fukushima, O., Li, C., Hattori, A., Iemura, S., Natsume, T., Shibuya, H., Hanafusa, H., Matsumoto, K., et al. (2016). Chaperone complex BAG2-HSC70 regulates localization of *Caenorhabditis elegans* leucine-rich repeat kinase LRK-1 to the Golgi. *Genes to Cells*, 21, 311–324.

[162] Klucken, J., Shin, Y., Hyman, B. T., & McLean, P. J. (2004). A single amino acid substitution differentiates Hsp70-dependent effects on alpha-synuclein degradation and toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 367–373.

[163] Witt, S. N. (2010). Hsp70 molecular chaperones and Parkinson's disease. *Biopolymers*, 93, 218–228.

[164] Lichtenberg, M., Mansilla, A., Zecchini, V. R., Fleming, A., & Rubinsztein, D. C. (2011). The Parkinson's disease protein LRRK2 impairs proteasome substrate clearance without affecting proteasome catalytic activity. *Cell Death & Disease*, 2, e196.

[165] Al-Ramahi, I., Lam, Y. C., Chen, H. K., de Gouyon, B., Zhang, M., Perez, A. M., Branco, J., de Haro, M., Patterson, C., Zoghbi, H. Y., et al. (2006). CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26714–26724.

[166] Warrick, J. M., Chan, H. Y., Gray-Board, G. L., Chai, Y., Paulson, H. L., & Bonini, N. M. (1999). Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nature Genetics*, 23, 425–428.

[167] Durr, A., Gargiulo, M., & Feingold, J. (2012). The presymptomatic phase of Huntington disease. *Revue Neurologique (Paris)*, 168, 806–808

[168] Monsellier, E., Redeker, V., Ruiz-Arlandis, G., Bousset, L., & Melki, R. (2015). Molecular interaction between the chaperone Hsc70 and the N-terminal flank of huntingtin exon 1 modulates aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 2560–2576.

[169] Park, S. H., Kukushkin, Y., Gupta, R., Chen, T., Konagai, A., Hipp, M. S., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. *Cell*, 154, 134–145.

[170] Kelly, E. B. (2013). *Encyclopedia of human genetics and disease (Vol. 1)*. Santa Barbara: ABC-CLIO.

[171] Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J. R., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., & Greensmith, L. (2004). Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nature Medicine*, 10, 402–405.

[172] Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., et al. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18, 327–338.

[173] Zetterstrom, P., Graffmo, K. S., Andersen, P. M., Brannstrom, T., & Marklund, S. L. (2011). Proteins that bind to misfolded mutant superoxide dismutase-1 in spinal cords from transgenic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 20130–20136.

[174] Durham, H. D., Roy, J., Dong, L., & Figlewicz, D. A. (1997). Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56, 523–530.

[175] Batulan, Z., Taylor, D. M., Aarons, R. J., Minotti, S., Doroudchi, M. M., Nalbantoglu, J., & Durham, H. D. (2006). Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 24, 213–225.

[176] Kalmar, B., Novoselov, S., Gray, A., Cheetham, M. E., Margulis, B., & Greensmith, L. (2008). Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1 mouse model of ALS. *Journal of Neurochemistry*, 107, 339–350.

[177] Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H.

Chaperones increase association of tau protein with microtubules. (2003)

[178] Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, Ash P, Shoraka S, Zlatkovic J, Eckman CB, Patterson C, Dickson DW, Nahman NS Jr, Hutton M, Burrows F, Petrucelli L.

The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. (2007)

[179] Jinwal UK, O'Leary JC 3rd, Borysov SI, Jones JR, Li Q, Koren J 3rd, Abisambra JF, Vestal GD, Lawson LY, Johnson AG, Blair LJ, Jin Y, Miyata Y, Gestwicki JE, Dickey CA. Hsc70 rapidly engages tau after microtubule destabilization. (2010)

[180] Boluda S, Iba M, Zhang B, Raible KM, Lee VM, Trojanowski JQ. Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains.

[181] Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT Jr. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. (2002)

[182] S. Fabio Falsone, Andreas J. Kungl², Angelika Rek², Roberto Cappai³, Klaus Zangger

The molecular chaperone HSP90 modulates intermediate steps of amyloid assembly of the Parkinson-related protein α -synuclein. (2009)

[183] Kelvin C. Luk, Victoria Kehm, Jenna Carroll, Bin Zhang, Patrick O'Brien, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Non-transgenic Mice (2013)

[184] Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. (2000)

[185] Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU. Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A 97(14):7841-6 (2000)