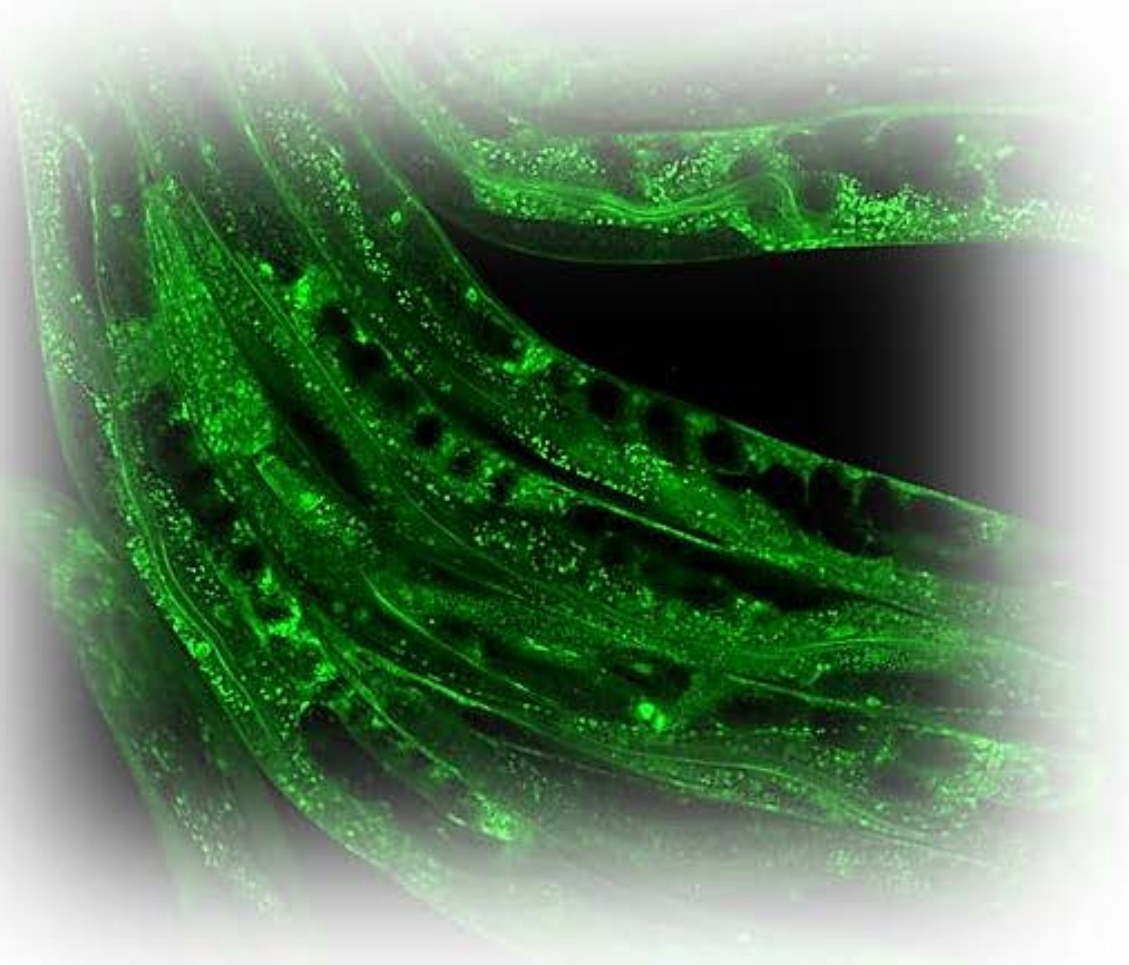


Μελέτη του ρόλου των κοκκίων RNA στην
απόκριση στο στρες και τη γήρανση του
C.elegans

Μαριάννα Καπετάνου

A.M. 1603



Επιβλέπων : Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ

Συνεπιβλέπουσα: Συντυχάκη Πόπη

Η πτυχιακή αυτή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο
«Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης» του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) , σε συνεργασία με το τμήμα Βιολογίας του
Πανεπιστημίου Κρήτης

Για την επίβλεψη και αξιολόγηση της εργάστηκαν οι:

Δρ. Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ

Δρ. Συντιχάκη Πόπη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες,

στην Δρ. Πόπη Συντυχάκη και τον Δρ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη για την ανεκτίμητη συμβολή τους, μέσω της συνεχούς καθοδήγησης, της αμέριστης υποστήριξης και της κατανόησης, αλλά και για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάδειξη των δυνατοτήτων μου,

στα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής της Γήρανσης, Άννα Βλαντή, Άρη Ρουσάκη, Μιχάλη Φασσέα, Στεφανία Πατέρα, Φανή Ρουμελιώτη, Φοίβο Μπόρμπολη, για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράστασή τους καθώς και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε κατά το χρονικό διάστημα της εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας,

στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών για την παροχή των απαραίτητων υποδομών για την εκτέλεση και ολοκλήρωσή της,

στην οικογένειά μου για την ηθική και υλική υποστήριξη που προσέφερε καθώς και στους φίλους μου για την συμπαράστασή τους.

Περίληψη

Μελέτες στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* καθώς και σε άλλους οργανισμούς-μοντέλα, έχουν καθιερώσει μια σύνδεση μεταξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης και της μακροζωίας. Η μείωση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης είναι δυνατό να επιτευχθεί μέσω μεταβολής είτε της δράσης των γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφραστικούς παράγοντες ή ρυθμιστές τους, είτε του μεταβολισμού του mRNA. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τον καίριο ρόλο συγκεκριμένων διακριτών κυτταροπλασματικών σωματιδίων mRNPs, όπως των σωματίων στρες (stress granules, SGs) και των σωματίων P (P bodies, PBs) στο μεταβολισμό του mRNA σε απόκριση διαφόρων κυτταρικών σημάτων, ωστόσο η σχέση τους με τη διαδικασία της γήρανσης δεν είχε εξεταστεί. Προκειμένου να διερευνήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που επιτρέπουν την αύξηση της διάρκειας ζωής όταν μειωθεί ο ρυθμός σύνθεσης πρωτεϊνών καθώς και την σύνδεσή τους με την απόκριση στο στρες, εστιαστήκαμε στη μελέτη παραγόντων και διεργασιών που επηρεάζουν το μεταβολισμό των μηνυμάτων RNA (mRNA) που σχετίζονται με τα SGs και PBs.

Μια πρώτη προσέγγιση στο ρόλο των SGs και των PBs στην επιβίωση των *C.elegans* μετά από συνθήκες θερμικού και οξειδωτικού στρες καθώς και μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία, πραγματοποιήθηκε μέσω μεταλλαγμένων στελεχών νηματωδών για τις βασικές συνιστώσες των SGs (*tia1*, *tia2* και *tia3*) και των PBs (*dcap-1*, *dcap-2*), καθώς και σε διαγονιδιακούς νηματώδεις που υπερεκφράζουν τις TIA1, TIA-2 και TIA3 σε αγρίου τύπου ή σε μεταλλαγμένο υπόβαθρο. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μελέτες μας, αποκαλύπτουν ότι η φυσιολογική λειτουργία των σωματίων P είναι απαραίτητη για την απόκριση σε όλες τις μορφές στρες που δοκιμάστηκαν. Μία εξαίρεση αποτελεί η κανονική ανθεκτικότητα στο θερμικό καταπόνηση των μεταλλαγμένων για το *dcap-1* νηματωδών, μόνο όμως κατά την πέμπτη ημέρα της ενηλικίωσης τους. Όταν η μεταλλαγή του *dcap-1* συνδυαστεί με μεταλλαγή του γονιδίου *ife-2*, που αποτελεί μια από τις πέντε ισομορφές του eIF4E (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4E) και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της πρωτεϊνοσύνθεσης, στο ίδιο στέλεχος προκύπτει αύξηση της ανθεκτικότητας στο θερμικό στρες ακόμη και σε σχέση με τον άγριο τύπο. Επιπλέον φαίνεται ότι υπάρχει διαφορετικός μηχανισμός απόκρισης στις διαφορετικές μορφές στρες, όπως καταδεικνύει το γεγονός ότι οι TIA2 και TIA3 είναι σημαντικές για την επιβίωση μετά από θερμικό σοκ και λιγότερο μετά από το οξειδωτικό στρες και την ακτινοβολία με UV, σε αντίθεση με την TIA1, η οποία είναι σημαντική για την επιβίωση κατά το οξειδωτικό στρες και την ακτινοβολία με UV. Επιπλέον οι μελέτες σε διαγονιδιακούς νηματώδεις δείχνουν ότι η υπερέκφραση της TIA1 παρέχει αυξημένη ικανότητα ανάκαμψης κυρίως μετά από θερμικό σοκ αλλά και ακτινοβολία με UV, ενώ της TIA2 προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα τόσο στο οξειδωτικό στρες όσο και στην UV ακτινοβολία. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων της TIA3 δρα προστατευτικά κατά το θερμικό και οξειδωτικό στρες. Παρόλο που οι TIA1 και TIA2 είναι σημαντικές για την μακροζωία, η αύξηση των επιπέδων τους δεν είχε θετικά αποτελέσματα στην διάρκεια ζωής. Τέλος, μέσω της έκφρασης των TIA1:GFP και TIA2:GFP σε διαγονιδιακούς νηματώδεις, εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών και επιτράπηκε η παρατήρηση του αυξημένου σχηματισμού κοκκίων στρες σε ολόκληρο το σώμα του *C. elegans* in vivo σε απόκριση στο θερμικό σοκ. Παράλληλα, υπήρχαν ορισμένες διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών για την TIA2 νηματωδών υποβάθρου αγρίου τύπου και των *tia1* μεταλλαγμάτων. Η παρατηρούμενος σχηματισμός κοκκίων στρες δεν οφείλεται σε μεταγραφική επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν για συνιστώσες των SGs, αλλά στην συσσώρευση των εν λόγω πρωτεϊνών.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
1 Εισαγωγή.....	6
1.1 Έναρξη της μετάφρασης και ο ρόλος του eIF4E.....	7
1.1.1 Ισομορφές του eIF4E στον <i>C.elegans</i>	9
1.2 Ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης κατά το στρες.....	10
1.3 Κοκκία Στρες (Stress granules) και σωμάτια-P (P-bodies).....	11
1.3.1 Σωμάτια P (P Bodies).....	13
1.3.2 Stress Granules (SGs).....	15
1.4 Απόκριση στο στρες.....	19
1.4.1 Απόκριση στο θερμικό σοκ.....	19
1.4.2 Μηχανισμός της προκαλούμενης από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) καταπόνησης.....	21
1.4.3 Απόκριση στην Υπεριώδη (UV) Ακτινοβολία.....	21
1.5 Γενικά χαρακτηριστικά του οργανισμού-μοντέλου <i>Ceanorhabditis elegans</i>	22
1.5.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του <i>C. elegans</i> ως οργανισμού-μοντέλου έρευνας.....	23
1.6 Στόχοι της μελέτης.....	25
2 Υλικά και Μέθοδοι.....	26
2.1 Στελέχη νηματωδών.....	26
2.2 Συντήρηση και καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους.....	27
2.2.1 Διαλύματα και Θρεπτικά μέσα για την εργαστηριακή καλλιέργεια νηματωδών.....	28
2.2.2 Βακτηριακά στελέχη για τη διατροφή των <i>C. elegans</i> και θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξή τους.....	29
2.2.2 Συντήρηση, αποθήκευση και ψύξη στελεχών <i>C. elegans</i>	30
2.2.3 Συγχρονισμός πληθυσμών.....	31
2.2.4 Αποσιώπηση γονιδίων με τη μέθοδο του RNAi (RNA interference).....	32
2.2.5 Γενετικές διασταυρώσεις.....	35
2.2.6 Έλεγχος γονιμότητας.....	36
2.2.7 Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών <i>C. elegans</i>	36
2.3 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	37
2.3.1 Παρασκευή υποστρώματος DNA για την αντίδραση PCR.....	40
2.4 Απομόνωση RNA, Δημιουργία cDNA και Ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (QRT-PCR).....	41
2.5 Δοκιμές ανθεκτικότητας στο στρες (stress resistance assays).....	42
2.5.1 Δοκιμές ανθεκτικότητας σε θερμικό σοκ (Heat-shock resistance assays).....	42
2.5.2 Δοκιμές ανθεκτικότητας στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV resistance assays).....	43
2.5.3 Δοκιμές ανθεκτικότητας στο οξειδωτικό στρες (Oxidative stress resistance assays).....	43

2.6 Ανάλυση της διάρκειας ζωής (longevity assays).....	43
2.7 Συνεστιάκο μικροσκόπιο	44
2.8 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	44
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1 Επιδράσεις των άμεσων μεταβολών των συστατικών των PBs	45
3.1.1 Αντοχή στη θερμική καταπόνηση.....	45
3.1.2 Ανθεκτικότητα στο προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) οξειδωτικό στρες	48
3.1.3 Έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία	50
3.1.4 Γονιμότητα.....	50
3.2 Επιδράσεις των άμεσων μεταβολών των συστατικών των κοκκίων στρες (SGs).....	51
3.2.1 Ανθεκτικότητα στη θερμική καταπόνηση.....	52
3.2.2 Αντοχή στο προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) οξειδωτικό στρες	56
3.2.3 Έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία	58
3.2.4 Διάρκεια ζωής.....	59
3.2.5 Γονιμότητα.....	61
3.3 Πρότυπο έκφρασης των βασικών συνιστωσών των κοκκίων στρες TIA1 και TIA2	61
3.4 Επιδράσεις του θερμικού σοκ στην γονιδιακή έκφραση	65
3.4.1 Το θερμικό σοκ επάγει την μεταγραφή της Hsp-70	65
3.4.2 Έκφραση των συνιστωσών των SGs ή των PBs σε κανονικές συνθήκες και σε αυξημένη θερμοκρασία.	66
4 Συμπεράσματα και συζήτηση	69
5 Βιβλιογραφία.....	73

1 Εισαγωγή

Η πρωτεϊνοσύνθεση αποτελεί μια βασική βιολογική διεργασία της οποίας η ρύθμιση είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη και τη συντήρηση των κυττάρων και εκτελείται σε πολλά επίπεδα και από πολλούς παράγοντες. Ταυτόχρονα είναι μια ενεργοβόρα διαδικασία που απαιτεί επάρκεια θρεπτικών συστατικών και ενέργειας. Μελέτες στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* καθώς και σε άλλους οργανισμούς-μοντέλα, έχουν καθιερώσει μια σύνδεση μεταξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης και της μακροζωίας. Στον *C. elegans*, η μείωση του ρυθμού της μετάφρασης, στους σωματικούς ιστούς ή κατά τη διάρκεια της μετα-αναπαραγωγικής περιόδου, οδηγεί σε εκτεταμένη διάρκεια ζωής. Για παράδειγμα, οι μεταλλαγές ή η απενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες έναρξης της μετάφρασης αυξάνουν τη διάρκεια ζωής^{127,105,49,19,27}. Η μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης στο σώμα έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση αναβολικού δυναμικού και ενέργειας, η οποία ενδέχεται να διοχετευτεί σε κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης και διατήρησης, οι οποίοι ρυθμίζουν την αντίσταση στο στρες και την μακροζωία σε διάφορους οργανισμούς¹ και συνεισφέροντας έτσι στην επιμήκυνση της ζωής.

Εναλλακτικά, ο μεταβολισμός του mRNA αποτελεί ένα μηχανισμό μέσω του οποίου τα κύτταρα ρυθμίζουν την σύνθεση πρωτεϊνών και την γονιδιακή έκφραση σε απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα σε επίπεδο διαφορετικό του μεταφραστικού. Ο μεταβολισμός του mRNA περιλαμβάνει παράγοντες και μονοπάτια αποθήκευσης, αποσιώπησης ή διάσπασης των κυτταροπλασματικών mRNAs που επηρεάζουν το ρυθμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης σε επίπεδο διαφορετικό του μεταφραστικού. Καθοριστικό ρόλο στην ρύθμισή του έχουν ορισμένα διακριτά κυτταροπλασματικά σωματίδια mRNPs, όπως τα κοκκία στρες (stress granules, SGs) και τα σωματίδια P (P bodies, PBs). Αν και λίγα είναι μέχρι τώρα γνωστά για τους μηχανισμούς που διέπουν τον σχηματισμό τους σε επίπεδο οργανισμού, τα σωματίδια αυτά φαίνεται να αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της απόκρισης στο στρες.

Καθώς η γήρανση μπορεί να θεωρηθεί ως μια χρόνια κατάσταση στρες, οι ισχυροί προσαρμοστικοί μηχανισμοί απαιτούνται όχι μόνο για την άμεση επιβίωση αλλά και για την επίτευξη της μακροζωίας, συσχετίζοντας την αντίσταση σε διάφορες μορφές στρες με τη μακροζωία σε πολλά είδη οργανισμών. Τόσο κατά τη διάρκεια διαφόρων στρεσογόνων συνθηκών όσο και κατά τη γήρανση διαταράσσεται η ομοιότητα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απώλεια της σταθερότητας ή και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Η ακεραιότητα του πρωτεώματος ρυθμίζεται από ένα δίκτυο γονιδίων το οποίο συνδέει τους μηχανισμούς απόκρισης στο στρες με τη διάρκεια ζωής.

Οι συνθήκες στρες όπως το θερμικό σοκ, το οξειδωτικό στρες και η UV ακτινοβολία, προκαλούν ξαφνική μεταγραφική αναστολή, ραγδαία αποσυναρμολόγηση των πολυσωμάτων και εκτεταμένο επαναπρογραμματισμό στο μεταβολισμό του mRNA, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της μεταγραφής και μετάφρασης των γονιδίων ώστε να επιδιορθωθούν οι σχετιζόμενες με το στρες βλάβες και να γίνει προσαρμογή του κυττάρου ή/και του οργανισμού στις μεταβαλλόμενες συνθήκες. Ο σχηματισμός των SGs παρέχει στα ευκαρυωτικά κύτταρα την δυνατότητα επιβίωσης κατά το στρες. Τα SGs τυπικά δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της μεταφραστικής αναστολής και συνεπώς αποτελούνται από σταματημένα εναρκτήρια σύμπλοκα και μικρές ριβοσωμικές πρωτεΐνες.

Τα συσσωρευόμενα μη μεταφρασμένα mRNA συγκεντρώνονται στα stress granules και υποβάλλονται σε μία διαδικασία μοριακής διαλογής για αποθήκευση, επανέναρξη ή διάσπαση. Παράλληλα, η μετάφραση των mRNAs που κωδικοποιούν ένζυμα επιδιόρθωσης διατηρείται ή και εντείνεται επιλεκτικά, μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων ή μη από την είσοδο στο ριβόσωμα, ενώ η έκφραση των συστατικών (house-keeping) γονιδίων καταστέλλεται. Σε συνδυασμό αυτές οι ενεργοποιούμενες από το στρες διαδικασίες αναπρογραμματίζουν συντονισμένα την μετάφραση ή την αποικοδόμηση του mRNA, με τρόπο τέτοιο ώστε να διατηρείται το αναβολικό δυναμικό και τα απαραίτητα mRNAs, άλλα και να προωθείται η επιδιόρθωση των προκαλούμενων από τον παράγοντα του στρες μοριακών βλαβών. Είναι σημαντικό ότι η απομόνωση ενός συνόλου mRNAs, των οποίων η μετάφραση έχει παγώσει, επιτρέπει την επιλεκτική σύνθεση των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την κυτταρική επιβίωση.

Ο καθορισμός της τύχης των επιμέρους μεταγράφων διαμεσολαβείται από διάφορες πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA. Σε αυτές τις RNA-προσδεδεμένες πρωτεΐνες περιλαμβάνονται οι αξιόπιστες ως δείκτες των SGs και απαραίτητες για τη συγκρότησή τους, TIA-1 (T cell internal antigen-1) και TIAR (TIA-1-related) στα θηλαστικά. Οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες δρουν έπειτα από φωσφορυλίωση του eIF2α που προκαλείται από το στρες και την επακόλουθη μεταφραστική αναστολή για την προώθηση της συγκρότησης των SGs και τη διευκόλυνση της διαλογής των mRNAs κατά τη διάρκεια του στρες, μέσω της ταξινόμησης των μη μεταφράσιμων προεναρκτήριων συμπλόκων στα SGs. Οι TIA-1 και TIAR πιθανώς επηρεάζουν την συχνότητα με την οποία ορισμένα μετάγραφα επιλέγονται για μετάφραση ή διαλογή ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ πολυσωμάτων και SGs. Στον *C.elegans* οι ομόλογες των TIA-1 και TIAR πρωτεΐνες είναι οι TIA1 (C18A3.5), TIA2 (Y46G5A.13) και TIA3(C07A4.1), των οποίων η λειτουργία ερευνάται στην παρούσα μελέτη.

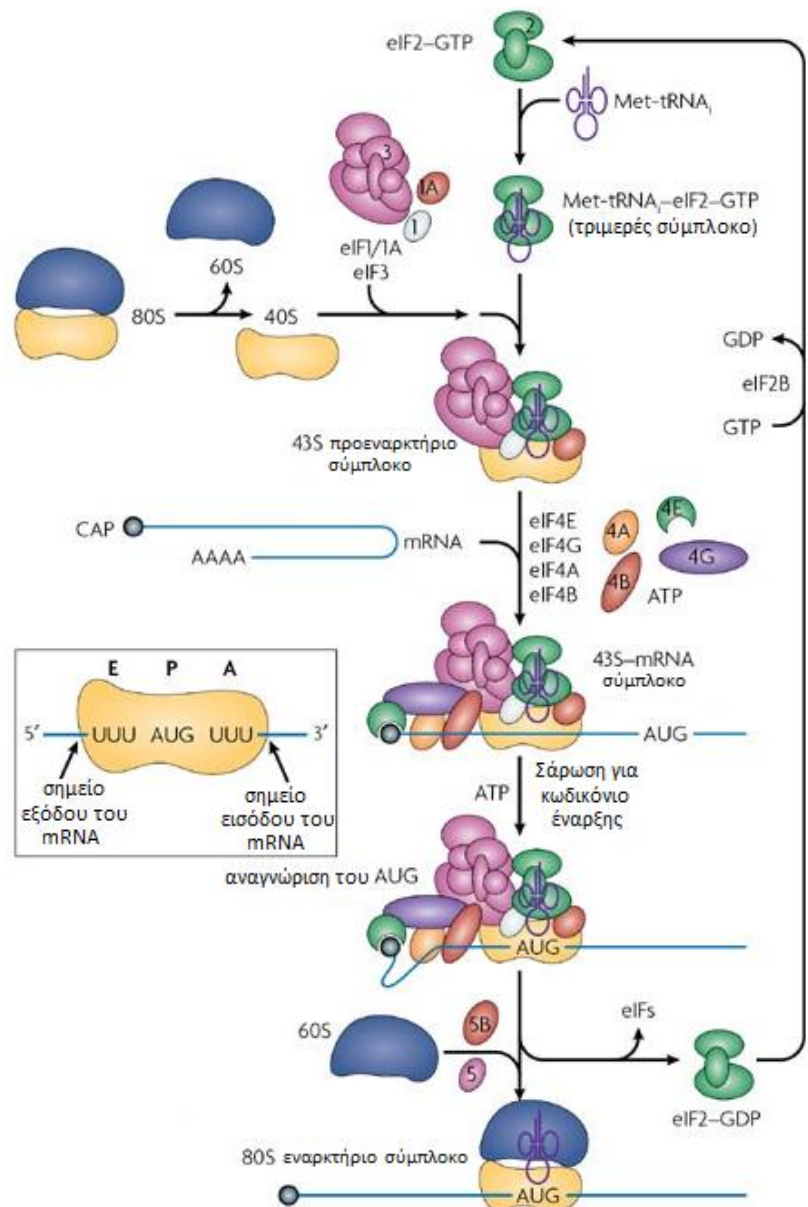
Καθώς τα SGs είναι περιοχές επιλογής των μεταγράφων για αποθήκευση, επανέναρξη ή αποικοδόμηση, τα mRNAs που προορίζονται για αποικοδόμηση, μεταφέρονται από τα SG σε σημεία αποικοδόμησης του mRNA όπως τα PBs. Τα PBs είναι διακριτές από τα SGs κυτταροπλασματικές δομές που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του mRNA, στην ανεξάρτητη από την κωδική αλληλουχία αποικοδόμηση του RNA (nonsense-mediated RNA decay, NMD) και στην διαμεσολαβούμενη από siRNA και miRNA γονιδιακή σίγηση. Συνεπώς τα P σωμάτια περιέχουν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη 5' προς 3' αποικοδόμηση του mRNA, συμπεριλαμβανομένου των ενζύμων αφαίρεσης της καλύπτρας DCAP1 και DCAP2. Τόσο τα SGs όσο και τα PBs επάγονται από το στρες, αλλά διέπονται από διαφορετικά γεγονότα σηματοδότησης, ενώ το καθένα μπορεί να υπάρξει ανεξάρτητα από το άλλο. Η δυναμική σχέση μεταξύ των SGs και PBs τονίζει τη σημασία της διαμερισματοποίησης στη ρύθμιση της μετάφρασης και αποικοδόμησης των κυτταροπλασματικών mRNA.

1.1 Έναρξη της μετάφρασης και ο ρόλος του eIF4E

Η έναρξη είναι πολύπλοκη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, απαιτώντας 13 παράγοντες έναρξης, καθένας από τους οποίους συνίσταται από ένα ή περισσότερα πολυπεπτίδια²⁹.

Ουσιαστικά, η λεπτομερής ρύθμιση και ο συντονισμός των επιμέρους γεγονότων της έναρξης επιτυγχάνεται χάρις στους παράγοντες έναρξης. Ως εκ τούτου, ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF4E), ο οποίος δεσμεύει τις καλύπτρες 7-μονομεθυλο γουανοσίνης στο 5' άκρο όλων των πυρηνικών mRNAs, είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της πρωτεϊνοσύνθεσης¹²⁸. Στον *C.elegans*, η έλλειψη του γονιδίου *ife-2* που κωδικοποιεί τον ομόλογο eIF4E αυξάνει την διάρκεια ζωής. Το θετικό αποτέλεσμα στη μακροβιότητα επιτυγχάνεται όταν η πτώση της πρωτεϊνοσύνθεσης γίνεται είτε μόνο στους σωματικούς ιστούς ή μόνο κατά την ενήλικη ζωή των νηματωδών (οπότε δεν επηρεάζεται η ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους). Έχει εξάλλου προταθεί ότι η μείωση της δράσης του μονοπατιού TOR αυξάνει τη διάρκεια ζωής μέσω της ρύθμισης της ενεργότητας των S6K και των πρωτεϊνών που προσδένονται στον eIF4E (4E-BP), η οποία οδηγεί στη μείωση του ρυθμού της μετάφρασης άρα και πρωτεϊνοσύνθεσης. Η έναρξη είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης και περιλαμβάνει αντιδράσεις που προηγούνται του σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στα δύο πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα εξασφαλίζει την πρόσδεση του ριβοσώματος στο mRNA, το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης που περιέχει το πρώτο αμινοακυλο-tRNA και την σύνδεση των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων. Αυτό το βήμα της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι αρκετά αργό και είναι ο περιοριστικός παράγοντας που καθορίζει το ρυθμό της μετάφρασης. Στους ευκαρυώτες η έναρξη ρυθμίζεται από τους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης (eukaryotic Initiation Factors, eIF), οι οποίοι σχηματίζουν σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (Εικόνα 1.1).

Η έναρξη της μετάφρασης στους ευκαρυώτες ξεκινά με τη συναρμογή ενός σύνθετου προεναρκτήριου συμπλόκου 43S που σχηματίζεται όταν οι eIF1, eIF2, eIF3, και eIF5 συνδυαστούν με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα^{29,8,52,105}. Αυτό το 43S σύμπλοκο στρατολογεί ένα mRNA με καλύπτρα 7-μεθυλογουανωσίνης και των προσδεμένων σε αυτό παραγόντων έναρξης της μετάφρασης, eIF4E, eIF4G και την προσδεμένη σε πολυ(A) πρωτεΐνη, ώστε να δημιουργηθεί το κανονικό 48S προεναρκτήριο σύμπλοκο. Το τελευταίο σαρώνει την 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR) του mRNA και σταματά στο κωδικόνιο έναρξης (συνήθως AUG), το οποίο αναγνωρίζεται από το αντικωδικόνιο του εναρκτήριου tRNA^{Met}. Η αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης προκαλεί την υδρόλυση του συνδεδεμένου στον eIF2 GTP, μια αντίδραση που καταλύεται από τον eIF5. Έπειτα, οι αρχικοί παράγοντες έναρξης (π.χ., eIF2-GDP, eIF3, eIF5, eIF1A) διαχωρίζονται από την υπομονάδα 40S και λαμβάνει χώρα η πρόσδεση της 60S υπομονάδας με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός λειτουργικού 80S ριβοσώματος. Καθώς πρόσθετα ριβοσώματα προσδένονται στην 5' καλύπτρα του mRNA δημιουργείται ένα πολύσωμα.^{8,29,52,105}



Εικόνα 1.1 Η έναρξη της μετάφρασης μπορεί να διαχωρισθεί στα διακριτά βήματα όπου σχηματίζονται σύμπλοκα με την συμμετοχή των εναρκτήριων παραγόντων της μετάφρασης που απεικονίζονται. (προσαρμογή από Fraser και Doudna, 2007)

Η αναγνώριση του 5' καλύματος του mRNA γίνεται από τον eIF4E και είναι ζωτικής σημασίας στάδιο για την στρατολόγηση του mRNA στο ριβόσωμα κατά την μετάφραση. Στους ευκαρυώτες, ο ρυθμός της εξαρτώμενης από την καλύπτρα μετάφρασης καθορίζεται κυρίως από τον εναρκτήριο παράγοντα eIF4E3. Σε ένα μικρό ποσοστό των ευκαρυωτικών mRNA παρατηρείται μετάφραση ανεξάρτητα του 5' καλύματος. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον ειδικό αυτό τύπο έναρξης είναι η ύπαρξη μίας αλληλουχίας στην 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA που αποτελεί εσωτερική θέση εισόδου στο ριβόσωμα (Internal Ribosome Entry Site, IRES).¹⁰⁵

Ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης	Λειτουργία
eIF1	Αναγνώριση AUG
eIF1A	Διευκόλυνση δέσμευσης Met-tRNA _i στην μικρή υπομονάδα
eIF2	Δέσμευση Met-tRNA _i στην μικρή υπομονάδα, GTPαση
eIF2B	Ανταλλάκτης του νουκλεοτιδίου γουανίνης του eIF2
eIF3	Διευκόλυνση δέσμευσης Met-tRNA _i και mRNA στην μικρή υπομονάδα
eIF4A	DEAD-box ελικάση
eIF4B	Προάγει την ενεργότητα του eIF4A
eIF4E	Πρόσδεση στην m ⁷ GpppX καλύπτρα
eIF4F	eIF4A, eIF4G, eIF4E σύμπλοκο
eIF4G	Δεσμεύεται σε διάφορες πρωτεΐνες (MNK1, eIF4E eIF4A, eIF3, PABP)
eIF4H	Προάγει την ενεργότητα του eIF4A
eIF5	Προάγει την υδρόλυση του GTP του eIF2
eIF5B	Ένωση των ριβοσωμικών υπομονάδων

Πινάκας 1.2: Συνοπτική απεικόνιση των εναρκτήριων παραγόντων της μετάφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

1.1.1 Ισομορφές του eIF4E στον *C.elegans*

Σχεδόν όλοι οι οργανισμοί που έχουν ελεγχθεί μέχρι σήμερα έχουν πολλά μέλη της οικογένειας eIF4E, χωρίς να έχει διευκρινιστεί πάντα ο φυσιολογικός ρόλος της κάθε μιας ισομορφής σε αυτούς. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο ισομορφές eIF4E, ο eIF4E-1 και ο 4E-HP. Στα φυτά έχουν χαρακτηριστεί τρεις ισομορφές, οι eIF4E(14,15), eIF(iso)4E(16) και CBP. Στον *C.elegans* υπάρχουν πέντε ισομορφές, οι IFE-1 έως IFE-5 (Keiper et.al.,2000). Όλοι οι eIF4E των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών χαρακτηρίζονται από εκλεκτικότητα στην πρόσδεση μονομεθυλ-καλυμμάτων, όμως στον *C.elegans* οι διαφορετικές ισομορφές έχουν διαφορετική ικανότητα στο να προσδέουν καλύμματα μονομεθυλγουανισίνης (MTG) ή τριμεθυλγουανισίνης (TMG).

Ισομορφές eIF4E του <i>C.elegans</i>	Πρόσδεση σε MTG κάλυμμα	Πρόσδεση σε TMG κάλυμμα	Χρωμόσωμα	Ιστός έκφρασης
IFE-1	+	+	III	Γαμετικά κύτταρα (germline)
IFE-2	+	+/-	X	Σωματικά κύτταρα κυρίως αλλά και γαμετικά
IFE-3	+	-	V	Γαμετικά κύτταρα
IFE-4	+	-	X	Νεύρα, μύες, φάρυγγας, γενετικός πόρος (vulva)
IFE-5	+	+	II	Γαμετικά κύτταρα

Πινάκας 1.2: Οι ισομορφές του eIF4E στον *C. elegans*, το είδος καλύμματος που προσδέουν, το χρωμόσωμα που βρίσκεται το κάθε γονίδιο καθώς και ο ιστός έκφρασής τους.

Οι eIF4E του *Caenorhabditis elegans* χωρίζονται σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη δομή τους, το είδος του καλύμματος που προσδέονται, καθώς και την επίδρασή τους στην εμβρυική βιωσιμότητα των απογόνων από άτομα που υπέστηκαν σίγηση μέσω RNAi για τα γονίδια *ife*⁷⁵:

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει την ισομορφή IFE-3 η οποία είναι απολύτως απαραίτητη για την βιωσιμότητα των εμβρύων. Παρόλο που και η ισομορφή IFE-1 μπορεί να προσδεθεί σε μονομεθυλ-καλύμματα (MTG) και εκφράζεται σε ίδια επίπεδα με τον IFE-3 δεν αρκεί για να καλύψει την απουσία του IFE-3.

Η δεύτερη ομάδα απαρτίζεται από τις IFE-1, IFE-2, IFE-5. Έχουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία και όλο προσδένονται και στα δύο είδη καλυμμάτων με τον IFE-2 να έχει μικρότερη δεσμευτική ικανότητα για το κάλυμμα 2,2,7 τριμέθυλο-γουανοσίνης. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο IFE-2 είναι η μόνη ισομορφή eIF4E στα σωματικά κύτταρα που είναι ικανή να προσδέσει καλύπτρες τόσο 7-μονομέθυλο-γουανοσίνης όσο και 2,2,7-τριμέθυλο-γουανοσίνης, των mRNAs των νηματωδών. Ο εμβρυϊκός θάνατος παρατηρείται μόνο κατά την συνδυασμένη έλλειψη δύο παραγόντων της ομάδας αυτής, με εξαίρεση τον συνδυασμό *ife-1* και *ife-5*.

Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τον IFE-4 του οποίου η αλληλουχία δε μοιάζει με τους άλλους IFEs του *C. elegans* αλλά αντίθετα με τον φυτικό nCBP και τον ανθρώπινο 4E-HP. Η έλλειψη του IFE-4 από μόνη της ή σε οποιοδήποτε συνδυασμό με τους υπόλοιπους IFEs δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των εμβρύων.

IFE-2

Το γονίδιο *ife-2* κωδικοποιεί την πιο άφθονη ισομορφή eIF4E στα σωματικά κυρίως κύτταρα του *C. elegans*. Η έλλειψη ή η απενεργοποίησή του μέσω RNAi έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεϊνσύνθεσης στα σωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την επέκταση της διάρκειας ζωής και την αύξηση της ανθεκτικότητας στο οξειδωτικό στρες. Η μακροζωία που προκύπτει από την απώλεια του IFE-2 είναι ανεξάρτητη των υπολοίπων κυρίων μηχανισμών μακροβιότητας, όπως της ινσουλίνης, του θερμιδικού περιορισμού και της αναπνευστικής αλυσίδας¹²⁷.

Σε *C. elegans* που φέρουν μεταλλαγή στο γονίδιο *ife-2* εμφανίζονται διαταραχές στην εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά μόνο όταν αυτά αναπτύσσονται σε θερμοκρασία των 25°C. Τα ζώα αυτά παράγουν μικρό αριθμό βιώσιμων απογόνων (η εμβρυϊκή ανάπτυξη σταματά ως επί το πλείστον στο στάδιο του βλαστίδιου) και αυξημένο αριθμό αρσενικών απογόνων. Επιπλέον στους 25°C παρατηρείται διαταραχή στην ωογένεση και στην σπερματογένεση. Ο φαινότυπος που παρατηρείται στους 25°C αποδίδεται στο ότι ο IFE-2 είναι απαραίτητος για τη διαδικασία του ανασυνδυασμού κατά τη μείωση. Συγκεκριμένα σχετίζεται με την επιλεκτική επαγωγή της μετάφρασης των MSH-4/HIM14 και MSH-5 οι οποίες οργανώνονται σε ένα ετεροδιμερές που ενώνεται στα χιάσματα του ανασυνδυασμού και σταθεροποιώντας τα μέχρι να δράσουν οι ενδονουκλεάσες¹²¹.

1.2 Ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης κατά το στρες

Όπως προαναφέρθηκε, η καθολική ρύθμιση της μετάφραση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ενεργότητα ή/και τη διαθεσιμότητα των δύο βασικών παραγόντων έναρξης της μετάφρασης: eIF4E και eIF2¹²⁰. Η στενή σχέση μεταξύ έναρξης της μετάφρασης και της κυτταρικής επιβίωσης αποκαλύπτεται από τις λειτουργικές επιδράσεις του eIF2-GTP-tRNAMet, δηλαδή του τριμερούς συμπλόκου που τοποθετεί το εναρκτήριο tRNAMet στην μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος κατά τη διάρκεια της συγκρότησης του 43S προεναρκτήριου συμπλόκου. Ο eIF2 αποτελείται από 3 υπομονάδες: α, β και γ⁷⁷. Η α υπομονάδα είναι ο στόχος μιας οικογένειας κινάσων σερίνης ή θρεονίνης, που περιλαμβάνει τις PKR, PERK-PEK, GCN2, HRI, οι οποίες ενεργοποιούνται από διάφορες μορφές περιβαλλοντικού στρες. Για παράδειγμα, η PKR ανιχνεύει τη θερμότητα, την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, την ιογενή λοίμωξη και το οξειδωτικό στρες¹³⁸, ενώ η PERK-PEK ανιχνεύει το στρες ενδοπλασματικού δικτύου⁵⁰. Η GCN2 αποκρίνεται στην έλλειψη αμινοξέων⁷⁸ και η HRI παρακολουθεί τις αλλαγές στη διαθεσιμότητα της αίμης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων^{48,90}. Κάθε μία από αυτές τις ενεργοποιούμενες από το στρες κινάσες φωσφορυλιώνει τον eIF2α στην σερίνη 51, μια τροποποίηση που αυξάνει την συγγένεια του eIF2 για τον eIF2B, έναν ανταλλάκτη GDP-GTP που μετατρέπει τον ανεργό eIF2-GDP στον ενεργό eIF2-GTP προάγοντας την δημιουργία του

eIF2-GTP-tRNAMet τριμερούς συμπλόκου⁷⁸. Ο φωσφορυλιωμένος eIF2α λειτουργεί ως ανταγωνιστικός αναστολέας του eIF2B, μειώνοντας τη συγκέντρωση των δραστικών τριμερών συμπλόκων με αποτέλεσμα να αποτρέπεται ο σχηματισμός του 43S προεναρκτήριου συμπλόκου και να ανακόπτεται η μετάφραση. Επομένως, καθίσταται φανερό ότι η οδός PKR/PERK/GNC2/HRI-eIF2 διαδραματίζει έναν κρίσιμο διττό ρόλο στη ρύθμιση τόσο της μετάφρασης όσο και της κυτταρικής επιβίωσης¹².

1.3 Κοκκία Στρες (Stress granules) και σωματία-P (P-bodies)

Η μετα-μεταφραστική ρύθμιση, όπως η RNA παρεμβολή, η επεξεργασία και η αποικοδόμηση των RNAs, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η άμυνα κατά των ιών, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η γονιδιακή έκφραση.

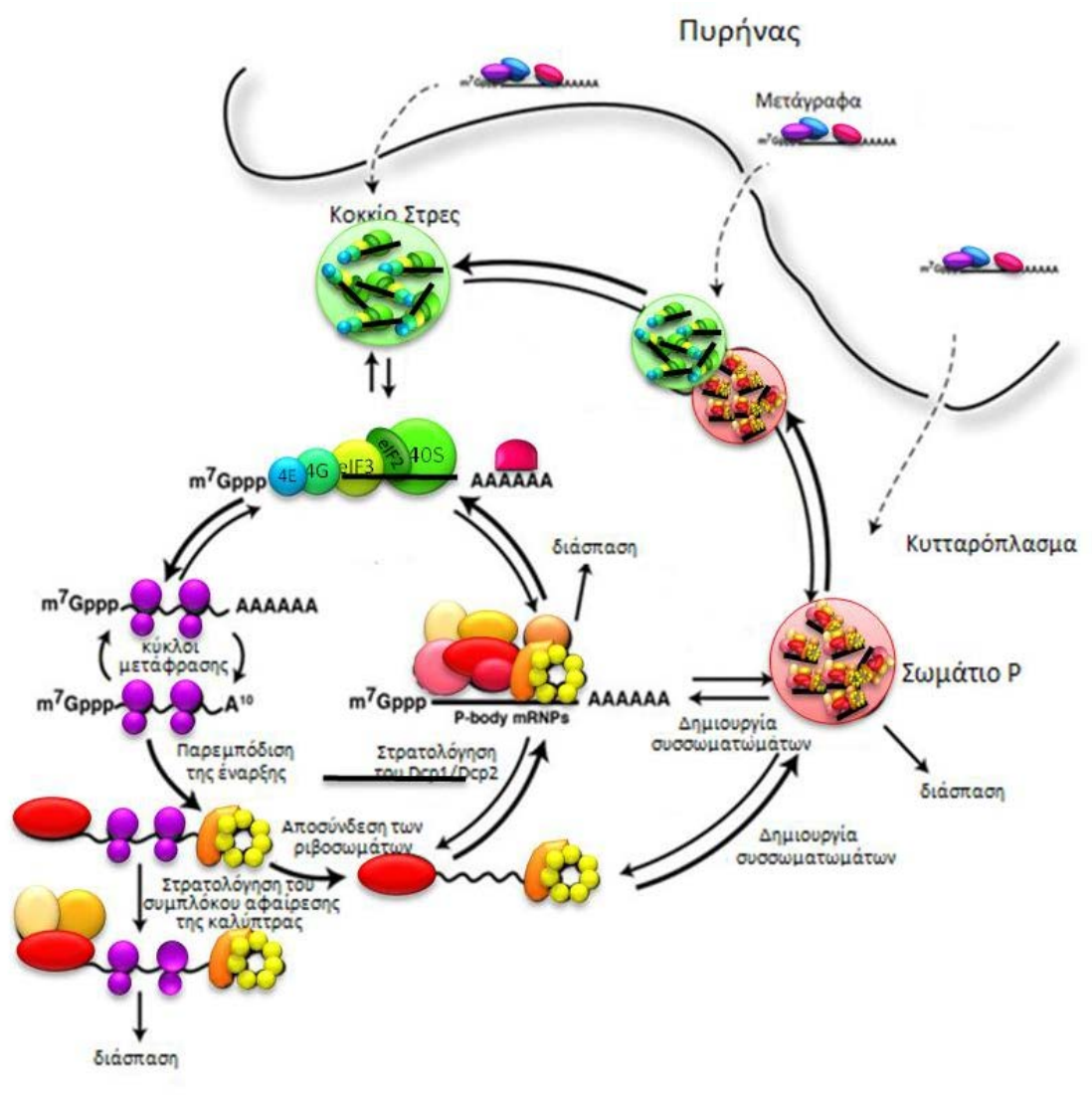
Διαφορετικές κατηγορίες ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματίων (RNP) φαίνεται να λειτουργούν σε συγκεκριμένες πτυχές του μεταβολισμού του RNA⁴. Τα κυτταροπλασματικά σωματία επεξεργασίας (Processing Bodies), ονομαζόμενα και ως σωματία-P, εμπλέκονται στην αποδόμηση του mRNA, στην ανεξάρτητη από την κωδική αλληλουχία διάσπαση του RNA (Nonsense-Mediated RNA Decay, NMD), στην διαμεσολαβούμενη από AU-πλούσια στοιχεία αποικοδόμηση του mRNA και στην διαμεσολαβούμενη από siRNA και miRNA γονιδιακή σίγηση^{25,118,117,58,86,87,117,17}. Συνεπώς τα σωματία P περιέχουν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη 5' προς 3' αποικοδόμηση του mRNA, συμπεριλαμβανομένου των ενζύμων αφαίρεσης της καλύπτρας DCAP1 και DCAP2.

Εκτός από τα σωματία-P, τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορεί να περιέχουν ένα άλλο είδος κοκκίων RNA, τα οποία ονομάζονται κοκκία στρες (stress granules) τα οποία σχετίζονται βιοχημικά και λειτουργικά με τα PBs. Τα SGs αποτελούν κυτταροπλασματικές δομές που περιέχουν mRNA, συναρμολογούνται σε απόκριση στο στρες και είναι σημαντικά για την μεταφραστική σίγηση κατά τη διάρκεια του^{76,72}. Τα συσσωρευόμενα μη μεταφρασμένα mRNA συγκεντρώνονται στα stress granules και υποβάλλονται σε μία διαδικασία διαλογής για αποθήκευση, επανέναρξη ή διάσπαση. Παράλληλα, η μετάφραση των mRNAs που κωδικοποιούν ένζυμα επιδιόρθωσης διατηρείται ή και εντείνεται επιλεκτικά, μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων ή μη από την είσοδο στο ριβόσωμα, ενώ η έκφραση των συστατικών (house-keeping) γονιδίων καταστέλλεται. Σε συνδυασμό αυτές οι ενεργοποιούμενες από το στρες διαδικασίες αναπρογραμματίζουν συντονισμένα την μετάφραση και την αποικοδόμηση του mRNA, με τρόπο τέτοιο ώστε να διατηρείται το αναβολικό δυναμικό και τα απαραίτητα mRNAs, άλλα και να προωθείται η επιδιόρθωση των προκαλούμενων από το στρες μοριακών βλαβών.

Τα SGs και τα PBs είναι διακριτές κυτταροπλασματικές δομές που περιέχουν ορισμένα κοινά συστατικά πρωτεϊνών και mRNAs καθώς και ορισμένες κοινές λειτουργικές ιδιότητες. Τα SGs αποτελούν κυτταροπλασματικά συσσωματώματα προεναρκτήριων συμπλόκων των οποίων η μεταγραφή έχει διακοπεί και συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια του στρες, ενώ τα PBs είναι διακριτές κυτταροπλασματικές περιοχές αποικοδόμησης του mRNA. Τα SGs συνδέονται με τα PBs όσον αφορά τη λειτουργία, τη σύνθεση και την χωροδιάταξη. Και οι δύο δομές επάγονται από το στρες, αλλά διέπονται από διαφορετικά γεγονότα σηματοδότησης, και το καθένα μπορεί να υπάρξει χωρίς το άλλο. Σε αντίθεση με τα SGs, των οποίων η συγκρότηση απαιτεί τη φωσφορυλίωση του eIF2α ως απόκριση σε διάφορες μορφές στρες, όπως το θερμικό σοκ, τα σωματία P είναι εμφανή και σε κύτταρα που αυξάνονται ενεργά σε μη στρεσογόνες συνθήκες^{34,106,4}.

Παρ' όλες τις διαφορές τους, έχει παρατηρηθεί μία δυναμική σύνδεση μεταξύ των SGs και των PBs. Τόσο τα SGs όσο και τα PBs διαλύονται από αναστολείς της επιμήκυνσης κατά την μετάφραση. Στα κοινά τους πρωτεϊνικά συστατικά περιλαμβάνονται: η ενεργοποιούμενη από Fas φωσφοπρωτεΐνη σερίνης / θρεονίνης (FAST), XRN1, eIF4E, RCK/p54 (Dhh1), CPEB και τριστετραπρόληνη (TTP). Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στα PBs, αλλά αναδιευθετούνται στα SGs σε απόκριση στο κυτταρικό στρες. Αντίθετα, οι TIA-1, TIAR, eIF3, G3BP, eIF4G, PABP-1 καθώς και οι 40S ριβοσωμικές υπομονάδες εντοπίζονται μόνο στα SGs, ενώ οι πρωτεΐνες του συμπλόκου αφαίρεσης της καλύπτρας DCAP-1 και DCAP2 περιορίζονται στα PBs. Επίσης, πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα SGs και τα PBs μπορούν να περιέχουν

το ίδιο είδος mRNA και να αλληλεπιδρούν in vivo, μια αλληλεπίδραση που προωθείται από παράγοντες που σχετίζονται με τη διάσπαση του mRNA TTP και BRF1P³³. Στον *C. elegans* τα σωματίδια P συνεντοπίζονται με τα κοκκία στρες¹²⁴. Έχει επίσης προταθεί ότι τα mRNAs μπορεί να κινούνται μεταξύ αυτών των δύο διαμερισμάτων. Τα PBs και τα SGs παρουσιάζουν υψηλό βαθμό της κινητικότητας όταν είναι ανεξάρτητα, αλλά η κινητικότητά τους φαίνεται να περιορίζεται όταν προσδένονται το ένα στο άλλο. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση των P-σωμάτων με τα κοκκία στρες προτείνει έναν κυτταροπλασματικό mRNP κύκλο όπου τα mRNAs ανταλλάσσονται μεταξύ πολυσωμάτων, PBs και SGs (Εικόνα 1.2)¹⁰⁶.



Εικόνα 1.2 Μοντέλο το οποίο ενσωματώνει τα κοκκία στρες και τα σωματίδια-P σε ένα mRNP κύκλο. Ένα υποθετικό των mRNP μεταβάσεων, κυρίως κατά την διάρκεια του στρες.

Τα mRNAs που απελευθερώνονται από τα αποσυναρμολογημένα πολυσώματα υφίσταται μία διαδικασία διαλογής, ταξινόμησης και mRNP αναδιαμόρφωσης στα SGs, έπειτα από την οποία επιλεγμένα μεταγράφα προωθούνται στα PBs για υποβάθμιση. Η δυναμική σχέση μεταξύ των SGs και PBs τονίζει τη σημασία της διαμερισματοποίησης στη ρύθμιση της λειτουργίας του κυτταροπλασματικού mRNA και υποστηρίζει ότι οι mRNP μεταβάσεις μεταξύ P σωμάτων και κοκκίων στρες θα έχουν επιπτώσεις στη ρύθμιση της μετάφρασης και αποικοδόμησης του mRNA.

1.3.1 Σωματίδια P (P Bodies)

Τα σωματίδια-P αποτελούν συσσωματώματα μεταφραστικά κατασταλαμένων mRNAs και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την μεταφραστική σίγηση και τους μηχανισμούς αποικοδόμησης του mRNA. Κατά συνέπεια τα σωματίδια-P περιέχουν έναν πυρήνα συστατικών που συμμετέχουν στην καταστολή της μετάφρασης και στην 5' προς 3' αποικοδόμηση του mRNA, τα οποία αναφέρονται και ως γενικός μηχανισμός καταστολής/διάσπασης. Σε αυτά περιλαμβάνονται το σύμπλοκο αφαίρεσης της καλύπτρας DCP1α / DCP2, οι συνενεργοποιητές της διαδικασίας αφαίρεσης της καλύπτρας Dhh1p/RCK/p54, Pat1p, Scd6p/RAP55, Edc3p, το σύμπλοκο Lsm1p-7p, και η εξωνουκλεάση XRN1¹⁰⁶. Στον *C. elegans*, τα ένζυμα αφαίρεσης της καλύπτρας είναι τα DCAP-1/DCAP-2^{21,84}, τα οποία συνεντοπίζονται σε κοκκία με συντηρημένα συστατικά των σωματίων P, τα οποία πιθανόν είναι ανάλογα με τα PBs του σακχαρομύκητα^{25,30,84,116,122}. Μεταξύ των συνιστωσών του γενικού μηχανισμού καταστολής/διάσπασης υπάρχει ένα πυκνό δίκτυο αλληλεπιδράσεων^{22,42,51,55,36}. Στα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες με καθιερωμένους ρόλους στην μεταφραστική καταστολή που εντοπίζονται στα PBs συμπεριλαμβάνουν το σύμπλοκο με ενεργότητα απαδενυλάσης CCR4/POP-2/NOT1, την κυτταροπλασματική προσδεδεμένη στο στοιχείο πολυαδενυλίωσης πρωτεΐνη (CPEB) και την eIF4E-T (eIF4E-binding protein)^{33,25,7}. Επιπλέον οι συνιστώσες που απαιτούνται για την NMD (π.χ. SMG5, SMG7, UPF1) και την μεσολαβούμενη από siRNA miRNA σίγηση (π.χ. πριν GW182 και RAP55) εντοπίζονται επίσης στα σωματίδια P¹⁰⁴.

Τα mRNAs εντός των σωματίων P ενδέχεται είτε να διασπαστούν είτε να αποθηκευτούν και να επιστρέψουν στα πολυσώματα^{7,24,25,117}. Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει ένα κύκλο του mRNA μεταξύ των πολυσωμάτων και των PBs: ορισμένα mRNAs που συσσωρεύονται στα σωματίδια P υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης ή στρες έχουν παρατηρηθεί να εξέρχονται από τα PBs μετά από αλλαγή των συνθηκών και να μεταφράζονται¹⁰⁶. Τα P σωματίδια είναι δυναμικά και τα επιμέρους mRNPs, ή στοιχεία αυτών των συγκροτημάτων, μπορεί να έχουν διαφορετική δυναμική στα πλαίσια της ευρύτερης δομής των PBs^{7,71}.

Ο σχηματισμός των σωματίων P ρυθμίζεται από συνιστώσες των προαναφερθέντων διεργασιών μεταβολισμού του RNA¹⁰⁶. Στον σακχαρομύκητα, το στρες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των PBs (Teixeira and Parker, 2007). Στα θηλαστικά, η πλειοψηφία των mRNAs αποθηκεύεται στα SGs μετά από έκθεση στο στρες (Kedersha et al., 2005). Στον *C. elegans* η ρύθμιση της συγκρότησης των PBs είναι παρόμοια με αυτή της ζύμης ενώ των SGs είναι παραπλήσια αυτής των θηλαστικών. Μελέτες στον σακχαρομύκητα και στα θηλαστικά έχουν δείξει ότι οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη σύνθεση και αποικοδόμηση του mRNA κατέχουν κείμερο ρόλο στην συγκρότηση των PBs. Η παρεμπόδιση της Pol II μεταγραφής, η καταστολή της επιμήκυνσης κατά τη μετάφραση, η παρεμπόδιση της 5' προς 3' αποικοδόμησης του mRNA σε στάδιο προηγούμενο της αφαίρεσης της καλύπτρας (π.χ. απώλεια της λειτουργίας των eIF-4E-T, LSM1, RCK/p54 και CCR4), η καταστολή του RNAi μονοπατιού έχουν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση των σωματίων P, ενώ η καταστολή της έναρξης της μετάφρασης, η παρεμπόδιση της διάσπασης του mRNA σε στάδια κατά την αφαίρεση της καλύπτρας ή μετά από αυτή, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας λειτουργίας των DCAP2 και XRN1, επάγουν τον σχηματισμό των PBs¹⁰⁶.

Αντίθετα στον *C. elegans* η παρεμπόδιση της Pol II μεταγραφής, η καταστολή της επιμήκυνσης κατά τη μετάφραση, η απώλεια λειτουργίας των συνιστωσών διάσπασης του mRNA RCK και CCR4 (τα οποία δρουν προ της αφαίρεσης της καλύπτρας) και η απενεργοποίηση του Argonaute που μετέχει την miRNA σίγηση, οδηγούν σε αυξημένο σχηματισμό P-σωματίων. Υπάρχει η πιθανότητα ότι τα προβλήματα στις διεργασίες αυτές προκαλούν κυτταρικό στρες, το οποίο θα μπορούσε να προκαλεί την μετακίνηση των mRNAs στα PBs, επιτρέποντας την επιλεκτική έκφραση των απαραίτητων για την απόκριση στο στρες πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα διατηρείται η πλειοψηφία των κυτταροπλασματικών mRNAs ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα ή κατά την ανάκαμψη από το στρες¹²⁵.

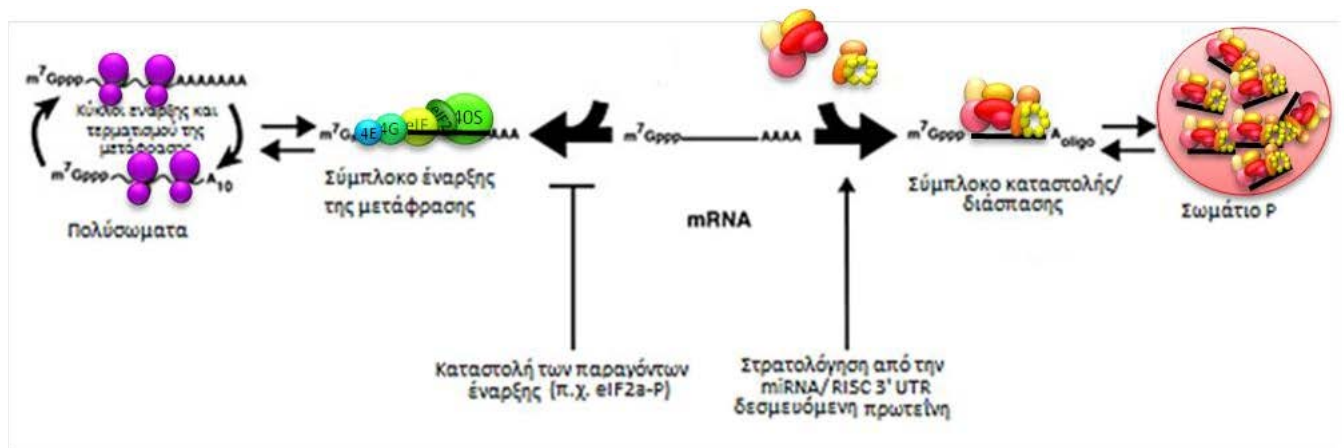
Ακόμη στον *C. elegans* το θερμικό σοκ επάγει τον σχηματισμό των PBs, με μηχανισμό ανεξάρτητο της μεταγραφής. Επιπροσθέτως, μέσω της σύγκρισης του προφίλ των σωματίων-P σε ζώα διαφόρων ηλικιών κατά τη γήρανση, διαπιστώθηκε ότι οι δομές αυτές επάγονται κατά τη γήρανση.¹²⁵ Μάλιστα, η επαγωγή αυτή, όπως και στην περίπτωση

του θερμικού σοκ, δεν οφείλεται σε μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου *dcap-1*, αλλά σε συσσώρευση της πρωτεΐνης του (μη δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου μας).

Τόσο στον *C.elegans* όσο και στην δροσόφιλα και στα θηλαστικά οι mRNA-ειδικοί ρυθμιστές, τα miRNAs και οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες Argonaute δύνανται να στρατολογούν τη μηχανή καταστολής/διάσπασης σε επιμέρους μετάγραφα, ώστε να ρυθμίζουν την απαδενυλίωση, την καταστολή της μετάφρασης, την συσσώρευση στα PBs, την αφαίρεση της καλύπτρας και την διάσπαση.^{45,102,36,85,112,57,30,20,14,10}

Εναλλακτικά, τα mRNA μπορούν επίσης να στοχεύονται στα PBs για την καταστολή της μετάφρασης ή / και την αποικοδόμηση μέσω μιας ποιοτικής διαδικασίας ελέγχου που είναι υπεύθυνη για την διάσπαση των mRNAs με παρεκκλίνοντα κωδικόνια λήξης της μετάφρασης, η οποία αναφέρεται ως NMD^{92,2,64,100,118}.

Είναι ενδιαφέρον, ότι τα κινούμενα PBs συνδέονται και εξαρτώνται από τους μικροσωληνίσκους, την μετακίνησή τους¹. Ωστόσο, η διαταραχή των μικροσωληνίσκων αυξάνει τον σχηματισμό των PBs στη ζύμη και στα θηλαστικά^{1,126}. Περιέργως, τα PBs δεν επηρεάζονται από την απώλεια λειτουργίας της δυνεΐνης υπό κανονικές συνθήκες, αλλά η προκαλούμενη από το στρες αύξηση τους είναι εξασθενημένη, προτείνοντας ότι οι μηχανισμοί σχηματισμού των PBs είναι διαφορετικοί ανάλογα με την κατάσταση του κυττάρου⁸⁹.



Εικόνα 1.3 Η λειτουργία των mRNAs ενδέχεται να ανακλά τον ανταγωνισμό μεταξύ του σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης και συμπλόκων καταστολής της μετάφρασης.

Τα mRNPs που σχηματίζουν τα PBs συμμετέχουν ευρέως και άμεσα στην καταστολή της μετάφρασης της πλειοψηφίας των κυτταροπλασματικών mRNAs στοχεύοντας τα για μεταφραστική καταστολή ή/και αφαίρεση της καλύπτρας και διάσπαση^{83,104,98,22,129}. Επομένως, η κατάσταση της μετάφρασης ενός mRNA καθορίζεται από ένα συνεχή ανταγωνισμό μεταξύ της συγκρότησης του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης και της συγκρότησης των συμπλόκων καταστολής της μετάφρασης, τα οποία θα προωθούν την καταστολή και τον σχηματισμό των PBs. (Εικόνα 1.3). Αυτός ο ανταγωνισμός μεταξύ του σχηματισμού των PBs και της μετάφρασης δείχνει ότι οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τη δημιουργία των PBs, είτε μέσω μείωσης της συσσώρευσης των mRNP συστατικών των σωματίων P, είτε μέσω μείωσης των μη μεταφραζόμενων mRNAs.

Επιπροσθέτως, οι διαφορές που αφορούν στη σύσταση του συμπλόκου καταστολής διάσπασης του mRNA δύνανται να καθορίσει τη τύχη του mRNA. Για παράδειγμα, ένας συνηθισμένος τύπος καταστολής της μετάφρασης περιλαμβάνει την δέσμευση της καλύπτρας από την δεσμευόμενη στην καλύπτρα πρωτεΐνη eIF4E σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη δεσμευόμενη σε eIF4E-δεσμευτική πρωτεΐνη, όπως η 4E-T στα κύτταρα θηλαστικών, που παρεμποδίζει την στρατολόγηση του παράγοντα eIF4G και ως εκ τούτου αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης¹¹³. Επειδή το σύμπλοκο eIF4E και 4E-T συσσωρεύεται στα PBs σε κύτταρα θηλαστικών, τα mRNAs που είναι δεσμευμένα από eIF4E και 4E-T

ενδέχεται να είναι ανθεκτικά σε αφαίρεση της καλύπτρας και κατά προτίμηση να αποθηκεύονται στα PBs , αντί να αποικοδομούνται^{7,11}.

Συμπερασματικά η συσσώρευση των μη μεταφραζόμενων mRNAs αποτελεί ρυθμιστή της λειτουργίας των σωματίων P και στη συνέχεια, η τύχη των mRNAs καθορίζεται στα PBs τονίζοντας τη σημασία αυτών των σωματιδίων στον προσδιορισμό της κατάστασης της μετάφρασης και του χρόνου ημιζωής των mRNAs εντός των κυττάρων.

1.3.2 Stress Granules (SGs)

Οι κυτταροπλασματικές δομές όπως τα stress granules (SGs) είναι λειτουργικά υποπροϊόντα του μεταβολισμού του mRNA και αυτοσυναρμολογούνται αποκρινόμενα στο στρες που προκαλείται από διαταραχές στη μετάφραση. Οι συνθήκες στρες όπως το θερμικό σοκ, το οξειδωτικό στρες και η ιογενής λοίμωξη, προκαλούν ξαφνική μεταγραφική αναστολή, ραγδαία αποσυναρμολόγηση των πολυσωμάτων και εκτεταμένο επαναπρογραμματισμό στο μεταβολισμό του mRNA. Τα SGs τυπικά δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της μεταφραστικής αναστολής και συνεπώς αποτελούνται από σταματημένα εναρκτήρια σύμπλοκα και μικρές ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό ενεργοποιεί μια διαδικασία μοριακής διαλογής του mRNA από τα αποσυναρμολογημένα πολυσώματα και καθορισμού της τύχης των επιμέρους μεταγράφων στα SGs. Τα μεταφραστικά κατεσταλμένα mRNAs υπό συνθήκες στρες ενδέχεται να προωθηθούν στα PBs για διάσπαση, να αποθηκευθούν τα SGs ή να επιστρέψουν στα πολυσώματα^{71,76}.

Ο σχηματισμός των SGs και η ειδικότητα της μεταφραστικής καταστολής που προκαλείται, παρέχουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα την δυνατότητα επιβίωσης κατά το στρες. Συγκεκριμένα, ενώ η μετάφραση των μεταγράφων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κυτταρικής οικονομίας (housekeeping) αναστέλλεται, η μετάφραση των επαγόμενων από το στρες μεταγράφων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικού σοκ και επιλεγμένους μεταγραφικούς παραγόντες (π.χ., GCN4 και ATF4) όχι μόνο διατηρείται αλλά στην πραγματικότητα επάγεται ώστε να επιδιορθωθούν οι σχετιζόμενες με το στρες βλάβες και να γίνει προσαρμογή του κυττάρου ή/και του οργανισμού στις μεταβαλλόμενες συνθήκες^{50,53,54,72}. Είναι σημαντικό ότι η απομόνωση ενός συνόλου mRNAs , των οποίων η μετάφραση έχει παγώσει, επιτρέπει την επιλεκτική σύνθεση των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την κυτταρική επιβίωση. Μόλις η κατάσταση στρες τερματίζεται, τα SGs αποσυναρμολογούνται και τα mRNAs είναι ελεύθερα να μεταφραστούν. Εναλλακτικά, τα mRNAs πιθανώς να αποικοδομηθούν στα P-σωμάτια, τα οποία συνδέονται δυναμικά με τα SGs.

Τα SGs εκτελούν επίσης άλλες κυτταρικές λειτουργίες, καθώς οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μάτισμα, στη μεταγραφή, στη πρόσδεση, στη σηματοδότηση, στη κυτταρική επιβίωση και στην ανάπτυξη εμπλέκονται όλες με τη συναρμολόγηση των SGs. Έχει διαπιστωθεί ότι τα SGs (όπως και τα σωμάτια-P) περιέχουν επίσης σύμπλοκα RNA επαγόμενης σίγησης (RISC) , γεγονός που υποδηλώνει ότι τα σωμάτια αυτά εμπλέκονται με μονοπάτια σίγησης τα οποία διαμεσολαβούνται από microRNA (miRNA), έχοντας έτσι την δυνατότητα να επηρεάζουν διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια και να καθορίζουν την κυτταρική τύχη. Επιπροσθέτως τα SGs πιθανώς συμμετέχουν στην επιλεκτική ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση. Η εκτεταμένη διάρκεια του διαμεσολαβούμενου από τα SGs επαναπρογραμματισμού της μετάφρασης και καταστροφής των mRNAs πέρα από ένα κρίσιμο όριο, μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση. Επομένως καθίσταται εμφανές ότι αυτά τα παροδικά σωμάτια συμμετέχουν και σε πληθώρα διαδικασιών εκτός της δυναμικής επιλογής μεταξύ μετάφρασης ή αποσύνθεσης των mRNAs³.

Ο σχηματισμός των SGs

Εκτός από την συσσώρευση mRNAs των οποίων η μετάφραση έχει σταματήσει σε ένα βήμα της έναρξης της μετάφρασης, ο σχηματισμός των SGs επηρεάζεται επίσης και από άλλους παράγοντες. Η συγκρότηση των SGs ρυθμίζεται από διακριτά μονοπάτια σηματοδότησης στα κύτταρα των θηλαστικών. Στον *C.elegans* ο σχηματισμός των

SGs ρυθμίζεται από γονίδια με διάφορες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της βιογένεσης των ριβοσωμάτων, του ματίσματος mRNA, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης.

Η συγκρότηση και αποσυγκρότηση των κοκκίων στρες μπορεί να επηρεαστεί από πολύπλοκους βρόχους αυτορύθμισης των βασικών παραγόντων, όπως των TIA-1 και TIAR^{68,43,28,110}. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, ρυθμίζουν επίσης την αλληλεπίδραση και τη λειτουργία πολλών mRNP συστατικών των SGs. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του eIF2α, ως απόκριση στο στρες, προκαλεί την απαιτούμενη για τη συναρμολόγηση των SGs μείωση στην έναρξη της μετάφρασης^{6,137}, ενώ η φωσφορυλίωση των TTP, Brf1 και G3BP μειώνει τη συσσώρευσή τους στα SGs^{124,116,132,41,131}. Μια άλλη πτυχή του σχηματισμού των SGs είναι οι τομείς που διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης οι οποίοι βρίσκονται σε πολλές RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη G3BP έχει μία επικράτεια διμερισμού που συμβάλλει στη συγκρότηση των SGs κατά το προκαλούμενο από αρσενίτη στρες¹³¹. Επιπλέον, αρκετές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του RNA περιέχουν QN-πλούσιες rion-like επικράτειες και η ικανότητα αυτοσυνάθροισης των εν λόγω επικρατειών προωθούν τον σχηματισμό των SGs. Για παράδειγμα, οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες TIA-1 και TIAR, όπως και τα ορθόλογά τους, οι οποίες βρίσκονται σε κοκκία στρες περιέχουν μια συντηρημένη QN-πλούσια επικράτεια (PRD). Επιπλέον, ο σχηματισμός των SGs διαμορφώνεται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, οι οποίες διασπούν τα συσσωματώματα των rions¹¹⁴ και αναστέλλουν το σχηματισμό SGs όταν υπερεκφράζονται^{43,94}. Δεδομένου ότι η δημιουργία συσσωματωμάτων των QN-πλούσιων rion τομέων αντιστρέφεται από τη συγκεκριμένη λειτουργία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ¹¹⁴, η συναρμολόγηση των SGs κατά τη διάρκεια του στρες ενδέχεται να προωθείται εξαιτίας της συσσώρευσης πρωτεϊνών που δεν έχουν αναδιπλωθεί, οι οποίες δεσμεύουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, με αποτέλεσμα την οδήγηση της ισορροπίας των QN-πλούσιων τομέων προς μια κατάσταση συσσωμάτωσης.

Επιπροσθέτως, το δίκτυο των μικροσωληνίσκων συμβάλλει επίσης στη συναρμολόγηση των SGs. Ο αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων από φάρμακα, όπως η νοκοδαζόλη, αναστέλλει σχηματισμό των SGs, αν και γενικά μικρότερα σε μέγεθος κοκκία στρες μπορούν και σχηματίζονται^{89,82,80,56,38}. Επιπλέον η δυνεΐνη και η κινεσίνη εντοπίζονται σε SGs, και συμμετέχουν στη συγκρότηση και αποσυγκρότηση των μεγάλων SGs, αντίστοιχα⁸⁹. Η αναστολή της δυνεΐνης επίσης αυξάνει την ευαισθησία των συσσωματωμάτων της TIA-1 σε πρωτεάσες^{82,133}. Μετά το σχηματισμό, τα SGs δεν απαιτούν τους μικροσωληνίσκους για την παραμονή τους³⁸. Καθώς τα SGs είναι λιγότερο κινητικά από τα PBs⁷², τα προβλήματα στη συγκρότησή τους που οφείλονται στη διαταραχή των μικροσωληνίσκων πιθανόν να προκαλούνται εν μέρει από μειωμένη μεταφορά mRNPs εντός και εκτός των κοκκίων στρες.

Η σύσταση των SGs

Τα συστατικά των SGs περιλαμβάνουν μια ανομοιογενή ομάδα mRNA και πρωτεϊνών, χωρίς γνωστές συνδέσεις στον μεταβολισμό του RNA. Η σύνθεση των SGs που συγκροτούνται σε απόκριση διαφορετικών συνθηκών στρες μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή τη διάρκεια του σήματος στρες. Η πρώτη και καθοριστική τάξη των συστατικών των SGs περιλαμβάνουν καθηλωμένα εναρκτήρια σύμπλοκα μετάφρασης. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει αντίγραφα mRNA, eIF3, eIF4F (που περιλαμβάνει eIF4E, eIF4E και eIF4G), eIF4B, μικρές ριβοσωμικές υπομονάδες και την PABP-1. Αυτά είναι οι βασικές συνιστώσες και καθολικοί δείκτες όλων των SGs^{3,4}.

Η δεύτερη κατηγορία των συστατικών τους αποτελείται από πρωτεΐνες που προσδένονται στο mRNA και συνδέονται με την μεταγραφική σίγηση ή τη σταθερότητα των mRNAs. Είναι αξιόπιστες ως SG δείκτες, αλλά μπορεί να μην βρίσκονται σε όλα τα SGs. Στα μέλη αυτής της ομάδας που σχετίζονται με τη μεταφραστική σίγηση περιλαμβάνονται οι Argonaute, TIA-1 (T cell internal antigen-1), TIAR (TIA-1-related) κλπ. Όταν προσδένονται με ένα mRNA καταστέλλεται η μετάφραση και προωθείται η συγκρότηση των SGs^{3,4}.

Μια τρίτη κατηγορία SG-σχετιζόμενων πρωτεϊνών περιλαμβάνει RNA προσδεδεμένες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τις πτυχές του μεταβολισμού του RNA εκτός από τη μετάφραση και τη διάσπαση του (π.χ. μάτισμα, επεξεργασία RNA και

θέση του RNA). Οι Hsps αποτελούν συστατικά των επαναγόμενων από τη θερμοκρασία SGs αλλά όχι των SGs που επάγονται από άλλα ερεθίσματα που προκαλούν στρες.

Μερικές SG-σχετιζόμενες πρωτεΐνες πιθανώς χρησιμεύουν ως μοριακά ικρίσματα που καθορίζουν την επικράτεια των SGs, η οποία παραμένει σχετικά σταθερή, παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες SG πρωτεΐνες (π.χ. TIA-1, TIAR, G3BP,) που έχουν εξετασθεί μέχρι σήμερα μεταφέρονται από και προς τα SGs πολύ πιο γρήγορα από τις οποιεσδήποτε μεταβολές στη μορφολογία των SGs.

Μια σημαντική κατηγορία των στοιχείων προσδένονται έμμεσα στα SGs αλληλεπιδρώντας με βασικά συστατικά τους. Οι πρωτεΐνες αυτές ενδέχεται να μην έχουν ακόμα αναγνωρισμένο ρόλο στο μεταβολισμό του RNA, ή μπορεί να συσχετίζουν την συγκρότηση των SGs με μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης.

Η ριβονουκλεϊκή και πρωτεϊνική σύσταση των SGs είναι δυναμική και σε ισορροπία με τα πολυσώματα⁴, παρέχοντας την απαραίτητη πλαστικότητα απόκρισης στο στρες με την εκλεκτική καταστολή ή επαγωγή της μετάφρασης επιλεγμένων mRNAs.

TIA και TIAR

Οι TIA-1 και TIAR είναι συγγενικές δεσμευόμενες σε RNA πρωτεΐνες των θηλαστικών που προάγουν την γενική μεταφραστική παύση σε κύτταρα που υφίστανται περιβαλλοντικό στρες και αποτελούν ισχυρούς δείκτες των SGs⁶⁸.

Η επαγόμενη από το στρες μεταφραστική παύση ξεκινά με την ενεργοποίηση των PKR, PERK, HRI, ή/και GCN2 κινασών σερίνης / θρεονίνης που φωσφορυλιώνουν τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2α^{123,65,50,78,59,141}. Η φωσφορυλίωση του eIF2α μειώνει την διαθεσιμότητα του eIF2-GTP-tRNA^{Met}, τριμερούς συμπλόκου που φορτώνει το εναρκτήριο tRNA πάνω στην 40S ριβοσωμική υπομονάδα, με αποτέλεσμα την δημιουργία 48S προεναρκτήριων συμπλόκων χωρίς το τριμερές σύμπλοκο το οποίο είναι ανίκανο να προσλάβει την 60S ριβοσωμική υπομονάδα για να ξεκινήσει την πρωτεϊνοσύνθεση. Οι πρωτεΐνες TIA ταξινομούν ενεργά αυτά τα ανίκανα για μετάφραση προεναρκτήρια σύμπλοκα στα SGs, τα οποία δημιουργούνται ταχέως κατά τη διάρκεια του στρες καθώς η ισορροπία μετατοπίζεται από τη μετάφραση στη στασιμότητα των mRNPs.

Οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες που σταθεροποιούν ή να αποσταθεροποιούν το mRNA στρατολογούνται επίσης στα SGs κατά τη διάρκεια stress. Μέσω ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ πολυσωμάτων και SGs, οι TIA-1 και TIAR επηρεάζουν τη συχνότητα με την οποία τα επιμέρους μετάγραφα επιλέγονται για μετάφραση ή διαλογή σε κύτταρα που αναπτύσσονται τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και στρεσογόνες. Κατά αυτό τον τρόπο, οι TIA-1 και TIAR δρουν μετά την φωσφορυλίωση του eIF2α για την προώθηση της συγκρότησης των SGs και τη διευκόλυνση της διαλογής του mRNA κατά τη διάρκεια του στρες⁶. Ωστόσο οι λειτουργικές ιδιότητες των TIA-1 και TIAR δεν περιορίζονται μόνο στη ρύθμιση της μετάφρασης υπό συνθήκες στρες αλλά και σε φυσιολογικές συνθήκες.³

Αρκετές παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι TIA πρωτεΐνες έχουν πλεονάζουσες λειτουργίες. Τόσο TIA-1 και TIAR δεσμεύονται σε U-πλούσια μοτίβα RNA, προωθούν τον σχηματισμό SGs, λειτουργούν ως γενικοί μεταφραστικοί καταστολείς, έχουν παρόμοιες κατανομές στους ιστούς, παραπλήσια ενδοκυτταρική κατανομή, και την ιδιότητα να μετακινούνται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Παρόλα αυτά και οι δύο απαιτούνται για την βέλτιστη ταχύτητα συγκρότησης των SGs.³ Οι TIA-1 και TIAR αποτελούνται από τρία αμινοτελικά μοτίβα αναγνώρισης του RNA (RRM) και ένα καρβοξυτελικό πλούσιο σε γλουταμίνη μοτίβο (PRD), που σχετίζεται δομικά με τα πρωτεϊνικά prions,^{66,130} των οποίων η αυτό-συνάθροιση οδηγεί στο σχηματισμό των SGs⁵. Τόσο οι RNA-δεσμευτικοί τομείς όσο και η PRD απαιτούνται για τη συναρμολόγηση SGs: οι RRMS απαιτούνται για την πρόσληψη του RNA στα SG, ενώ η PRD, είναι απαραίτητη δια τη δημιουργία κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων στα οποία θα προσληφθούν οι συνιστώσες των SGs.

και TIA3(C07A4.1), των οποίων η λειτουργία δεν έχει ακόμη περιγραφεί και διερευνάται στην παρούσα μελέτη.

Πρωτεΐνη των θηλαστικών	Πρωτεΐνη του <i>C.elegans</i>	Γονίδιο του <i>C.elegans</i>	Αλληλόμορφο του <i>C.elegans</i>
TIA-1	TIA1	C18A3.5	tm0361
TIA-1	TIA2	Y46G5A.13	tm2923
TIAR	TIA3	C07A4.1	ok144

Πίνακας 1.1 Οι πρωτεΐνες TIA και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν στο *C.elegans*.

1.4 Απόκριση στο στρες

Οι οργανισμοί αντιδρούν στο στρες με ποικίλους τρόπους που κυμαίνονται από την ενεργοποίηση των μονοπατιών που προάγουν την κυτταρική επιβίωση έως την ενεργοποίηση της απόπτωσης για την εξάλειψη των κατεστραμμένων κύτταρων. Η αρχική αντίδραση του κυττάρου σε ένα στρεσογόνο ερέθισμα προσανατολίζεται προς την άμυνα και την ανάκαμψη από τη προσβολή. Ωστόσο, εάν η καταπόνηση του κυττάρου είναι παρατεταμένη ή οι προσπάθειες άμυνας και επιδιόρθωσης ανεπιτυχείς, τότε ενεργοποιούνται τα μονοπάτια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μορφές στρες και οι κυτταρικές αποκρίσεις για την αντιμετώπιση τους εξαρτάται από την είδος και το επίπεδο της καταπόνησης. Η ικανότητα προσαρμογής του κυττάρου καθορίζει τελικά την τύχη του.⁵

Όλες τις μορφές περιβαλλοντικού στρες που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν δειχθεί να προκαλούν την εμφάνιση κοκκίων στρες σε κύτταρα θηλαστικών. Όπως περιγράφηκε, ο σχηματισμός των SGs τυπικά προκύπτει όταν η έναρξη της μετάφρασης διακόπτεται. Συνοπτικά, όταν η έναρξη της μετάφρασης λαμβάνει χώρα απουσία λειτουργικού eIF2-GTP-tRNA^{Met}_i, εξαιτίας της προκαλούμενης από το στρες φωσφορυλίωσης του eIF2α, το 40S ριβόσωμα σταματά πάνω στο mRNA για να σχηματιστεί ένα ανενεργό 48S προεναρκτήριο σύμπλοκο. Αυτά τα σύμπλοκα των 40 S ριβοσωμάτων, παραγόντων έναρξης και των συναφών mRNA μεταγράφων τους συσσωρεύονται για να σχηματίσουν SGs. Ο σχηματισμός των SG απαιτεί τις TIA-1 και TIAR. Τα mRNAs στα SGs βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία με τα πολυσώματα.⁴

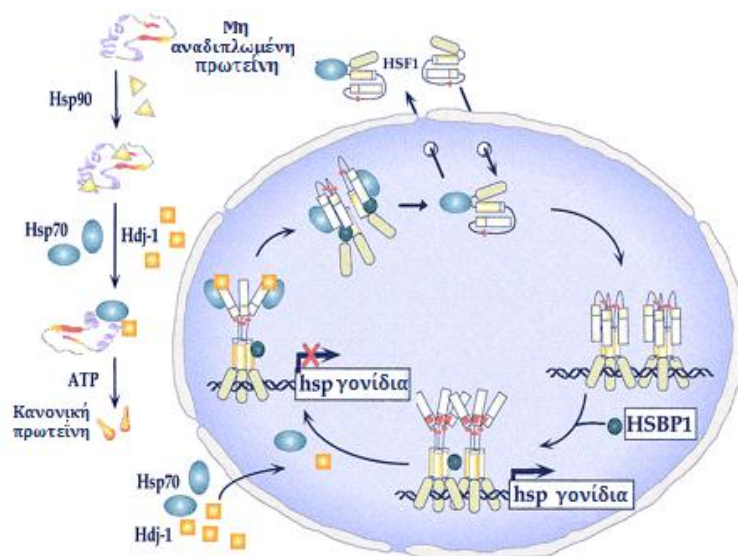
1.4.1 Απόκριση στο θερμικό σοκ

Η προκαλούμενη από τη θερμότητα διαταραχή της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και η επακόλουθη αύξηση των απαιτήσεων για τσαπερόνες (chaperones) θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την πρόκληση της αντίδρασης του θερμικού σοκ. Η αντίδραση θερμικού σοκ αντιμετωπίζει τις αρνητικές συνέπειες στην κυτταρική ομοιόσταση που προκύπτουν από τη λάθος αναδίπλωση και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών⁹⁹.

Κατά την έναρξη της απόκρισης στο θερμικό σοκ η γενική μεταγραφή και μετάφραση των πρωτεϊνών διακόπτεται, πιθανότατα για να μειωθεί η επιβάρυνση του κυττάρου από τις λάθος αναδιπλωμένες. Ωστόσο, οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενισχύουν την έκφραση ενός συγκεκριμένου υποσύνολου προστατευτικών γονιδίων ενεργοποιούνται επιλεκτικά υπό αυτές τις συνθήκες. Αυτή η απόκριση, η οποία διέπεται από τον συντηρημένου παράγοντα θερμικού σοκ 1 (HSF-1), περιλαμβάνει την ταχεία μεταγραφή μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτταροπροστατευτικές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps)¹. Ο HSF-2 συμμετέχει επίσης στη μεταγραφική ρύθμιση της αντίδρασης στο θερμικό σοκ. Ο HSF1 εκφράζεται συνεχώς και διατηρείται ανενεργός σε μονομερή μορφή στο κυτταρόπλασμα μέσω της αλληλεπίδρασης του με Hsp90 και συν-τσαπερόνες (cochaperones) (Εικόνα 1.5). Όταν το κύτταρο εκτίθεται σε στρεσογόνες συνθήκες, η συσσωρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οι οποίες ανταγωνίζονται τον HSF1 για πρόσδεση στην Hsp90, οδηγεί στην απελευθέρωση του από το σύμπλοκο. Ακολούθως σχηματίζονται ομοτρίμερη του HSF-1, τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα και προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης στο θερμικό σοκ άνωθεν των υποκινητών των γονιδίων-στόχων, επάγοντας την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ³⁹.

Οι Hsps αποτελούν ένα σύνολο εξελικτικά συντηρημένων πρωτεϊνών, που ομαδοποιούνται σε υποοικογένειες με μοριακά βάρη περίπου 110, 90, 70, 60, 40, και 15-30 kDa. Μερικές από αυτές, για παράδειγμα, η Hsp90, εκφράζονται συστατικά και δρουν ενδοκυττάρια ως «μοριακές συνοδοί», αποτρέποντας την πρόωρη αναδίπλωση των δημιουργούμενων πολυπεπτιδίων. Άλλες, και ιδιαίτερα οι Hsp27 και Hsp70, εκφράζονται συνήθως σε χαμηλά βασικά επίπεδα και επάγονται ως απόκριση σε περιβαλλοντικές και φυσιολογικές πιέσεις, και για το λόγο αυτό ονομάζονται επαγωγίμες Hsps και αποτελούν μέρος της απόκρισης στο θερμικό σοκ. Η Hsp27 ανήκει στην υποοικογένεια των μικρών πρωτεϊνών Hsps και είναι ανιχνεύσιμη σε σχεδόν όλους τους οργανισμούς. Η Hsp27 ρυθμίζεται επίσης από φωσφορυλίωση και από τη σύνδεση και αποσύνδεση σε ολιγομερή. Η Hsp70 είναι το επαγόμενο μέλος της οικογένειας των 70 kDa Hsps. Τόσο η Hsp27 όσο και η Hsp70 έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης, ο οποίος προάγεται από μια ποικιλία μορφών στρες. Επιτυγχάνουν αυτά τα αποτελέσματα άμεσα, μέσω της αναστολής των μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, και έμμεσα, μέσω των γενικών τους ενεργότητων προώθησης της επιβίωσης. Για παράδειγμα, υπό την ιδιότητά τους ως μοριακοί συνοδοί, οι επαγωγίμες Hsps προσδέονται και βοηθούν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, εμποδίζοντας έτσι τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων τα οποία διαταράσσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Εκτός από αυτούς τους έμμεσους μηχανισμούς, οι Hsp27 και Hsp70 μπορεί να αναστείλει άμεσα την απόπτωση, ρυθμίζοντας τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή μονοπάτια της απόπτωσης παρεμβαίνοντας στην ενεργοποίηση κασπασών σε διάφορα επίπεδα. Επιπλέον οι Hsp27 και 70 αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση. Συνολικά, οι Hsps μπορεί να ενεργοποιηθούν άμεσα ή έμμεσα με μια σειρά από μορφών στρες και να δράσουν για την προστασία των κυττάρων επηρεάζοντας μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών που καθορίζουν την κυτταρική τύχη. Σε γενικές γραμμές, οι Hsps αποτελούν αντιαποπτωτικά μόρια και προωθούν την επιβίωση.

Συνοπτικά, η παρατεταμένη έκθεση στο στρες επηρεάζει την αποτελεσματική λειτουργία του κυττάρου, μέσω των αρνητικών συνεπειών της για την σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, η απόκριση στο θερμικό σοκ



Εικόνα 1.5 Ρύθμιση της απόκρισης στο θερμικό σοκ και του κύκλου του HSF. Η ενεργοποίηση του HSF1 συνδέεται με την εμφάνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών και την απαίτηση για μοριακές συνοδούς (Hsp90, Hsp70, και Hdj1) οι οποίες θα συμβάλουν στην σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση. Ο HSF1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα σε αδρανή κατάσταση, εξαιτίας παροδικών αλληλεπιδράσεων με τσαπερόνες όπως οι Hsp90 και Hsp70. Η ενεργοποίηση του HSF1 συνδέεται με μια σταδιακή διαδικασία, η οποία ξεκινά με την απελευθέρωση του από το σύμπλοκο τσαπερονών (η οποία οφείλεται στην εμφάνιση αποδιαταγμένων πρωτεϊνών οι οποίες ανταγωνίζονται τον HSF-1 για πρόσδεση στις τσαπερόνες) και περιλαμβάνει την μετακίνηση του στον πυρήνα και την απόκτηση ενεργού μορφής, η οποία επάγει τη μεταγραφή των επαγόμενων από το θερμικό σοκ γονιδίων. Κατά τη διάρκεια της εξασθένησης της απόκρισης στο θερμικό σοκ, η μεταγραφική δραστηριότητα του HSF1 καταστέλλεται από την άμεση δέσμευση του από τις Hsp70 και Hdj-1, και από την αρνητική ρύθμιση των ενεργών τριμερών από την προσδεδεμένη σε HSF πρωτεΐνη 1 (HSBP1)⁹⁹.

έρχεται ικανοποιήσει οι μεταβαλλόμενες απαιτήσεις για τον έλεγχο της ποιότητας της βιογένεσης των πρωτεϊνών, μέσω αύξησης της σύνθεσης μοριακών τσαπερών και πρωτεασών, οι οποίες διορθώνουν τις πρωτεϊνικές διαταραχές και συμβάλουν στην ανάκαμψη του κυττάρου.

1.4.2 Μηχανισμός της προκαλούμενης από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) καταπόνησης

Πιστεύεται ότι η οξεία τοξικότητα του αρσενίτη οφείλεται στην οξείδωση των καταλοίπων κυστεΐνης σε πρωτεΐνες-στόχους που μεταβάλλει άμεσα τη διαμόρφωσή τους ή/και τη ενεργότητα τους⁹⁵. Ως εκ τούτου, πολλές κυτταρικές αποκρίσεις προκαλούμενο από αρσενίτη στρες μπορεί να είναι συνέπεια της αδυναμίας των πρωτεϊνών να αναδιπλωθούν σωστά, εξαιτίας των τροποποιήσεων που προκλήθηκαν από τον αρσενίτη. Επομένως, στην έκθεση σε αρσενίτη θεωρείται ότι είναι η χημική προσομοίωση της θερμικής καταπόνησης. Εναλλακτικά ο αρσενίτης μπορεί να αλληλεπιδράσει με πλούσια σε κυστεΐνη, οξειδοαναγωγικά ευαίσθητα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η θειορεδοξίνη και η γλουταθειόνη, προκαλώντας αύξηση στην παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως οι ρίζες υδροξυλίου (HO^{*}), και σουπεροξειδίου (O₂^{*}) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).³² Η ενισχυμένη παραγωγή ROS δύναται να ξεπεράσει την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων, προκαλώντας οξειδωτικό στρες το οποίο παρεμβαίνει με ορισμένες βιολογικές διεργασίες. Τα κύτταρα που υφίστανται οξειδωτικό στρες εμφανίζουν διάφορες δυσλειτουργίες που οφείλονται σε βλάβες που προκαλούνται από τις ROS στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA. Κατά συνέπεια, έχει προταθεί ότι το προκαλούμενο από τα μέταλλα οξειδωτικό στρες στα κύτταρα ευθύνεται σε μεγάλο μέρος για τις τοξικές επιδράσεις των βαρέων μετάλλων. Η έκθεση σε αρσενίτη επηρεάζει πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος στα οποία περιλαμβάνονται η ενεργοποίηση των επαγόμενων από το στρες πρωτεϊνικών κινασών, των επαγόμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών, των ρυθμιζόμενης από εξωκυττάρια σήματα κινάσης, της c-Jun αμινοτελικής κινάσης, και της p38 η οποία επάγει την εξαρτώμενη από AP-1 μεταγραφή. Παράλληλα, ο αρσενίτης αδρανοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια των μεταγραφικών παραγόντων NFκB, μέσω της αναστολής IκB κινάσης β, και των PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor), διαταράσσει τη λειτουργία των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-8 και TNF-α, και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των μεταγραφικών παραγόντων θερμικού σοκ (HSFs)¹³⁴. Κατά συνέπεια, ο αρσενίτης καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αντιαποπτωτικές λειτουργίες και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν προαποπτωτικές λειτουργίες και γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες, όπως η CHOP/GADD153, η μεταλλοθειονίνη και οι κυτταροπλασματικές τσαπερόνες. Επιπλέον, ο αρσενίτης ενεργοποιεί τα μονοπάτια MKK6/p38 και SEK/SAPK. Τέλος, η ERK ενεργοποιείται από τον αρσενίτη με αργή όμως κινητική⁶⁰.

Μία από τις πιο άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις στην έκθεση σε αρσενίτη είναι η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, που συσχετίζεται με φωσφορυλίωση του eIF2α και προκαλεί τον σχηματισμό των SGs. Μια τέτοια δραστική μείωση του ρυθμού της μετάφρασης από τον αρσενίτη ενδέχεται να είναι προσαρμοστικός μηχανισμός για τη διατήρηση της κυτταρικής ενέργειας και για να αποφευχθεί η περαιτέρω συσσώρευση αποδιπλωμένων πρωτεϊνών⁶⁰.

1.4.3 Απόκριση στην Υπεριώδη (UV) Ακτινοβολία

Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία είναι ένα σύνθετο περιβαλλοντικό στρες το οποίο προκαλεί βλάβες στο DNA. Μια σημαντική συνιστώσα των προκαλούμενων από την UV ακτινοβολία βλαβών είναι ο σχηματισμός των διμερών πυριμιδίνης, η οποία οδηγεί σε βλαβερές σωματικές μεταλλαγές. Επιπλέον, προκαλεί τροποποιήσεις στα διάφορα κυτταρικά συστατικά μέσω του σχηματισμού ελεύθερων ριζών, όπως δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (π.χ. ανιόντα σουπεροξειδίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου και ρίζες υδροξυλίου) μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής ενέργειας. Αυτά τα είδη ελεύθερων ριζών, με τη σειρά τους, αντιδρούν με τα κυτταρικά συστατικά προκαλώντας βλάβες στο DNA και στο RNA, πολλές τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες και την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Οι μοριακές αυτές τροποποιήσεις επάγουν μια σειρά κυτταρικών μηχανισμών για την επιδιόρθωση των

βλαβών και την προστασία από τις τοξικές επιδράσεις. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία επάγει ένα σύνολο διαφορετικών γονιδίων. Για παράδειγμα, στη ζύμη περισσότερα από 80 γονίδια ενεργοποιούνται από τις προκαλούμενες από την UV ακτινοβολία βλάβες στο DNA, τα οποία μεταξύ άλλων είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA και τον έλεγχο της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης⁹⁹.

Ο πιο καλά χαρακτηρισμένος προστατευτικός μηχανισμός απόκρισης στην ακτινοβολία UV είναι το μονοπάτι σημείων ελέγχου (checkpoint) του κυτταρικού κύκλου για βλάβες στο DNA, η ενεργοποίηση του οποίου οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA⁵.

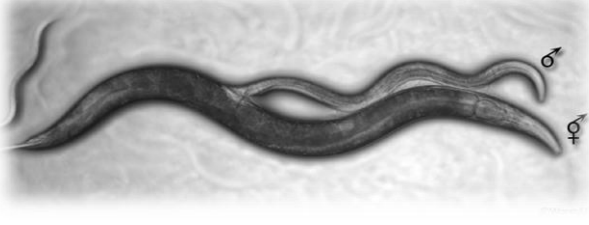
Επιπροσθέτως, ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια απόκρισης στη UV ακτινοβολία είναι ο καταρράκτης ras/ MAPK (mitogen-activated protein kinase). Στα κύτταρα των θηλαστικών, ο μηχανισμός αυτός έχει τρεις διακριτές συνιστώσες: τις ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα πρωτεϊνικές κινάσες (ERKs), την p38 κινάση, και τις επαγόμενες από το στρες c-Jun N-τελικές κινάσες (JNKs). Οι κινάσες αυτές συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, των αποκρίσεων στο στρες και της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των MAPKs από την UV ακτινοβολία πιθανόν γίνεται μέσω της μετατόπισης τους στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες στόχους, όπως οι NF-κB, ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1 (AP-1) και p53, αυξάνοντας την ενεργότητα τους. Μετά την ενεργοποίηση από τις ERKs ή τις p38, ο p53 συντονίζει μια αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση η οποία οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης ή και σε απόπτωση, πιθανώς για την πρόληψη της αναπαραγωγής κυττάρων με βλάβες στο γενετικό τους υλικό⁹⁹.

Τέλος, όπως και κατά τα περισσότερα είδη στρες, η φωσφορυλίωση του eIF2 αυξάνεται σημαντικά ως απόκριση στην UV σε κύτταρα θηλαστικών και απαιτείται για την καταστολή της μετάφρασης. Υπεύθυνη για την απόκριση αυτή είναι η κινάση GCN2⁹⁹.

1.5 Γενικά χαρακτηριστικά του οργανισμού-μοντέλου *Ceanorhabditis elegans*

Ο *Ceanorhabditis elegans* είναι ένας μικρός (περίπου 1 mm ως ενήλικας), μη παρασιτικός νηματώδης, ο οποίος διαβιεί στο έδαφος όπου τρέφεται κυρίως με βακτήρια και οργανική ύλη υπό αποσύνθεση. Ο *C. elegans* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 15-25°C, με την θερμοκρασία να ασκεί σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της διάρκειας ανάπτυξής του (η ανάπτυξη είναι ταχύτερη στους 25°C). Ο κύκλος ζωής του ολοκληρώνεται μέσα σε 2,5 μέρες στους 25°C, ενώ η διάρκεια ζωής του οργανισμού είναι περίπου 2-3 εβδομάδες (Εικόνα 1.6). Ο αναπαραγωγικός του κύκλος διαρκεί 3 ημέρες υπό άριστες συνθήκες. Μετά την εκκόλαψη, οι νεαροί νηματώδεις αναπτύσσονται μέσω τεσσάρων σταδίων (L1-L4), τα οποία συχνά αποκαλούνται προνυμφικά στάδια, αν και δεν μεσολαβεί μεταμόρφωση, περνώντας από μια διαδοχική διαδικασία εκδύσεων που διαρκεί περίπου τρεις ημέρες και τελικά δίνει γένεση στο ενήλικο άτομο¹⁶.

Ο *C. elegans* έχει δύο φύλα: ερμαφρόδιτα και αρσενικά. Τα άτομα είναι σχεδόν όλα ερμαφρόδιτα, με τα αρσενικά να αποτελούν μόλις το 0,05% του συνολικού πληθυσμού. Τα ερμαφρόδιτα τα οποία έχουν ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων XX, παράγουν ωοκύτταρα και σπερματοκύτταρα και αναπαράγονται με αυτογονιμοποίηση. Τα αρσενικά, τα οποία προκύπτουν από σφάλμα στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων X κατά τη γαμετογένεση (X0), δύνανται να γονιμοποιήσουν τα ερμαφρόδιτα (τα ερμαφρόδιτα δεν μπορούν να γονιμοποιήσουν άλλα ερμαφρόδιτα). Επομένως, καθώς ο *C. elegans* είναι κατά κύριο λόγο ερμαφρόδιτος οργανισμός, αναπαράγεται με αυτογονιμοποίηση δίνοντας έτσι γενετικά ταυτόσημους πληθυσμούς ατόμων. Κάτω από συνθήκες στρες, όπως για παράδειγμα υψηλή θερμοκρασία (32°C) αυξάνεται η συχνότητα δημιουργίας αρσενικών ατόμων, ως αποτέλεσμα του μη σωστού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Τα αρσενικά άτομα μπορούν να αξιοποιηθούν για τη δημιουργία διπλών ή τριπλών μεταλλαγμάτων και την πραγματοποίηση αναλύσεων συμπληρωματικότητας, μέσω διασταύρωσής τους με ερμαφρόδιτα.



Caenorhabditis elegans

Φύλο	<i>Nematoda</i>
Κλάση	<i>Secernentea</i>
Ομοταξία	<i>Rhabditida</i>
Οικογένεια	<i>Rhabditidae</i>
Γένος	<i>Caenorhabditis</i>
Είδος	<i>C. elegans</i>

Πίνακας 1.2: Φυλογενετική ταξινόμηση του οργανισμού *Caenorhabditis elegans*

Το ερμαφρόδιτο παράγει επαρκή αριθμό ωοκυττάρων αλλά περιορισμένο αριθμό σπερματοζωαρίων (περίπου 300), τα οποία είναι οι περιοριστικοί γαμέτες στον εν λόγω νηματώδη. Το δεδομένο αυτό, εξηγεί το γεγονός ότι ένα ερμαφρόδιτο γεννάει περίπου 300 αυγά στον αναπαραγωγικό του κύκλο, ενώ μετά από διασταύρωση ο αριθμός αυξάνεται στα 1000.

Το γονιδίωμα αποτελείται από 10^7 ζεύγη βάσεων και οργανώνεται σε 6 χρωμοσώματα (I, II, III, IV, V και X). Από τα 1090 σωματικά κύτταρα που παράγονται κατά την εμβρυική ανάπτυξη του ερμαφρόδιτου, τα 131 υφίστανται αποπτωτικό θάνατο οπότε τελικά εναπομένουν 959 σωματικά κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται περαιτέρω.

Όταν επικρατεί έλλειψη τροφής, συνθήκες στρες ή υπερπληθυσμός, οι προνύμφες σταδίου L1 μπορούν να εισέλθουν σε ένα παράπλευρο μονοπάτι του κύκλου ζωής που οδηγεί στη μορφή διάπαυσης (dauer). Η μορφή αυτή δύναται να ζήσει χωρίς τροφή για πολλούς μήνες, ενώ όταν βρεθεί πηγή θρεπτικών συστατικών, τα dauer μετασχηματίζονται σε κανονικές προνύμφες και αναπτύσσονται κανονικά σε γόνιμα ενήλικα με κανονική διάρκεια ζωής⁴⁴.

1.5.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του *C. elegans* ως οργανισμού-μοντέλου έρευνας

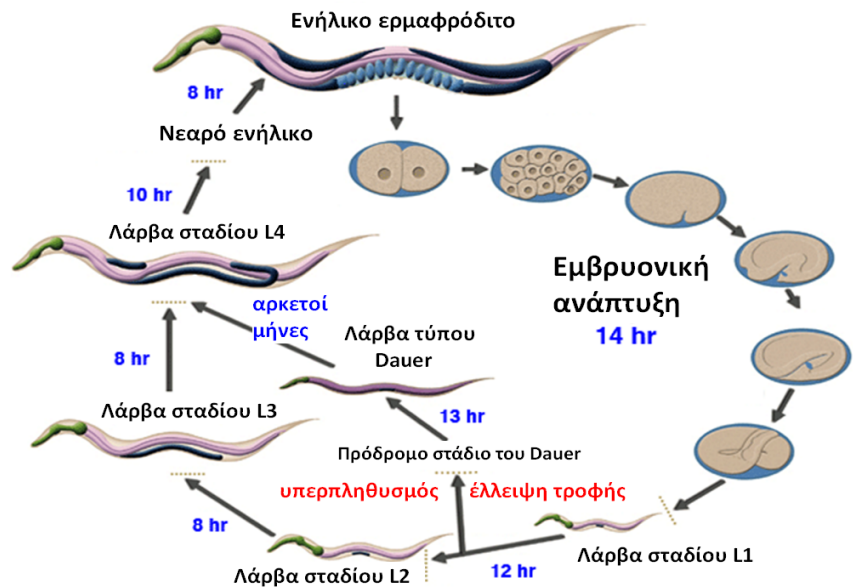
Η αξία του *C. elegans* ως ερευνητικό μοντέλο ανακαλύφθηκε το 1974 και έκτοτε έχει χρησθεί εργαλείο εκτεταμένης βιολογικής έρευνας¹⁶, για μελέτες στην αναπτυξιακή βιολογία, νευροβιολογία κ.α. αλλά πρωτοστάτησε και στο πεδίο της γήρανσης. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο οργανισμός αυτός έχει πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα, κατατεθειμένο σε μια πολύ καλά οργανωμένη βάση δεδομένων. Το γονιδίωμα του περιλαμβάνει περίπου 20.470 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames; ORFs) που βρίσκονται σε πέντε ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών. Έχει ακόμα κατασκευαστεί φυσικός χάρτης που περιλαμβάνει

αλληλεπικαλυπτόμενους κλώνους DNA (κοσμίδια και τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης; cosmids & yeast artificial chromosomes (YACs) και καλύπτει όλο σχεδόν το γονιδίωμα του οργανισμού^{26,136}.

Επίσης είναι γνωστή η πλήρης γενεαλογία όλων των κυττάρων που συνιστούν το πολυκύτταρο σώμα του σκουληκιού, ενώ έχει χαρτογραφηθεί πλήρως και το νευρικό σύστημα (ανάπτυξή του, συνάψεις του κτλ.).

Το διαφανές σώμα του σκουληκιού επιτρέπει την εύκολη παρατήρησή του στο μικροσκόπιο (imaging) χωρίς την ανάγκη τομών. Η ανάπτυξη πληθώρας γενετικών και μοριακών εργαλείων σε συνδυασμό με την ικανότητά του για παραγωγή μεγάλου αριθμού απογόνων, με πανομοιότυπο γενετικό υπόβαθρο, επιτρέπει την μελέτη οποιουδήποτε βιολογικού φαινομένου σε επίπεδο πληθυσμού.

Επίσης, επιδέχεται αποσιώπησης γονιδίων μέσω παραγωγής δίκλωνου RNA (RNA interference, RNAi) με διάφορες τεχνικές (με μικροένεση ή μέσω διατροφής με γενετικά τροποποιημένα βακτήρια). Η μέθοδος αυτή χρησιμεύει για την προσωρινή καταστολή της έκφρασης γονιδίων και είναι εξαιρετικά χρήσιμη σε πειράματα αντίστροφης γενετικής. Ένα βασικό πλεονέκτημα του οργανισμού αυτού σε σχέση με άλλους είναι ότι το RNAi είναι «συστημικό». Αυτό σημαίνει ότι το δίκλωνο RNA διανέμεται σε όλο το



σώμα του ζώου και προκαλεί σίγηση οπουδήποτε κι αν εκφράζεται το στοχευόμενο γονίδιο^{35,46}.

Εικόνα 1.6 Ο κύκλος ζωής του *C. elegans*. Απεικονίζεται η εναλλαγή των σταδίων της εμβρυογένεσης και της προνύμφης (λάρβας) καθώς και η διάρκειά τους σε ώρες (hr), μέχρι το στάδιο του ενήλικου, αναπαραγωγικά ώριμου, ατόμου. Επίσης απεικονίζεται η μορφή διάπαυσης (dauer).

Επιπροσθέτως είναι εύκολη η δημιουργία διαγονιδιακών ζώων με μικροένεση εξωγενούς DNA στη γονάδα και απόκτηση απογόνων που φέρουν το διαγονίδιο ως ένα μικρο-χρωμόσωμα, μη-ενσωματωμένο στο γονιδίωμα.

Επιπλέον, ο οργανισμός αυτός αποτελεί ένα πολύ καλό σύστημα για την μελέτη της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στη μικρή διάρκεια ζωής και στο γεγονός ότι τα άτομα παρουσιάζουν ορατές αλλαγές τόσο στη συμπεριφορά τους όσο και στην εμφάνισή τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Καθώς γερνούν η πρόσληψη της τροφής (μετά από μετρήσεις του ρυθμού με τον οποίο πάλλεται ο φάρυγγας τους) και η αφόδευση τους μειώνονται, ενώ η κίνηση τους γίνεται όλο και πιο αργή^{31,15,79}. Η μορφή των μεγάλων ηλικιακά σκουληκιών είναι αλλοιωμένη. Ο θάνατος τους επιβεβαιώνεται συνήθως από την αδυναμία τους να ανταποκριθούν σε ένα ελαφρύ άγγιγμα ή από την αδυναμία τους να κινηθούν ή να προσλάβουν τροφή (ο μυς του φάρυγγα παραμένει ακίνητος). Η μελέτη της γήρανσης διευκολύνεται πολύ από το ότι όλα τα σωματικά του κύτταρα είναι μετα-μιτωτικά (post-mitotic) και έτσι δεν παρατηρείται αναγέννηση ιστών. Τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω καθιστούν τον οργανισμό αυτό ιδανικό για την διεξαγωγή μελετών με σκοπό την αποκάλυψη των μηχανισμών που ρυθμίζουν την γήρανση, οι οποίοι σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται ότι είναι συντηρημένοι μεταξύ των διαφόρων ειδών.

Αν και στα μειονεκτήματα του *C. elegans* περιλαμβάνονται η δυσκολία μελέτης σε βιοχημικό επίπεδο, η απουσία γνώσεων για τη βιοχημεία και φυσιολογία του, η απουσία ορισμένων ανώτερων συστημάτων (όπως του ανοσοποιητικού) και η μεγάλη εξελικτική απόστασή του από τα θηλαστικά, τα πάμπολλα πλεονεκτήματά του σε

συνδυασμό με την συντήρηση αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών και με το γεγονός ότι ~45% των γονιδίων του έχουν ομόλογο στον άνθρωπο, τον καθιστούν έναν κατάλληλο οργανισμό-μοντέλο για κάθε πεδίο έρευνας.

1.6 Στόχοι της μελέτης

Η γήρανση σε συνδυασμό με την ικανότητα απόκρισης στο στρες δύναται να θεωρηθεί ως μία δυναμική κατάσταση που μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διερεύνηση των μηχανισμών διατήρησης της ακεραιότητας και της ομοιόστασης όλων των βιολογικών διεργασιών. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η μείωση των επιπέδων της πρωτεϊνοσύνθεσης επιδρά θετικά στην μακροζωία. Επιπλέον, μελέτες έχουν συσχετίσει την ικανότητα απόκρισης στο στρες με την διάρκεια ζωής αν και όχι άμεσα. Με στόχο την αποσαφήνιση των μηχανισμών που επιτρέπουν την αύξηση της διάρκειας ζωής όταν μειωθεί ο ρυθμός σύνθεσης πρωτεϊνών καθώς και την σύνδεσή τους με την απόκριση στο στρες σε μοριακό επίπεδο, εστιάζομαστε στη μελέτη παραγόντων και διεργασιών που επηρεάζουν το μεταβολισμό των μηνυμάτων RNA (mRNA) και συνδέονται με τα κοκκία στρες και τα σωματία P. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την μελέτη των επιδράσεων άμεσων μεταβολών σε βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δημιουργία και λειτουργία των δομών αυτών. Στον *C. elegans* ο μεταβολισμός του mRNA έχει μελετηθεί κυρίως κατά την ωογένεση, την εμβρυογένεση και στη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ ο ρόλος του κατά την απόκριση στο στρες και τη διαδικασία της γήρανσης είναι ελάχιστα κατανοητός.

Συγκεκριμένα βασικοί στόχοι της παρούσας μελέτης είναι οι ακόλουθοι:

- **Μελέτη των επιδράσεων των άμεσων μεταβολών των συστατικών των σωματίων P:** Αρχικά, προσεγγίζεται ο ρόλος των σωματίων P στην επιβίωση νηματώδων *C.elegans* μετά από την έκθεση σε διάφορες μορφές στρες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται δοκιμές ανθεκτικότητας στο στρες σε νηματώδεις μεταλλαγμένους για τις βασικές συνιστώσες των PBs, DCAP-1 και DCAP-2. Επιπλέον ο eIF4e (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4E) έχει εντοπιστεί σε σωματία P, αν και παράλληλα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην ανταγωνιστική με τον σχηματισμό των PBs, διαδικασία έναρξης της μετάφρασης. Για τους λόγους αυτούς, η μελέτη θα επεκταθεί στην διαπίστωση των επιδράσεων των μεταλλαγών απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *ife-2*, το οποίο κωδικοποιεί για την βασική ισομορφή του eIF4e στον *C.elegans* και οδηγεί στην μείωση των επιπέδων πρωτεϊνοσύνθεσης, σε συνδυασμό με μεταβολές στην λειτουργία των σωματίων P.
- **Μελέτη των επιδράσεων των άμεσων μεταβολών των συστατικών των κοκκίων στρες:** Για το σκοπό αυτό, εκτελέστηκαν δοκιμές ανθεκτικότητας στο στρες σε νηματώδεις μεταλλαγμένους για τα γονίδια *tia1*, *tia2* και *tia3*, τα οποία κωδικοποιούν για βασικές πρωτεϊνικές συνιστώσες των κοκκίων στρες, καθώς και σε διαγονιδιακούς νηματώδεις που υπερεκφράζουν τις TIA1, TIA2 και TIA3 σε αγρίου τύπου ή σε μεταλλαγμένο υπόβαθρο. Επιπροσθέτως, μελετώνται οι επιδράσεις της υπερέκφρασης των πρωτεϊνικών συστατικών των SGs, TIA1 και TIA2, στη μακροβιότητα.
- **Μελέτη της έκφρασης των συστατικών των κοκκίων στρες:** Με στόχο την παρακολούθηση του σχηματισμού κοκκίων στρες εξαιτίας της θερμικής καταπόνησης, μελετάται το πρότυπο έκφρασης των TIA1 και TIA2, μέσω της έκφρασης των TIA1:GFP και TIA2:GFP σε διαγονιδιακούς νηματώδεις υποβάθρου αγρίου τύπου αλλά και *tia1* ή *tia3* μεταλλαγμάτων τόσο υπό κανονικές συνθήκες όσο και μετά από θερμικό στρες. Στα πλαίσια αυτά κρίθηκε αναγκαία και η διερεύνηση των μεταβολών στην έκφραση των μελετούμενων συνιστωσών των SGs σε απόκριση στο θερμικό σοκ στα διάφορα μεταλλαγμένα για συστατικά των SGs ή των PBs υπόβαθρα μέσω RT-PCR.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες και τη γήρανση στο επίπεδο του μεταβολισμού του mRNA, το οποίο ακόμη αποτελεί ένα ανεξερεύνητο πεδίο της βιολογίας της γήρανσης και της αντίδρασης στο στρες. Το γεγονός ότι οι διαδικασίες αυτές διερευνώνται σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού στον *C. elegans*, παρέχει την δυνατότητα να αντιμετωπιστούν αυτά τα ζητήματα σε ένα συνεκτικό επίπεδο.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Στελέχη νηματώδων

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του νηματώδους *Caenorhabditis elegans* που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Στελέχη <i>C. elegans</i>			
Όνομασία	Γονότυπος	Χρωμόσωμα	Περιγραφή
N2			Άγριος τύπος
BRF159	<i>dcap-1(tm3163)</i>	IV	Έλλειψη του γονιδίου Y55F3AM.12 (<i>dcap-1</i>). Προέκυψε από εξωτερική διασταύρωση (outcross) FX03163 ερμαφρόδιτων με N2 αρσενικά 5 φορές.
BRF234	<i>dcap-2(ok2023)</i>	IV	Έλλειψη του F52G2.1a (<i>dcap-2</i> ή <i>ndx-5</i>). Προέκυψε από εξωτερική διασταύρωση (outcross) RB1641 ερμαφρόδιτων με N2 αρσενικά 3 φορές.
BRF161	<i>tia1(tm0361)</i>	X	Έλλειψη του <i>tia1</i> (C18A3.5). Προέκυψε από την εξωτερική διασταύρωση FX00361 ερμαφρόδιτων με N2 αρσενικά 5 φορές.
BRF171	<i>tia2(tm2923)</i>	X	Προέκυψε από την εξωτερική διασταύρωση ερμαφρόδιτων FX02923 με N2 αρσενικά 5 φορές. Έλλειψη του <i>tia2</i> (Y46G5A.13).
BRF235	<i>tia3(ok144)</i>	X	Εξωτερική διασταύρωση ερμαφρόδιτων BS3348 3 φορές με N2 αρσενικά. Έλλειψη του <i>tia3</i> (C07A4.1).
BRF214	<i>tia1(tm361); tia2(tm2923)</i>	X;X	Έλλειψη των <i>tia1</i> (C18A3.5) και <i>tia2</i> (Y46G5A.13). Προέκυψε από την διασταύρωση BRF161 ερμαφρόδιτων με BRF171 αρσενικά.
KX15	<i>ife-2(ok306)</i>	X	Έλλειψη του R04A9.4 (<i>ife-2</i> ισομορφή του eIF4E).
BRF179	<i>ife-2(ok306); dcap-1(tm3163)</i>	X;IV	Έλλειψη των <i>dcap-1</i> και R04A9.4. Προέκυψε από την διασταύρωση BRF159 ερμαφρόδιτων με KX15 αρσενικά.

Στελέχη με γονιδιακές ελλείψεις

Διαγονιδιακά στελέχη	BRF138	N2 Int[pRF4], line C38		N2 που φέρει ενσωματωμένο στο γονιδίωμά του ένα αντίγραφο του πλασμιδίου pRF4, roller φαινότυπος.
	BRF229	N2 Ex [P _{myo-3} GFP; pRF4]		N2 που φέρει εξωχρωμοσωμικές συστοιχίες γονιδιακής κατασκευή βασισμένη στο πλασμιδίο pRF4. Έκφραση της GFP στο μυϊκό σύστημα υπό τον έλεγχο του υποκινητή του myo-3, roller φαινότυπος.
	BRF211	N2 Ex[GFP::TIA1::3'UTR;pRF4]		N2 που φέρει εξωχρωμοσωμικές συστοιχίες γονιδιακής κατασκευή βασισμένη στο πλασμιδίο pRF4. Έκφραση της TIA1 σε σύντηξη με τη GFP, roller φαινότυπος.
	BRF255	N2Ex[PromTIA2::GFP::TIA2:: 3'UTR]		N2 που φέρει εξωχρωμοσωμικές συστοιχίες γονιδιακής κατασκευή βασισμένη στο πλασμιδίο pRF4. Έκφραση της TIA2 σε σύντηξη με τη GFP, roller φαινότυπος .
	BRF120	N2 Ex[TIA3::GFP, pRF4]		Έκφραση της TIA-3 σε σύντηξη με τη GFP, roller φαινότυπος.
	BRF262	BRF235Ex [GFP::TIA1::3'UTR;pRF4]		Έκφραση της TIA1 σε σύντηξη με τη GFP, roller, έλλειψη του <i>tia3</i> (C07A4.1) . Προέκυψε από τη διασταύρωση ερμαφρόδιτων BRF211 με BRF235 αρσενικά, roller φαινότυπος.
	BRF263	BRF161 Ex[PromTIA2::GFP::TIA2::3' UTR]		Έκφραση της TIA2 σε σύντηξη με τη GFP, έλλειψη του <i>tia1</i> γονιδίου , Προέκυψε από τη διασταύρωση ερμαφρόδιτων BRF255 με <i>tia1</i> (BRF161) αρσενικά, roller φαινότυπος.
	BRF151	BS3348 Ex[TIA3::GFP, pRF4]		Έκφραση της TIA3 σε σύντηξη με τη GFP, έλλειψη του ενδογενούς <i>tia3</i> (C07A4.1) , roller φαινότυπος.
	BRF287	BRF235 Ex[P _{myo-3} GFP; pRF4]		Προέκυψε από τη διασταύρωση BRF235 αρσενικών με BRF229 ερμαφρόδιτα. Έλλειψη του <i>tia3</i> (C07A4.1), roller φαινότυπος.

Πίνακας 2.1: Απεικόνιση των στελεχών *C. elegans* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ο γονότυπος τους και το χρωμόσωμα που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις.

2.2 Συντήρηση και καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους

Η καλλιέργεια στελεχών του νηματώδους (διαγονιακών ή μη) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τεχνικές που έχουν περιγραφεί προηγουμένως⁷³. Τα διάφορα στελέχη του νηματώδους καλλιεργούνται σε NGM (nematode growth media) τρυβλία με άγαρ που περιείχαν επίστρωση καλλιέργειας *E.coli* OP50 ως τροφή, υπό μη υπερπληθυσμιακές συνθήκες. Τα μικρότερα σε μέγεθος τρυβλία (διαμέτρου 35 mm) είναι χρήσιμα για την καλλιέργεια και επιλογή των επιθυμητών απογόνων που προέκυψαν από μία διασταύρωση, ενώ τα μεσαίου μεγέθους (διαμέτρου 60 mm) χρησιμοποιούνται για τη γενική συντήρηση των στελεχών.

Τα τρυβλία με τα *C. elegans* διατηρούνται ανάποδα (ώστε να μην αφυδατωθούν) μεταξύ 15°C και 25°C, συνήθως στους 20 °C, ανάλογα με τη πιθανή ευαισθησία των υπό εξέταση στελεχών. Ο *C.elegans* αναπτύσσεται 2,1 φορές πιο γρήγορα στους 25 ° C από ό, τι στους 15 ° C και 1,3 φορές πιο γρήγορα στους 20°C από ό, τι στους 15°C.

2.2.1 Διαλύματα και Θρεπτικά μέσα για την εργαστηριακή καλλιέργεια νηματωδών

2.2.1.1 Διαλύματα

- **Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα καλίου (K·PO₄) 1M, pH=6.0:** Παρασκευάζονται ξεχωριστά τα διαλύματα K₂HPO₄ (1M) και KH₂PO₄ (1M) και αναμιγνύονται ούτως ώστε το τελικό διάλυμα να έχει pH=6.0. Αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο πριν τη χρήση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Χοληστερόλη 5 mg/ml:** Διάλυση σε απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4°C.
- **MgSO₄ 1M:** Αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο πριν τη χρήση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **CaCl₂ 1M:** Αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο πριν τη χρήση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Αμπικιλίνη 100 mg/ml:** Σκόνη αμπικιλίνης διαλύεται σε αποστειρωμένο dH₂O και φυλάσσεται στους -20°C. Δρα σε τελική συγκέντρωση 50-100 µg/ml.
- **Νυστατίνη 100 mg/ml:** 1 g νυστατίνης διαλύεται σε 10 ml 70% αιθανόλης. Το εναιώρημα που προκύπτει πρέπει να ανακινείται σχολαστικά πριν τη χρήση. Διατηρείται στους 4°C.

2.2.1.2 Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας νηματωδών (Nematode Growth Medium, NGM)

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Nematode Growth Medium, NGM)			
	Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο	Τελική Συγκέντρωση
(A) Προστίθενται πριν από την αποστείρωση	Πεπτόνη	2.5 g	0.25% (w/v)
	Άγαρ	17 g	1.7% (w/v)
	Στρεπτομυκίνη (Streptomycin sulfate)	0.2 g	200 µg/ml
(B) Προστίθενται μετά από την αποστείρωση	K·PO ₄ pH 6	25 ml	25 mM
	Χοληστερόλη	1 ml	5 µg/ml
	MgSO ₄	1 ml	1 mM
	CaCl ₂	1 ml	1 mM
	*Αμπικιλίνη ‡Νυστατίνη	500-1000 µl 1 ml	50-100 µg/ml 100 µg/ml

Πίνακας 2.2: Τα υλικά και οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις για την παρασκευή του NGM.

Τα διαλύματα CaCl₂, MgSO₄, και K·PO₄ προϋπάρχουν αποστειρωμένα και προστίθενται στο διάλυμα μετά από την αποστείρωσή του. Το ίδιο γίνεται και με τη χοληστερόλη και τη νυστατίνη (τα οποία δεν αποστειρώνονται λόγω του ότι είναι διαλυμένα σε αιθανόλη). Στην περίπτωση που το θρεπτικό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για πειράματα RNAi, η στρεπτομυκίνη (αντιβιοτικό) δεν προστίθεται γιατί εμποδίζει την ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους HT115 το οποίο χρησιμοποιείται για τα πειράματα αυτά. Αντί αυτού όμως, προστίθεται μετά την αποστείρωση το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (500µl) από διάλυμα 100mg/ml). Στο θρεπτικό που προορίζεται για επίστρωση *E. coli* OP-50 με σκοπό την επί μακρόν διατήρηση των στελεχών (τρυβλία στοκ), προστίθεται εκτός από στρεπτομυκίνη και το μυκητοκτόνο νυστατίνη μετά την αποστείρωση. Σημειώνεται ότι το NGM δεν περιέχει πηγή νουκλεοτιδίων και βιταμινών.

Μέθοδος παρασκευής

Ανά λίτρο θρεπτικού προστίθενται τα υλικά του Α' μέρους του πίνακα 2.2 και μετά την αποστείρωση και εφόσον η θερμοκρασία δεν ξεπερνά τους 55°C, προστίθενται τα υλικά του Β' μέρους. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1L με αποστειρωμένο απιονισμένο H₂O. Το θρεπτικό μέσο απλώνεται σε τρυβλία petri, πριν στερεοποιηθεί, κάτω από άσηπτες συνθήκες χρησιμοποιώντας μια περισταλτική αντλία που μπορεί να ρυθμιστεί έτσι ώστε μια σταθερή ποσότητα από το άγαρ να διανέμεται σε κάθε τρυβλίο petri (η σταθερή ποσότητα άγαρ στα τρυβλία μειώνει την ανάγκη για επανεστίαση του στερεοσκοπίου κατά την εναλλαγή τρυβλίων). Τα τρυβλία διαμέτρου 6 cm περιέχουν 13 ml θρεπτικού υποστρώματος, ενώ τα τρυβλία 3 cm 4 ml.

Μετά το πέρας τουλάχιστον μίας ημέρας απλώνεται υγρή βακτηριακή καλλιέργεια, η οποία βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής της.

2.2.2 Βακτηριακά στελέχη για τη διατροφή των *C. elegans* και θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξή τους

Μικρή ποσότητα (0.2-0.5ml) βακτηριακής καλλιέργειας που έχει αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο LB (πίνακας 2.3), στους 37°C και βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής της, επιστρώνεται στην επιφάνεια τρυβλίων, όπου αφήνεται να αναπτυχθεί περαιτέρω και να στεγνώσει. Τα πιο συνηθισμένα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή του *C. elegans* είναι τα *E.coli* OP-50 και *E.coli* HT115.

E. coli OP-50

Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται για την καθημερινή συντήρηση και την ανάπτυξη των σκουληκιών. Η OP50 *E. coli* είναι αυξότροφη ουρακίλης και η ανάπτυξή της περιορίζεται σε τρυβλία NGM. Η περιορισμένη βακτηριακή χλόη είναι επιθυμητή, επειδή επιτρέπει την ευκολότερη παρακολούθηση των σκουληκιών και διευκολύνει το ζευγάρωμά τους όταν αυτό είναι επιθυμητό. Το στέλεχος είναι επίσης ανθεκτικό στη στρεπτομυκίνη, η οποία προστίθεται στο NGM για την αποφυγή μολύνσεων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την καλλιέργεια της OP-50 *E.coli* είναι η εξής:

Σε LB με αμπικιλίνη εμβολιάζεται μικρή ποσότητα βακτηρίων που βρίσκονται στους -80°C. Στη συνέχεια η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση έως την εκθετική φάση οπότε και απλώνεται σε NGM τρυβλία, με στείρα τεχνική, χρησιμοποιώντας μια πιπέτα (τοποθετούνται περίπου 0,3ml καλλιέργειας σε κάθε πιάτο). Καθώς οι νηματώδεις έχουν την τάση να περνούν το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου τους στην βακτηριακή χλόη, είναι προτιμότερο η τελευταία να μην επεκτείνεται στα άκρα της πλάκας καθώς οι νηματώδεις μπορούν να αφυδατωθούν και να πεθάνουν εάν συρθούν επάνω στις πλευρές του τρυβλίου. Στην περίπτωση που τα τρυβλία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για διασταύρωση τοποθετείται μία σταγόνα OP50 στο κέντρο του δοχείου ώστε να ευνοηθεί η συνάντηση των *C.elegans*. Τα τρυβλία μετά την πάροδο μίας νύχτας διατηρούνται σε ψυγείο (4°C).

E. coli HT115

Το στέλεχος αυτό στερείται RNάσηςIII (*rnc*⁻) και για το λόγο αυτό είναι κατάλληλο για παραγωγή RNA. Επίσης, φέρει το γονίδιο της RNA πολυμεράσης του T7 κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *lacZ*. Το διαγονίδιο έχει ενσωματωθεί σε ένα τροποποιημένο προφάγο λDH3, ο οποίος με τη σειρά του είναι ενσωματωμένος στο χρωμόσωμα του βακτηρίου. Στον προφάγο περιέχεται επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη. Μετά από επαγωγή με IPTG (isopropylthiogalactoside), η παραγόμενη T7 RNA πολυμεράση μπορεί να μεταγράψει οποιοδήποτε γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή.

Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης βακτηρίων	
LB (Luria-Bertani) broth	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/l)
NaCl	10
Εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract)	5
Τρυπτόνη	10
Με προσθήκη NaOH 1N το pH προσαρμόζεται στο 7	

Πίνακας 2.3: Απεικόνιση των συστατικών και των τελικών συγκεντρώσεων για την παρασκευή LB μέσου ανάπτυξης βακτηρίων. **Αμπικιλίνη 100 mg/ml:** Σκόνη αμπικιλίνης διαλύεται σε αποστειρωμένο dH₂O και φυλάσσεται στους -20°C. Δρα σε τελική συγκέντρωση 50-100μg/ml. **Τετρακυκλίνη 10 mg/ml:** Διαλύεται σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 50% (v/v) και φυλάσσεται στους -20°C. Δρα σε τελική συγκέντρωση 10-15μg/ml. Οποιοδήποτε αντιβιοτικό προστίθεται μετά την αποστείρωση του θρεπτικού.

2.2.2 Συντήρηση, αποθήκευση και ψύξη στελεχών *C. elegans*

Η συστηματική ανάπτυξη των διαφόρων στελεχών *C. elegans*, γίνεται στα τρυβλία NGM επιστρωμένα με τα κατάλληλα βακτήρια, στους 15, 20 ή 25°C. Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη ανανέωση των πληθυσμών των *C. elegans*, μέσω μεταφοράς τους από ένα τρυβλίο petri στο άλλο. Μια γρήγορη και απλή μέθοδος είναι το «chunk», όπου μία αποστειρωμένη σπάθη χρησιμοποιείται για την αποκοπή ενός τμήματος από το άγαρ από ένα πιάτο που περιέχει ένα πληθυσμό και την τοποθέτησή του ανεστραμμένα στην επιφάνεια ενός νέου τρυβλίου. Τα σκουλήκια βγαίνουν από το κομμάτι και εξαπλώνονται επάνω στη βακτηριακή χλόη της νέας πλάκας. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη για τη μεταφορά νηματωδών όταν είναι δύσκολο να μεταφερθούν ατομικά (όπως από ένα «πεινασμένο» τρυβλίο).

Μια άλλη μέθοδος είναι η επιλογή και μεταφορά ατόμων με ένα pick. Το τελευταίο αποτελείται από ένα σύρμα λευκόχρυσου με ένα πεπλατυσμένο άκρο στερεωμένο σε μία πιπέτα Pasteur. Το σύρμα θερμαίνεται σε φλόγιστρο μεταξύ των μεταφορών για να αποφεύγεται η μόλυνση των τρυβλίων. Για να είναι δυνατή η μεταφορά των νηματωδών, η άκρη του σύρματος σύρεται επάνω στην χλόη του νέου πιάτου, οπότε οι νηματώδεις μπορούν να κολλήσουν επάνω στην καλλιέργεια που παρέμεινε στο σύρμα και να μεταφερθούν στο νέο τρυβλίο.

Μετά από περίπου δύο γενιές, τα OP50 βακτήρια καταναλώνονται και τα σκουλήκια πεινούν με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε σκούρες και λεπτές "dauer" προνύμφες.

Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση των στελεχών πραγματοποιείται με εμβολιασμό (chunk) τρυβλίων και φύλαξή τους στους 15°C, όπου μπορούν να διατηρηθούν περίπου για 2-3 μήνες.

Οι νηματώδεις *C. elegans* μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80 °C μετά από κατάλληλη διεργασία. Για να είναι επιτυχημένη η ψύξη τα ζώα πρέπει να βρίσκονται στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο και η ψύξη έως -80 °C να είναι σταδιακή. Οι προνύμφες (L1-L2 φάση) επιβιώνουν την ψύξη καλύτερα, ενώ τα καλά τρεφόμενα σκουλήκια, τα ενήλικα, τα αυγά και οι dauers δεν επιβιώνουν επιτυχώς. Είναι καλύτερο να χρησιμοποιούνται νηματώδεις από τρυβλία τα οποία περιέχουν πολλά L1-L2 ζώα και των οποίων μόλις έχει εξαντληθεί η OP50 χλόη. Τα τρυβλία ξεπλένονται με κρύο M9 (για να είναι σταδιακή η ψύξη) και στο εναιώρημα προστίθεται ίσος όγκο παγωμένου διαλύματος ψύξης (βλ. πίνακες 2.2 και 2.3 παρακάτω). Ακολούθως, το εναιώρημα κατανέμεται σε αρκετά cryotubes τα οποία καταψύχονται στους -80 °C. Ένα από αυτά αποψύχεται μετά από 2-3 ημέρες για να διαπιστωθεί η επιτυχία της ψύξης. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας απαιτείται να αποψυχθεί ένα από τα δοχεία αφού περάσει περίπου μια εβδομάδα. Η απόψυξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου όπου αφήνεται να λιώσει ο πάγος και στη συνέχεια το περιεχόμενο μεταφέρεται σε τρυβλία NGM επιστρωμένα με OP50 βακτήρια. Τα σκουλήκια αφήνονται να ανακάμψουν για 3-4 μέρες στους 15-20°C. Όσο περισσότερα ζώα επιβιώσουν τόσο αποτελεσματικότερο ήταν το πάγωμά τους και τόσο μεγαλύτερες οι πιθανότητες να διατηρηθούν τα ζώα για μεγάλη χρονική περίοδο. Η ανάκτηση των νηματωδών που ψήχθηκαν κυμαίνεται από 30-40%, ποσοστό το οποίο ενδέχεται να μειωθεί ελαφρά μετά την πάροδο κάποιων χρόνων.

Ρυθμιστικό διάλυμα M9	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/l)
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
Αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια προστίθεται το παρακάτω διάλυμα:	
MgSO ₄ 1M	1ml

Πίνακας 2.4: Απεικόνιση των συστατικών και των τελικών συγκεντρώσεων για την παρασκευή M9 ρυθμιστικού διαλύματος των νηματωδών.

Ρυθμιστικό διάλυμα ψύξης νηματωδών			
	Συστατικό	Ποσότητα ανά λίτρο	Τελική Συγκέντρωση
(A) Προστίθενται πριν την αποστείρωση	NaCl	5.85 g	100 mM
	Glycerol	300 g (~200 ml)	30% (w/v)
	dH ₂ O	947 ml	
(B) Προστίθενται μετά την αποστείρωση	K ₂ PO ₄ pH 6	50 ml	50 mM
	0.1M MgSO ₄	3 ml	0.3 mM
Διατηρείται και χρησιμοποιείται στους 4°C			

Πίνακας 2.5: Απεικόνιση των συστατικών και των τελικών συγκεντρώσεων για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ψύξης των νηματωδών.

2.2.2.1 Απαλλαγή των νηματωδών από μολύνσεις

Περιστασιακά, τα τρυβλία μπορεί να μολυνθούν με άλλα βακτήρια ή μύκητες. Οι μολύνσεις συνήθως δεν βλάπτουν τους νηματώδεις ωστόσο δυσχεραίνουν την διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι μικρές μολύνσεις από μύκητες μπορεί να εξαλειφθούν μετά από διαδοχικά chunks από μη μολυσμένες περιοχές. Τα βακτήρια και οι μύκητες απαλείφονται με την εξής μέθοδο:

Μία σταγόνα διαλύματος NaOH 5N, χλωρίνης και ddH₂O τοποθετείται στην άκρη ενός καθαρού OP50 τρυβλίου. Στην συνέχεια μεταφέρονται ενήλικα άτομα με αυγά μέσα στην σταγόνα με αποτέλεσμα να καταστρέφονται όλοι οι ιστοί των ζώων, τα οποία διαλύονται, αφήνοντας μόνο τα αυγά τα οποία είναι πιο ανθεκτικά εξαιτίας του περιβλήματος που διαθέτουν. Καθώς η σταγόνα εξατμίζεται γρήγορα, νέες σταγόνες του διαλύματος αυτού προστίθεται έως ότου να διαλυθούν πλήρως οι νηματώδεις και να μείνουν τα αυγά. Είναι σημαντική η τακτική παρακολούθηση ώστε να αποφευχθεί η παρατεταμένη παραμονή των αυγών στο διάλυμα αυτό, το οποίο ενδέχεται να παρεμποδίσει την εκκόλαψή τους. Την επόμενη μέρα οι προνύμφες μεταφέρονται σε ένα καθαρό πιάτο OP50.

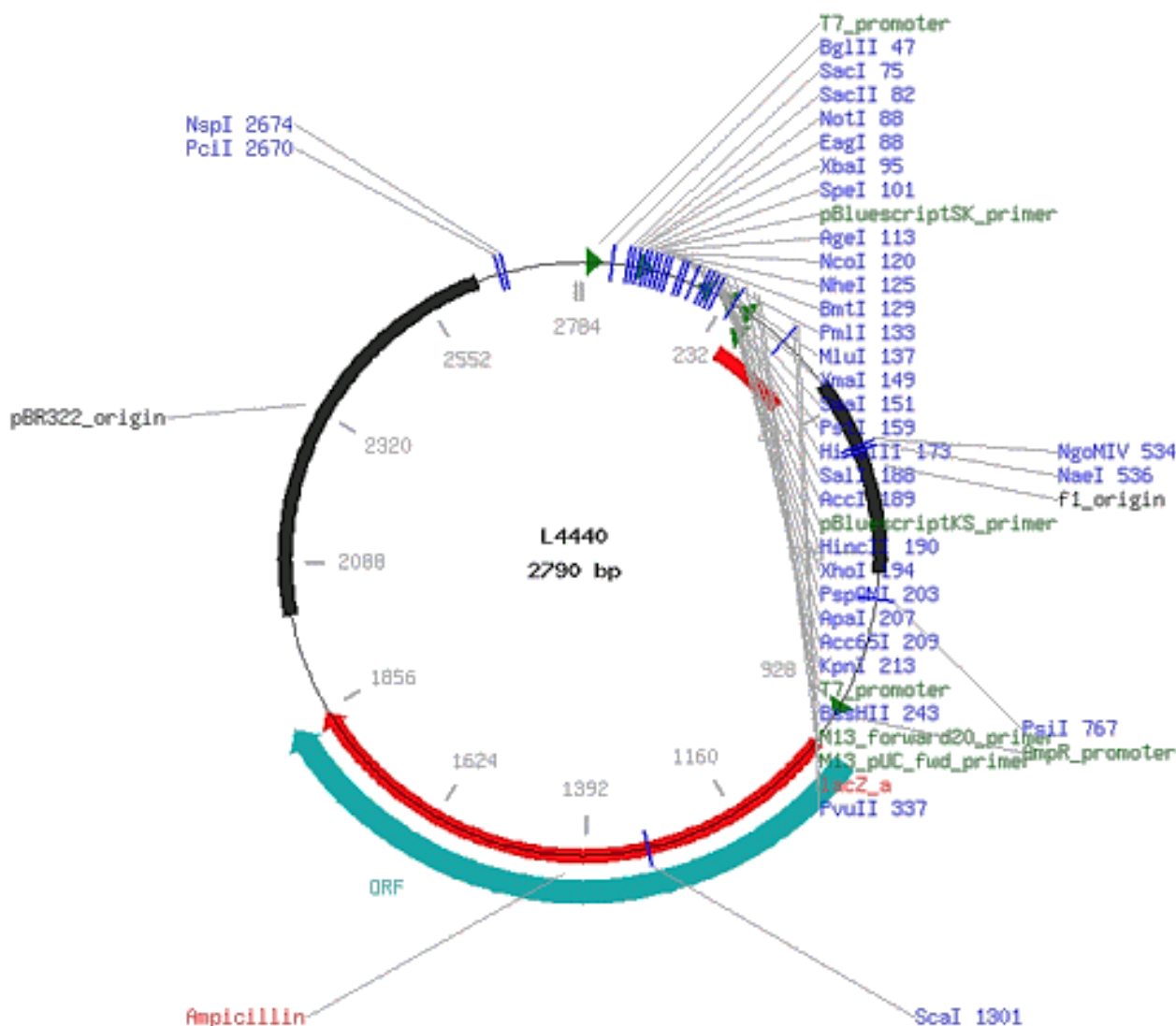
2.2.3 Συγχρονισμός πληθυσμών

Για την απόκτηση συγχρονισμένων πληθυσμών, 25-40 (ανάλογα με την γονιμότητα του εκάστοτε στελεχούς) ενήλικα ερμαφρόδιτα με αυγά ηλικίας μίας έως τριών ημερών τοποθετούνται σε NGM τρυβλία, και αφήνονται να εναποθέσουν αυγά για χρονικό διάστημα 2 ή και περισσότερων ωρών, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Σε περίπτωση που οι πληθυσμοί πρόκειται να συλλεχθούν για την εκχύλιση RNA, ο συγχρονισμός πρέπει να είναι αυστηρός και η διάρκεια εναπόθεσης των αυγών να μην ξεπερνά τις 3 ώρες. Ωστόσο όταν σκοπός είναι η επιλογή

ατόμων αναπτυξιακού σταδίου L4, η διάρκεια της ωτοκίας μπορεί να υπερβεί τις 12 ώρες σε στελέχη με περιορισμένη γονιμότητα, όπως τα μεταλλαγμένα στελέχη *tia1*, *tia1;tia2* και *dcap-2*.

2.2.4 Αποσιώπηση γονιδίων με τη μέθοδο του RNAi (RNA interference)

Ο *C. elegans* αποτελεί ένα μοναδικό οργανισμό-μοντέλο για την αντίστροφη γενετική ανάλυση, επειδή το δίκλωνο RNA και η επακόλουθη σίγηση του γονιδίου στόχου μεταδίδεται συστηματικά σε ολόκληρο τον οργανισμό μέσω σίτισης των νηματωδών με βακτήρια που εκφράζουν dsRNA που στοχεύει ένα οποιοδήποτε γονίδιο. Η διαθεσιμότητα βιβλιοθηκών σίτισης RNAi γονιδιωματικού εύρους, έχει διευκολύνει την ολοκλήρωση πολλαπλών φαινοτυπικών σαρώσεων απώλειας λειτουργίας. Τα RNAi πειράματα σίτισης εκτελούνται συνήθως χρησιμοποιώντας βακτήρια σε τρυβλία με άγαρ, με τα οποία τρέφονται οι *C. elegans*.



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης pL4440. Απεικονίζονται οι δύο υποκινητές της T7 RNA πολυμεράσης που περιβάλλουν μια αλληλουχία πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

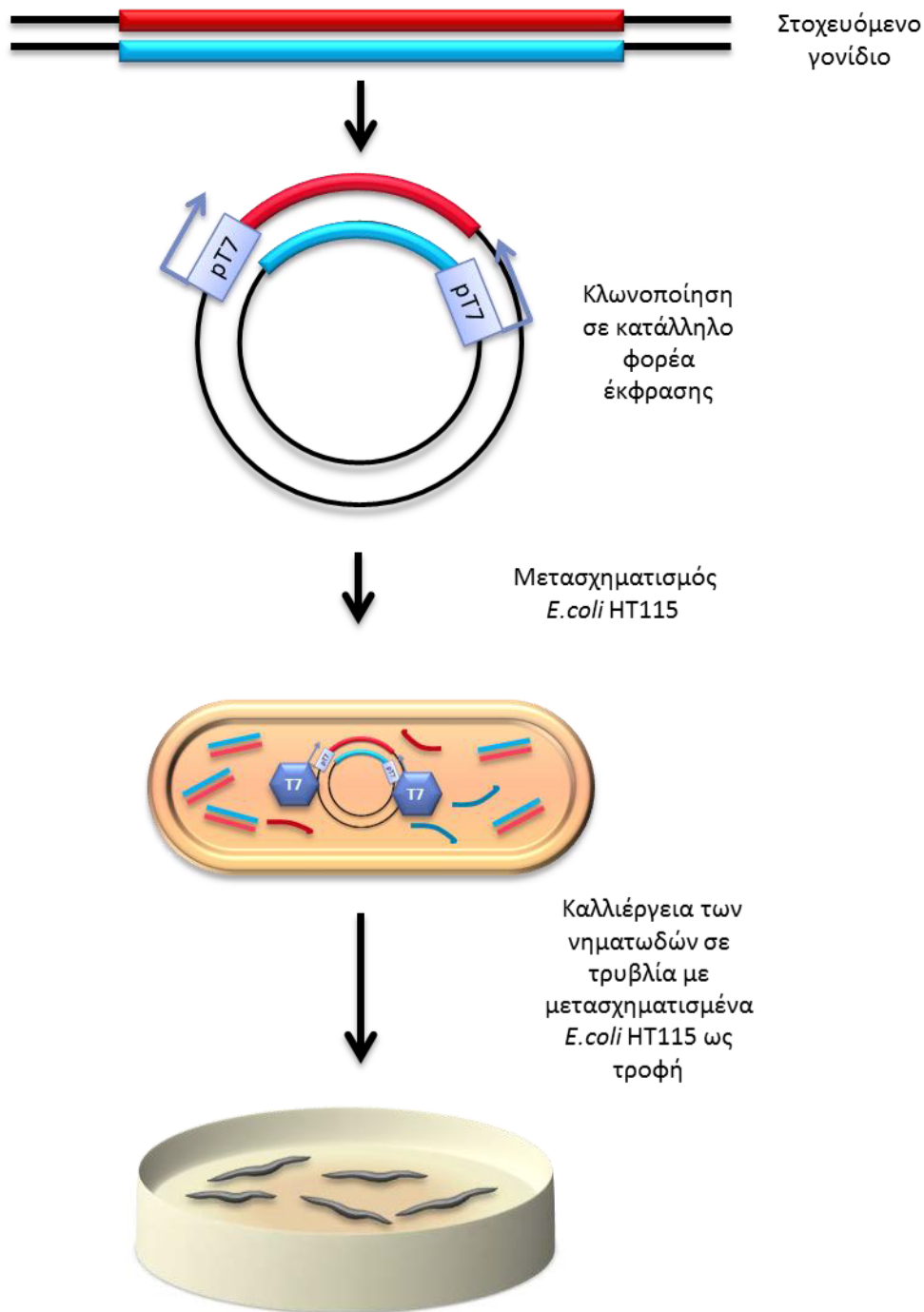
Για την σίγηση γονιδίων με τη μέθοδο του RNAi χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια HT115(DE3) του γένους *E. coli* μετασχηματισμένα με πλασμιδιακές κατασκευές που έφεραν μέρος του γονιδίου-στόχου (τουλάχιστον 500bp) κλωνοποιημένο ανάμεσα σε δυο T7 υποκινητές. Η γενική δομή των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του RNAi στηρίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pPD129.36 (pL4440) (Εικόνα 2.1). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων RNAi, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο. Ο φορέας κλωνοποίησης pL4440 είναι κατάλληλος για το μετασχηματισμό των HT115 γιατί περιέχει δύο υποκινητές της T7 RNA πολυμεράσης που περιβάλλουν μια αλληλουχία πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (multicloning site, MCS).

Τα HT115(DE3) διαθέτουν ένα δεύτερο πλασμίδιο με την κωδική αλληλουχία της T7 πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο ενός υποκινητή που επάγεται από τη χημική ένωση IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Όταν ένα γονίδιο του *C. elegans* κοινοποιείται στο MCS, η αντίθετη κατεύθυνση των δύο υποκινητών επιτρέπει στην T7 RNA πολυμεράση να μεταγράψει και τις δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες του γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή δίκλωνου RNA εντός των βακτηριακών κυττάρων. Η απουσία RNase-E από τα HT115 καθιστά δυνατή την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA, τα οποία απελευθερώνονται από τα βακτήρια μετά την λύση τους στο έντερο των ζώων που τράφηκαν με αυτά, και που στοχεύουν τα ενδογενή συμπληρωματικά μετάγραφα προκαλώντας συστηματική αποσιώπηση του γονιδίου στόχου μέσω του μηχανισμού RNAi⁷⁶.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία τρυβλίων για RNAi στον *C.elegans* περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- Εμβολιασμός θρεπτικού διαλύματος LB+amp+tet όγκου 5ml με μικρή ποσότητα βακτηρίων HT115 που βρίσκονται στους -80°C και περιέχουν το κατάλληλο πλασμίδιο
- Επώαση αυτών για 16-18h στους 37°C με ανάδευση
- Ακολούθως από την καλλιέργεια αυτή εμβολιάζεται μια καινούργια καλλιέργεια LB με αμπικιλίνη μόνο (αραίωση 1:10).
- Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 2-3 ώρες ώστε η νέα καλλιέργεια να φτάσει σε εκθετική φάση αύξησης ($OD_{600}=0,4-0,5$) και πρόσθεση IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5-1mM.
- Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για άλλες 2-3 ώρες.
- Τέλος, τα τρυβλία NGM επιστρώνονται με 400μl της καλλιέργειας και επωάζονται στους 37°C για 16 ώρες.

Για την εκτίμηση της επίδρασης που έχει η απενεργοποίηση ενός γονιδίου-στόχου σε μια συγκεκριμένη διαδικασία τα αποτελέσματα, συγκρίνονται πάντα με αυτά που προκύπτουν από πειράματα μάρτυρες (control), στα οποία χρησιμοποιούνται τρυβλία με σκουληκία ίδιου στελέχους και σταδίου που τρέφονται με βακτήρια μετασχηματισμένα με κενό πλασμιδιακό φορέα (pL4440). Οι νηματώδεις αυτοί αναπτύσσονται ταυτόχρονα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες με αυτά που τρέφονται με τα RNAi βακτήρια.



Εικόνα 2.2: RNAi επιτυγχάνεται με το τάισμα των *C.elegans* με βακτήρια που παράγουν dsRNA μόρια. Το πλασμιδιακό DNA που περιέχει ένα τμήμα από το cDNA του στοχευόμενου γονιδίου εντίθεται μεταξύ T7 υποκινητών και εισάγεται σε στέλεχος *E.coli* που εκφράζει την T7 RNA πολυμεράση. Η επαγωγή της παραγωγής της T7 πολυμεράσης γίνεται με IPTG και έχει αποτέλεσμα την δημιουργία dsRNA. Όταν οι νηματώδεις τραφούν και πέψουν τα βακτήρια, τα δίκλινα RNAs εισάγονται στα κύτταρα τους και η σίγηση εξαπλώνεται συστηματικά.

2.2.5 Γενετικές διασταυρώσεις

Για το σχηματισμό διπλά μεταλλαγμένων στελεχών αλλά και για την μεταφορά διαγονιδίων σε μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις ανάμεσα στα αντίστοιχα στελέχη ή στελέχη και διαγονιδιακά άτομα^{79,77}. Η πειραματική διαδικασία των διασταυρώσεων περιγράφεται αναλυτικά για το κάθε στέλεχος παρακάτω.

2.2.5.1 Αρσενικά άτομα

Τα αρσενικά άτομα έχουν γονότυπο XO και προκύπτουν από το μη αποχωρισμό των φυλετικών αδελφών χρωματίδων κατά τις μειωτικές διαιρέσεις των γαμετικών κυττάρων. Ενώ δηλαδή τα ερμαφρόδιτα ζώα περιέχουν δυο φυλετικά χρωμοσώματα XX, τα αρσενικά έχουν μόνο ένα XO. Η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται αρσενικά άτομα σε ένα πληθυσμό ερμαφρόδιτων είναι εξαιρετικά μικρή (~0.2%) καθώς προκύπτουν από τυχαία απώλεια του ενός φυλετικού χρωμοσώματος X, αλλά το ποσοστό αυτό αυξάνεται υπό συνθήκες στρες.

2.2.5.2 Διασταυρώσεις (Mating)

Για την επίτευξη της διασταύρωσης ερμαφρόδιτων ατόμων με αρσενικά παρασκευάζονταν αρχικά τρυβλία NGM όπου ένα πολύ μικρό μέρος της επιφάνειάς τους ήταν καλυμμένο με OP-50 βακτήρια (mating plates). Στα τρυβλία αυτά τοποθετούνταν ζώα αναπτυξιακού σταδίου L3-L4 σε αναλογία 1 ερμαφρόδιτο προς 3-4 αρσενικά. Συνολικά μεταφέρονταν 4-5 ερμαφρόδιτα και 15-20 αρσενικά επωάζονταν στους 20°C για 2-3 μέρες. Μετά την παραγωγή των πρώτων απογόνων απομακρύνονταν όλα τα αρσενικά άτομα της πατρικής γενιάς για να αποφευχθεί η γονιμοποίηση των απογόνων της πρώτης θυγατρικής γενιάς (F1) από αυτά. Μετά από μια μέρα επιλέγονταν 5-6 ετερόζυγοι απόγονοι F1 και μεταφέρονταν σε ξεχωριστά τρυβλία NGM, εφόσον η διασταύρωση θεωρούταν επιτυχής, με κριτήριο την ύπαρξη αρσενικών ατόμων σε μεγάλη συχνότητα (~50%) στην F1 γενιά. Έπειτα συλλέγονται 10-20 ερμαφρόδιτοι απόγονοι 2ης γενιάς (F2) από το κάθε τρυβλίο των F1, σε αντίστοιχα ξεχωριστά μικρά τρυβλία (διαμέτρου 3mm) με βακτήρια OP-50. Ακολούθως η F3 γενιά ελέγχεται για την εκάστοτε μεταλλαγή είτε μέσω του φαινοτύπου είτε μέσω αντίδρασης PCR όταν η μεταλλαγή δεν προκαλεί μορφολογικές ή ανατομικές ανωμαλίες, ώστε να βρεθούν οι ομόζυγοι F2 πρόγονοί τους. Τέλος ο γονότυπος των επιλεγμένων σειρών επιβεβαιώνεται με PCR σε γενωμικό DNA από τον κάθε πληθυσμό.

Αναλυτικότερα οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

Δημιουργία του στελέχους BRF262

Επιτεύχθηκε μέσω διασταύρωσης αρσενικών BRF235 (*tia3/ok144*) με ερμαφρόδιτα BRF211 που φέρουν και εκφράζουν το διαγονίδιο TIA-1:GFP. Καθώς οι νηματώδεις που εκφράζουν την TIA-1:GFP έχουν ταυτόχρονα και τον φαινότυπο roller, 5 roller ερμαφρόδιτα από την F1 του mating τρυβλίου τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε 5 τρυβλία και επωάστηκαν στους 20°C. Ακολούθως ελέχθησαν με PCR για το *tia3* (ok144) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι ετερόζυγα *tia3*. Έπειτα 20 roller απόγονοι των ετερόζυγων (F2s) τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε μικρά τρυβλία ελέχθησαν με PCR για το *tia3* ώστε να εξακριβωθεί ποιοι απόγονοι φέρουν την έλλειψη σε ομόζυγη κατάσταση. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με PCR σε γενωμικό DNA.

Δημιουργία του στελέχους BRF263

Επιτεύχθηκε μέσω διασταύρωσης αρσενικών BRF161 (*tia1/tm0361*) με ερμαφρόδιτα BRF255 τα οποία εκφράζουν το διαγονίδιο TIA-2:GFP. Καθώς οι διαγονιδιακοί για το TIA-2:GFP νηματώδεις έχουν ταυτόχρονα και τον φαινότυπο roller, 5 roller ερμαφρόδιτα από την F1 του mating τρυβλίου τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε 5 τρυβλία και επωάστηκαν στους 20°C. Ακολούθως ελέχθησαν με PCR για το *tia1/1(tm361)* ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι *tia1* ετερόζυγα. Έπειτα 20 roller απόγονοι των ετερόζυγων (F2s) τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε μικρά τρυβλία ελέχθησαν με PCR για το *tia1* ώστε να εξακριβωθεί ποιοι απόγονοι φέρουν την έλλειψη σε ομόζυγη κατάσταση. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με PCR σε γενωμικό DNA.

Δημιουργία του στελέχους BRF287

Το στέλεχος αυτό δημιουργήθηκε με σκοπό την αξιοποίησή του ως στέλεχος-μάρτυρας στα πειράματα που περιλάμβαναν το στέλεχος BRF287. Η δημιουργία του επιτεύχθηκε μέσω διασταύρωσης αρσενικών BRF235 με ερμαφρόδιτα BRF229. 5 roller ερμαφρόδιτα από την F1 του mating τρυβλίου τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε 5 τρυβλία και επώαστηκαν στους 20°C. Ακολούθως ελέγχθηκαν με PCR για το *tia3*(ok144) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι ετερόζυγα *tia3*. Έπειτα 20 roller απόγονοι των ετερόζυγων F1s (F2s) τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε μικρά τρυβλία ελέγχθηκαν με PCR για το *tia3* ώστε να εξακριβωθεί ποιοι απόγονοι φέρουν την έλλειψη σε ομόζυγη κατάσταση. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με PCR σε γενωμικό DNA.

2.2.6 Έλεγχος γονιμότητας

Για την διεξαγωγή ενός ελέγχου γονιμότητας συλλέγονται 3-4 άτομα σταδίου L4 από το υπό μελέτη στέλεχος τα οποία αναπτύχθηκαν είτε στους 20°C είτε στους 25°C και τοποθετούνται σε ξεχωριστά τρυβλία. Τα ζώα μεταφέρονταν καθημερινά σε νέο τρυβλίο μέχρι την παύση της ωοτοκίας προκειμένου να μην ανακατευθούν με τους απογόνους τους και γινόταν καταμέτρηση των απογόνων που είχαν εκκολαφθεί τις προηγούμενες ημέρες. Η μελέτη διαρκεί πέντε περίπου ημέρες καθώς οι *C.elegans* είναι γόνιμοι για 3-4 ημέρες.

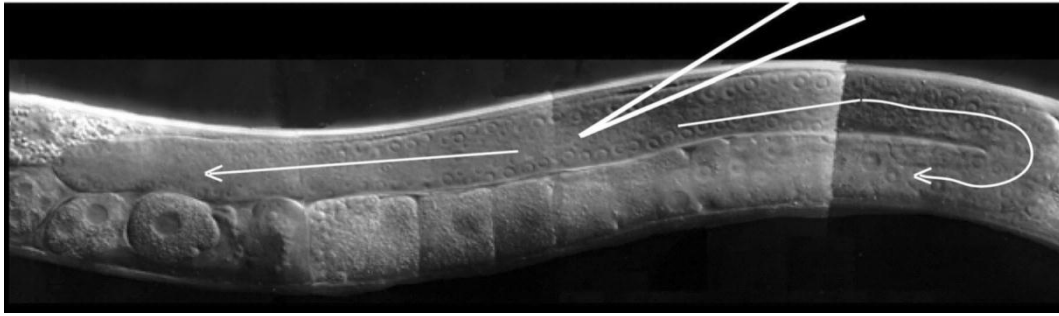
Απεικονίζονται ο συνολικός αριθμός των απογόνων ανά σκουλήκι (μέγεθος γόνου) που μετρήθηκε για κάθε γονότυπο και το μέσο μέγεθος του γόνου (μέση τιμή \pm SEM) του κάθε στελέχους. Για τον υπολογισμό των τιμών-P χρησιμοποιήθηκε unpaired t-test του προγράμματος GraphPad Prism 5.

2.2.7 Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών *C. elegans*

Για τη γενετική τροποποίηση, η προσέγγιση που αξιοποιήθηκε ήταν η μικροέγχυση πλασμιδιακών κατασκευών βασισμένες στο pRF4 στην ακραία περιοχή των γονάδων, στο συγκυτιακό τους δηλαδή τμήμα⁹⁶. Η μικροέγχυση είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, και για την εισαγωγή των διαφόρων τύπων μορίων απευθείας στα κύτταρα. Τα κύτταρα της ακραίας βλαστικής σειράς του *C. elegans* επικοινωνούν μεταξύ τους και ως εκ τούτου, τα DNAs που ενέθηκαν μπορούν να μεταφερθούν σε πολλούς απογόνους. Αυτή η προσέγγιση οδηγεί συνήθως στο σχηματισμό μεγάλων εξωχρωμοσωματικών συστοιχιών DNA. Τα ερμαφρόδιτα στα οποία γίνεται η ένεση, πρέπει να είναι καλά τρεφόμενα και να βρίσκονται στη πρώτη ημέρα της ενηλικίωσης τους.

Οι τεχνικές γενετικού μετασχηματισμού απαιτούν συνήθως ένα γονίδιο επιλογής. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας το πλασμίδιο pRF4 που φέρει το αλληλόμορφο *rol-6*(su1006), που δίνει τον επικρατή φαινότυπο roller. Τα σκουλήκια rollers αποκτούν πεταλοειδές σχήμα και συστρέφονται στον επιμήκη άξονά τους. Οι δείκτες μετασχηματισμού που επάγουν επικρατή φαινότυπο επιτρέπουν τη μετατροπή οποιουδήποτε στελέχους *C.elegans*, εφόσον ο φαινότυπος του δέκτη δεν επιδρά στον φαινότυπο που προκαλείται από τον μάρτυρα.

Τα πλασμίδια μετά την εισαγωγή τους στη γονάδα του ζώου διασπώνται σε τυχαία τμήματα που συνδέονται έπειτα μεταξύ τους και σχηματίζουν εξωχρωμοσωμικές αλληλουχίες DNA⁹⁶. Αυτές οι αλληλουχίες μεταβιβάζονται στους απογόνους με συχνότητα 5-95%. Λόγω του ότι οι αλληλουχίες αυτές δεν εντίθενται στο γονιδίωμα, τα ζώα είναι μωσαϊκά και για τη διατήρησή τους απαιτείται η συχνή επιλογή με βάση το φαινότυπο του μάρτυρα επιλογής.



Εικόνα 2.3 Απεικόνιση της κίνησης των πρόδρομων ωοκυττάρων από την είσοδο του υγρού που παρατηρείται κατά μία αποτελεσματική μικροένεση

ρRF4

Το ρRF4 χρησιμοποιείται ως συμπληρωματικός φορέας για το μετασχηματισμό σκουληκιών μαζί με το επιθυμητό πλασμίδιο. Προέρχεται από το ρBluescript και περιέχει το γονίδιο *rol-6(su1006)* που κωδικοποιεί μια μεταλλαγμένη μορφή κολλαγόνου. Όταν εισαχθεί στο σκουλήκι, συμπεριφέρεται ως επικρατής και προκαλεί μια ανωμαλία στη σωματική δομή που με τη σειρά της προκαλεί περιστροφική κυκλική κίνηση στο σκουλήκι (φαινότυπος roller).

Το πλασμίδιο ρRF4 αναμιγνυόταν με το πλασμίδιο που έφερε το επιθυμητό γενετικό υλικό σε ίσες συγκεντρώσεις (50μg/ml ή 100μg/ml). Οι απόγονοι της πρώτης θυγατρικής γενιάς που περιείχαν και τα δυο πλασμίδια εμφάνιζαν περιστροφική κίνηση γιατί η έκφραση του *rol-6(su1006)* επηρεάζει το σχηματισμό του κολλαγόνου της υποδερμίδας τους.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction; PCR) χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό ποικίλων αλληλουχιών DNA με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιούνταν συνήθως σε συνολικό όγκο 30μl, ενώ περιείχαν τα απαραίτητα συστατικά που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Συστατικά της αντίδρασης PCR	Τελική συγκέντρωση
DNA μήτρα	10-100 ng πλασμιδιακό DNA ή 100-400 ng γενωμικό DNA
dNTP's	200-500 μM (το καθένα)
Πρόσθιος εκκινητής	0.5-1 μM
Ανάστροφος εκκινητής	0.5-1 μM
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης	1X
MgCl ₂	1.5 mM
Πολυμεράση	0.05-0.1 U/μl

Πίνακας 2.6: Συστατικά που απαιτούνται για την PCR αντίδραση και η τελική τους συγκέντρωση στην αντίδραση.

Οι ακριβείς συνθήκες διαφοροποιούνται σε κάθε αντίδραση ανάλογα με το μέγεθος της αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και τη βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία υβριδοποιούνται οι εκκινητές (melting temperature: T_m). Η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση των εκκινητών και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 69.3 + 0.41\% \text{ GC} - \frac{650}{L}$$

Όπου:

- L=μήκος του εκκινητή σε βάσεις,
- GC= ζεύγη βάσεων γουανίνης κυτοσίνης

Ένας ακόμα καθοριστικός παράγοντας στην αντίδραση της PCR είναι ο χρόνος επιμήκυνσης που εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της αντίδρασης (συνήθως 1 λεπτό για κάθε 1000 βάσεις).

Τα στάδια που περιλαμβάνονται τυπικά σε κάθε αντίδραση είναι τα εξής:

Οι ακριβείς συνθήκες διαφοροποιούνται σε κάθε αντίδραση ανάλογα με το μέγεθος της αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και τη βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία υβριδοποιούνται οι εκκινητές (melting temperature: T_m). Η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση των εκκινητών και υπολογίζεται από τον τύπο:

- 3min στους 94°C .
- 30sec στους 94°C (στάδιο αποδιάταξης: Denaturation step) για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA εκμαγείου.
- 30sec σε θερμοκρασία $50-65^{\circ}\text{C}$ ($2-5^{\circ}\text{C}$ χαμηλότερη από την T_m των εκκινητών) για την υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου (Annealing step).
- Επώαση στους 72°C για να δράσει η πολυμεράση και να συνθέσει το τμήμα του DNA που περιλαμβάνεται μεταξύ των δυο εκκινητών (επιμήκυνση των εκκινητών: Extension step). Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί (1min/1000bp).
- Επανάληψη των σταδίων 2-4 για 25-35 κύκλους. Σε κάθε κύκλο συντίθενται και νέοι κλώνοι οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη σύνθεση και άλλων στους επόμενους κύκλους. Μετά από 20 με 30 κύκλους το επικρατές προϊόν της αντίδρασης είναι ένα τμήμα DNA που το μέγεθός του αντιστοιχεί στη μεταξύ των δυο εκκινητών απόσταση.
- 5min στους 72°C για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων αντιγραφής του DNA.

Τέλος της αντίδρασης και διατήρηση στους 4°C .

Εκκινητές		
Όνομα	Αλληλουχία	Περιγραφή
TIA Gen-1	CGGGATCCATGTCCTTCTTCAACCC	Για την ανίχνευση της έλλειψης του γονιδίου C18A3.5 (<i>tia1</i>)
TIA1/1 RT2	AGCACGCTCAGCTTCTTCTC	
TIAR RT Forward	GAAAGCCGATAACACGTCAG	Για qRT-PCR του γονιδίου C07A4.1 (<i>tia3</i>) και για την ανίχνευση της έλλειψης ok144 σε στελέχη μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο C07A4.1 (<i>tia3</i>)
TIAR Reverse BamHI	GCGGATCCCCATTGTGGGAAGGAACTG	
ama-1/Frw	CATTGTCTCACGCGTTCAGT	Για qRT-PCR στο γονίδιο-αναφοράς F36A4.7(<i>ama-1</i>)
ama-1/Rev	GCTCCAAATGACCGAAATGT	
TIA-1/1 (RT1)	GCAGCAGCAGTCAAAAATTG	Για qRT-PCR για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου C18A3.5 (<i>tia1</i>)
TIA1/1 (RT2)	AGCACGCTCAGCTTCTTCTC	
TIA-1/2(RT1)	ATCAGGCTACGCTGGCTTTA	Για qRT-PCR για τα επίπεδα έκφρασης του <i>tia2</i>
TIA-1/2(RT2)	CGGAGCTTTGTGCAATCAAT	
Dcap-1(RT2)	CCTGCTCCGTAGTGCTTCC	Για qRT-PCR για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου <i>dcap-1</i>
Dcap-1(RT3)	CGCTCACCTCAACCATATT	
HSP-70 Frw-1	GTCTACATGCAAAGCGATTGG	Για qRT-PCR για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου C12C8.1 που κωδικοποιεί την κύρια κυτταροπλασματική hsp-70 που επάγεται κατά το θερμικό σοκ
HSP-70 Rev-2	CAGCTTCAGCCGTTTCTTTC	

Πίνακας 2.7: Απεικόνιση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, της ακριβούς τους αλληλουχίας, καθώς και του προϊόντος που παράγεται.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ταυτοποιούνταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και 1x διαλύματος φόρτωσης DNA, εντός διαλύματος 1X TBE, σε ηλεκτρικό πεδίο 55-90 V. Το πήκτωμα φωτογραφίζεται αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 254 nm.

10X TBE	
Συστατικό	Συγκέντρωση (g/l)
Tris-Base	108
Βορικό οξύ (H ₃ BO ₃)	55
EDTA	9.3 ή 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8

Πίνακας 2.8: Απεικόνιση των συστατικών για την παρασκευή 10X TBE και η συγκέντρωσή τους.

Πήκτωμα αγαρόζης	
Συστατικό	Συγκέντρωση
Αγαρόζη	0.7-2% (w/v)
Βρωμιούχο αιθίδιο	0.5 µg/ml

Πίνακας 2.9: Απεικόνιση των συστατικών και των συγκεντρώσεών τους για την παρασκευή πήκτωματος αγαρόζης.

6X Διάλυμα φόρτωσης DNA		
Συστατικό	Συγκέντρωση (% w/v)	Ταχύτητα ηλεκτροφόρησης
Bromophenol blue	0.25	Ίση με εκείνη γραμμικού dsDNA μεγέθους ~300 bp
Xylene cyanol FF	0.25	Ίση με εκείνη γραμμικού dsDNA μεγέθους ~4 Kbp
Glycerol	30-50	

Πίνακας 2.10: Παράθεση των συστατικών για την παρασκευή 6X Διαλύματος φόρτωσης DNA και των συγκεντρώσεών τους.

2.3.1 Παρασκευή υποστρώματος DNA για την αντίδραση PCR

Στην αντίδραση PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με το σκοπό, είτε γενωμικό DNA από το *C. elegans* ή πλασμιδιακό DNA από τα κατάλληλα βακτήρια. Μπορεί όμως να γίνει κατευθείαν PCR σε ολόκληρους νηματώδεις (worm PCR).

2.3.1.1 PCR σε ολόκληρους νηματώδεις (worm PCR)

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Μεταφορά 1-10 σκουληκιών (ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης) σε μία σταγόνα 3µl TE η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό τμήμα του πώματος ενός σωληναρίου κατάλληλου για PCR.
2. Φυγοκέντρηση και τοποθέτηση των δειγμάτων στους 80 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά, ώστε να διευκολυνθεί η θραύση των ιστών.
3. Πρόσθεση ίσου όγκου διαλύματος λύσης με πρωτεΐνάση K (αναλυτικά πίνακας 2.11) , επώαση στους 65°C για 1 ώρα και 30 λεπτά και έπειτα στους 95°C για 30 λεπτά προκειμένου να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K. Η επώαση λαμβάνει χώρα σε thermocycler.
4. Τοποθέτηση των αντιδραστηρίων της αντίδρασης PCR.

Lysis buffer/proteinase K	
Συστατικό	Συγκέντρωση
KCl	50 mM
Tris HCl	10 mM PH 8,3
MgCl	2,5 mM
Triton x100	0,45%
Twin 20	0,45%
Πρωτεΐνάση K	200 µg/l

Πίνακας 2.11: Διάλυμα λύσης με πρωτεΐνάση K: αναλυτική παρουσίαση των συστατικών και των συγκεντρώσεών τους.

2.3.1.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από το *C. elegans*

Η διαδικασία που χρησιμοποιείται για την απομόνωση γενωμικού DNA έχει ως εξής:

1. Συλλογή των νηματώδων από τα τρυβλία με διάλυμα M9 σε σωληνάριο τύπου erpendorf.
2. Καθίζηση των νηματώδων, αφαίρεση του υπερκείμενου και τοποθέτηση 500μl διαλύματος M9. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.
3. Πρόσθεση ίσου όγκου το διάλυμα λύσης με πρωτεΐνωση K (αναλυτικά πίνακας 2.11) και επώαση στους 65°C για 12 ώρες .
4. Μετά την επώαση το διάλυμα χωρίζεται σε 2 σωληνάρια τύπου erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος ισοσταθμισμένου διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1).
5. Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο erpendorf.
7. Ακολουθεί καθίζηση του DNA με προσθήκη οξικού νατρίου 3M NaAC (1/10 του όγκου του υπερκείμενου) και απόλυτη αλκοόλη (2,5 του όγκου του υπερκείμενου).
8. Φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
9. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και έπειτα διαλύεται σε 20-30μl απιονισμένου αποστειρωμένου νερού.
10. Διατήρηση στους -20 °C μέχρι τη χρήση του.

2.4 Απομόνωση RNA, Δημιουργία cDNA και Ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (QRT-PCR)

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκαν τρία τρυβλία για κάθε στέλεχος με αυστηρά συγχρονισμένους και καλά τρεφόμενους πληθυσμούς. Οι πληθυσμοί αυτοί αναπτύχθηκαν παράλληλα στους 20°C και είτε συλλέχθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες (control) είτε μετά από θερμικό σοκ στους 35°C διάρκειας 3 ωρών.

Αρχικά οι νηματώδεις ξεπλύθηκαν από τα τρυβλία με M9 και συλλέχθηκαν σε σωληνάριο falcon. Έπειτα ξεπλύθηκαν 2 φορές με M9 και τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο erpendorf. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε ώστε να μείνει η πελλέτα των σκουληκιών και 100μl M9. Έπειτα τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν στους -80°C. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα ούτως ώστε να μην πεινάσουν οι νηματώδεις, γεγονός που θα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή ειδικών γονιδίων, αλλά και να διατηρηθούν τα αποτελέσματα του θερμικού σοκ στην γονιδιακή έκφραση.

Το ολικό RNA απομονώθηκε από τους νηματώδεις με χρησιμοποιώντας το NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey-Nagel) και ποσοτικοποιήθηκε μέσω του Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen). Ακολούθως, λήφθηκε η κατάλληλη ποσότητα ολικού RNA έτσι ώστε το cDNA που θα προέκυπτε να είχε συγκέντρωση 800ng/μl. Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με το iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad).

Η ποσοτική PCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το SsoFast™ EvaGreen Supermix (BioRad) στο σύστημα MiniOpticon MJ (BioRad). Τα δεδομένα της γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται ως οι φορές αλλαγής της αφθονίας των μεταγράφων mRNA σε κάθε στέλεχος νηματώδους σε σχέση με τον άγριο τύπο N2, ενώ όλα κανονικοποιούνται χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το ενδογενές γονίδιο *ama-1*, το οποίο κωδικοποιεί μια υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II. Τα σχετικά ποσά των mRNA προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη συγκριτική μέθοδο Ct για την ποσοτικοποίηση (A. Biosystems, 2004). Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε δύο τουλάχιστον ανεξάρτητα δείγματα, σε τρία αντίγραφα και κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκε μέσω του *ama-1* ανεξάρτητα. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος ± το

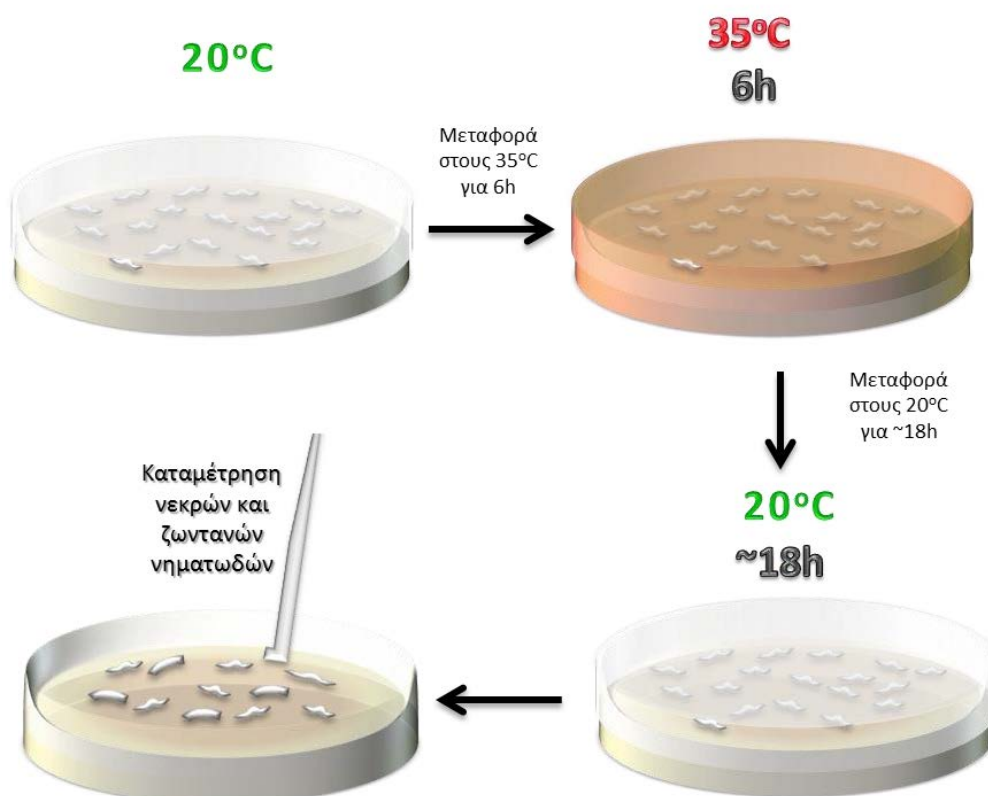
τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM) για τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 2.7.

2.5 Δοκιμές ανθεκτικότητας στο στρες (stress resistance assays)

Σε όλες τις ακόλουθες περιπτώσεις απεικονίζεται ο μέσος όρος (μέση τιμή \pm SD) τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων με ~ 120 άτομα ανά πείραμα για κάθε στέλεχος. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, για τον υπολογισμό των τιμών-P, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της συνάρτησης unpaired t-test του προγράμματος GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, California USA). Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν το η τιμή-P ήταν <0.05 . Τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, California USA).

2.5.1 Δοκιμές ανθεκτικότητας σε θερμικό σοκ (Heat-shock resistance assays)

Για την παρατήρηση των επιπτώσεων του θερμικού σοκ στην επιβίωση, 30 άτομα αναπτυξιακού σταδίου L4, αναπτυγμένα σε NGM/ OP-50 τρυβλία στους 20°C ή 25°C, τοποθετήθηκαν σε καθένα εκ των τρυβλίων για κάθε στέλεχος και αφέθηκαν επί μία νυκτί στους 20°C ή στους 25°C αντίστοιχα, ή μεταφέρονταν ανά 2 ημέρες σε νέα σε NGM/ OP-50 τρυβλία (20°C) ώστε να υποστούν θερμικό σοκ ως ενήλικα μίας ημέρας ή ως ενήλικα 5 ημερών αντίστοιχα. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα με σταθερή θερμοκρασία στους 35°C, αφέθηκαν επί 6 ώρες και μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα στους 20°C. Στην περίπτωση που η δοκιμή θερμικού σοκ περιλάμβανε τη σίγηση κάποιου γονιδίου μέσω RNAi, ενήλικα μίας ημέρας από συγχρονισμένους πληθυσμούς ανεπτυγμένους στους 20°C σε RNAi τρυβλία (control και antisense, προετοιμασμένα όπως περιγράφηκε) από την στιγμή εκκόλαψής τους, μεταφέρθηκαν σε OP-50 τρυβλία και αμέσως μετά μεταφέρθηκαν στον επωαστήρα. Μετά από μια νύχτα της ανάκαμψης στους 20°C ή στους 25°C (αντίστοιχα με την θερμοκρασία ανάπτυξης) το ποσοστό επιβίωσης των σκουληκιών προσδιορίστηκε αγγίζοντάς τα με ένα σύρμα από λευκόχρυσο.



Εικόνα 2.4 Απλουστευμένη σχηματική απεικόνιση της τυπικής διαδικασίας μίας δοκιμής θερμικού σοκ με θερμοκρασία ανάπτυξης των νηματωδών 20°C.

2.5.2 Δοκιμές ανθεκτικότητας στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV resistance assays)

Οι δοκιμές ανθεκτικότητας στην υπεριώδη ακτινοβολία πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα πέντε ημερών, στα οποία έχει τερματιστεί ο αναπαραγωγικός κύκλος. Αυτό ήταν απαραίτητο, καθώς η UV ακτινοβολία έχει πολύ έντονες επιδράσεις στην γαμετική σειρά, με αποτέλεσμα οι αναπαραγωγικά ενεργοί νηματώδεις να πεθαίνουν εξαιτίας της εκκόλαψης των απογόνων τους στο εσωτερικό τους.

Για την παρατήρηση των επιπτώσεων της υπεριώδους ακτινοβολίας στην επιβίωση, 30 άτομα αναπτυξιακού σταδίου L4, από συγχρονισμένους πληθυσμούς οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε NGM/ OP-50 τρυβλία στους 20°C, τοποθετήθηκαν σε καθένα εκ των τρυβλίων για κάθε στέλεχος και μεταφέρονταν ανά 2 ημέρες σε νέα σε NGM/ OP-50 τρυβλία (20°C). Ακολούθως, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία χωρίς βακτηριακή χλόη, οπότε και εκτέθηκαν σε UV ακτινοβολία εντάσεως 0,2 J/cm² ως ενήλικα 5 ημερών. Έπειτα, αφού οι νηματώδεις μεταφέρθηκαν μετά την παρέλευση 5-10min σε νέα NGM/OP50 τρυβλία, τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 20°C. Η εκτίμηση των ποσοστών επιβίωσης έλαβε χώρα τρεις ημέρες αργότερα, αγγίζοντας τους νηματώδεις με ένα σύρμα από λευκόχρυσο.

2.5.3 Δοκιμές ανθεκτικότητας στο οξειδωτικό στρες (Oxidative stress resistance assays)

Για την παρατήρηση των επιπτώσεων του οξειδωτικού στρες στην επιβίωση, 30 ερμαφρόδιτα ενήλικα μίας ημέρας (αναπτυγμένα σε NGM/ OP-50 τρυβλία στους 20°C) τοποθετήθηκαν σε καθένα εκ των τρυβλίων, τα οποία περιείχαν αρσενίτη του νατρίου σε συγκέντρωση 5mM, για κάθε στέλεχος και αφέθηκαν στους 20 °C. Οι μετρήσεις των ποσοστών επιβίωσης έλαβαν χώρα μετά από 24, 40 και 48, ή 24, 48, 72 και 90 ώρες, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος.

2.5.3.1 Παρασκευή τρυβλίων με Αρσενίτη του Νατρίου (Sodium Arsenite)

Για τα πειράματα με αρσενίτη του νατρίου χρησιμοποιούνται κανονικά OP-50/NGM τρυβλία των οποίων η βακτηριακή χλόη έχει θανατωθεί με έκθεση των τρυβλίων σε UV ακτινοβολία εντάσεως 0,5 J/cm² επί 2 φορές. Ακολούθως στα τρυβλία τοποθετούνται 300μl μείγματος M9 (170μl) και αρσενίτη του νατρίου (130μl,στοκ 0,5M), ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 5mM. Σημειώνεται ότι ο όγκος του θρεπτικού στο τρυβλίο είναι 13ml.

2.6 Ανάλυση της διάρκειας ζωής (longevity assays)

Για τα πειράματα προσδιορισμού της διάρκειας ζωής 35 περίπου άτομα αναπτυξιακού σταδίου L4 από συγχρονισμένους πληθυσμούς κάθε στελέχους, οι οποίοι αναπτύχθηκαν στους 20°C σε OP-50/NGM τρυβλία, επιλέγονταν και τοποθετούνταν σε OP-50/NGM τρυβλία (ημέρα μηδέν). Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιούνταν τουλάχιστον 3 τρυβλία. Οι νηματώδεις αναπτύσσονταν στους 20°C και ανά 2 μέρες μεταφέρονταν σε νέα τρυβλία για να μην εξαντληθεί η τροφή (ο θερμιδικός περιορισμός προάγει την μακροβιότητα οπότε το πείραμα δεν θα ήταν αξιόπιστο) αλλά και ώστε να μην συμβεί ανάμειξη των αρχικών πληθυσμών με τους απογόνους τους. Τα παραπάνω γίνονταν για κάθε στέλεχος σε παράλληλα τρυβλία και κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Οι μεταφορές γίνονταν τακτικά και προσεκτικά ώστε τα πιάτα να μην μολυνθούν από βακτήρια άλλου στελέχους ή μύκητες που μπορεί να επηρέαζαν το πείραμα.

Τα ζώα εξετάζονταν κάθε μέρα για την ικανότητα τους να κινούνται και να τρέφονται. Στα τελευταία στάδια όπου η κινητικότητά τους έχει ελαχιστοποιηθεί, τα ζώα ελέγχονταν για την ικανότητα απόκρισης σε κάποιο μηχανικό ερέθισμα και γίνονταν καταγραφή των επιζησάντων και των αποθνησκόντων ατόμων. Τα ζώα που χάνονταν για άλλους λόγους καταγράφονταν ως “censored”.

2.7 Συνεστιακό μικροσκόπιο

Το πρότυπο της έκφρασης των διαγονιδιακών στελεχών (που έχουν ως επίτοπο την GFP) παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal) Leica TCS SP5 εφοδιασμένο με το λογισμικό Leica Application Suite AF Lite 2.2.1 build 4842, με το οποίο έγινε και η μερική επεξεργασία των εικόνων. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν πάνω σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες, επιστρωμένες με ένα λεπτό στρώμα πηκτώματος αγαρόζης 2% σε H₂O. Στο στρώμα αγαρόζης προστέθηκε μικρή ποσότητα (5-10 μl) διαλύματος λεβαμιζόλης, το οποίο χρησιμοποιείται για την αναισθητοποίηση και ακινητοποίηση των νηματωδών. Η λεβαμιζόλη αποτελεί αγωνιστή των υποδοχέων νικοτινικού-ακετυλοχολίνης (nACh)⁸ και προκαλεί σπαστική παράλυση των μυών εξαιτίας της παρατεταμένης ενεργοποίησης των διεγερτικών nACh υποδοχέων στα σωματικά μυϊκά κύτταρα.

2.8 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στις καμπύλες μακροβιότητας (Log-rank test), σύγκριση χ^2 και τιμών P καθώς η γραφική απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Με το ίδιο πρόγραμμα πραγματοποιήθηκε η απεικόνιση και η στατική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στις δόκιμες ανθεκτικότητας στο στρες χρησιμοποιώντας ασύζευκτο (unpaired) t τεστ για την εξαγωγή δίπλευρης (two-tailed) τιμής P καθώς και το τεστ two-way ANOVA, το οποίο διαπιστώνει την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιδράσεις των άμεσων μεταβολών των συστατικών των PBs

Για τους σκοπούς της μελέτης χρησιμοποιήσαμε στελέχη νηματώδων που φέρουν μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας στα γονίδια *dcap-1* και *dcap-2* τα οποία κωδικοποιούν για βασικά συστατικά των σωματίων-P. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες DCAP-1 και DCAP-2 διαδραματίζουν καίριο ρόλο στον μεταβολισμό του mRNA καθώς αποτελούν τα ένζυμα αφαίρεσης της καλύπτρας του 5' άκρου των mRNAs του *C.elegans*.

Οι νηματώδεις που φέρουν μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *dcap-2* παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα και σημαντικά προβλήματα στην κίνηση, τα οποία επιδεινώνονται με την αύξηση της ηλικίας. Επιπλέον, η έλλειψη του γονιδίου της DCAP-1 έχει αρνητικές συνέπειες στην αναπαραγωγική ικανότητα στους 25°C, ενώ μικρά προβλήματα παρουσιάζονται και στην κινητικότητα. Τα μεταλλαγμένα για το *dcap-1* και *dcap-2* στελέχη παρουσιάζουν μειωμένη διάρκεια ζωής σε οποιαδήποτε θερμοκρασία καλλιέργειας των νηματώδων (20°C ή 25°C). Ωστόσο αν η αποσιώπηση των γονιδίων αυτών γίνει μέσω RNAi σε μετά-αναπτυξιακά στάδια, δεν υπάρχουν σημαντικές επιπτώσεις στη διάρκεια ζωής του νηματώδη άγριου τύπου, κάτι που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο των σωματίων P στην ανάπτυξη του *C. elegans*.

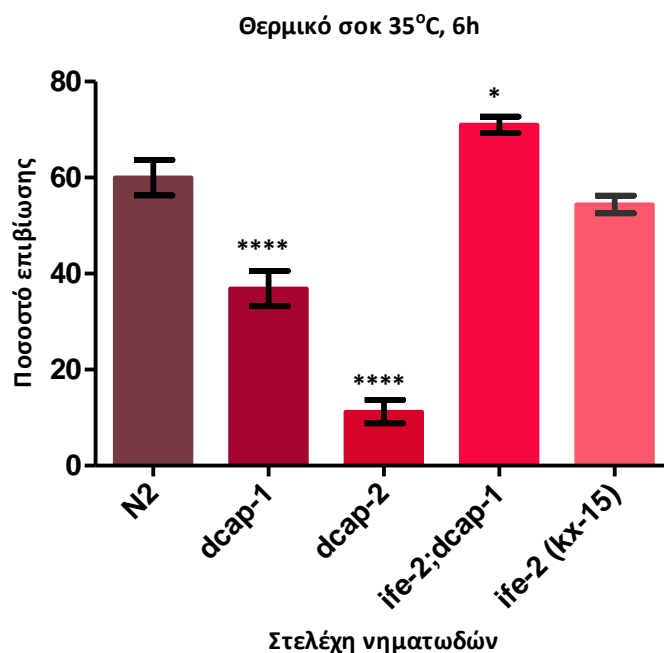
Αν και τα σωματία P είναι εμφανή και σε κύτταρα που αυξάνονται ενεργά σε μη στρεσογόνες συνθήκες, οι συνθήκες στρες, όπως θερμικό σοκ, επάγουν τον σχηματισμό τους^{4,34,74}. Καθώς η μετάφραση των mRNAs είναι σε ανταγωνιστική ισορροπία με τον σχηματισμό PBs, ανάλογη αύξηση στο μέγεθος και αριθμό των σωματίων-P είναι δυνατό να παρατηρηθεί και λόγω συσσώρευσης μη-μεταφραζόμενων mRNAs λόγω καταστολής της έναρξης της μετάφρασης. Κατά τον τρόπο αυτό, η έλλειψη του IFE-2, που αποτελεί μια από τις πέντε ισομορφές του eIF4E (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4E), μειώνει τον ρυθμό της έναρξης της μετάφρασης και προκαλεί αυξημένη δημιουργία PBs.

Προκειμένου να προσεγγίσουμε τον ρόλο των σωματίων P στην απόκριση στο στρες πραγματοποιήσαμε δοκιμές ανθεκτικότητας στο στρες σε νηματώδεις οι οποίοι δεν διέθεταν λειτουργικές DCAP-1 ή DCAP-2, ενώ για να διερευνήσουμε τις πιθανές επιδράσεις της παράλληλης μείωσης του ρυθμού έναρξης της μετάφρασης, χρησιμοποιήσαμε στέλεχος διπλά μεταλλαγμένο για τα γονίδια *ife-2* και *dcap-1*, πάντα σε σύγκριση με τον άγριο τύπο (N2). Ταυτόχρονα, ενώ οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έναρξη της μετάφρασης γενικά απουσιάζουν από τα PBs, ο eIF4E έχει χαρακτηριστεί ως συστατικό των σωματίων P στη ζύμη και σε κύτταρα των θηλαστικών, ενώ ο IFE-2 έχει δείχθει να συσσωρεύεται σε δομές ανάλογες των PBs στον *C.elegans* μετά από θερμικό σοκ. Στον *C.elegans* οι διαταραχές στην έναρξη της μετάφρασης επάγει τον σχηματισμό σωματίων P¹²⁵. Στο εργαστήριό μας έχει παρατηρηθεί ότι σε διαγονιδιακά *ife-2* στελέχη που εκφράζουν την DCAP-1::GFP χιμαιρική πρωτεΐνη είναι δυνατή η παρατήρηση αυξημένων συσσωματωμάτων της ακόμη και υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια λειτουργίας της DCAP2 αυξάνει την δημιουργία συσσωματωμάτων της DCAP-1 σε μεταμεταφραστικό επίπεδο^{125,106}.

3.1.1 Αντοχή στη θερμική καταπόνηση

Για την πραγματοποίηση των δοκιμών ανθεκτικότητας στην θερμική καταπόνηση οι νηματώδεις αναπτύσσονταν στους 20°C ή 25°C μέχρι την πρώτη ή την πέμπτη ημέρα της ενηλικίωσής τους και υποβάλλονταν σε θερμικό σοκ διάρκειας έξι ωρών σε θερμοκρασία 35°C. Έπειτα επαναφέρονταν στους 20°C ή 25°C αντιστοίχως και ο προσδιορισμός του ποσοστού επιβίωσης γινόταν μετά από ~18h (αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.5.1).

Η έλλειψη των γονιδίων *dcap-1* ή *dcap-2* μειώνει την ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ, αλλά η συνδυασμένη απώλεια λειτουργίας των *dcap-1* και *ife-2* την αυξάνει.

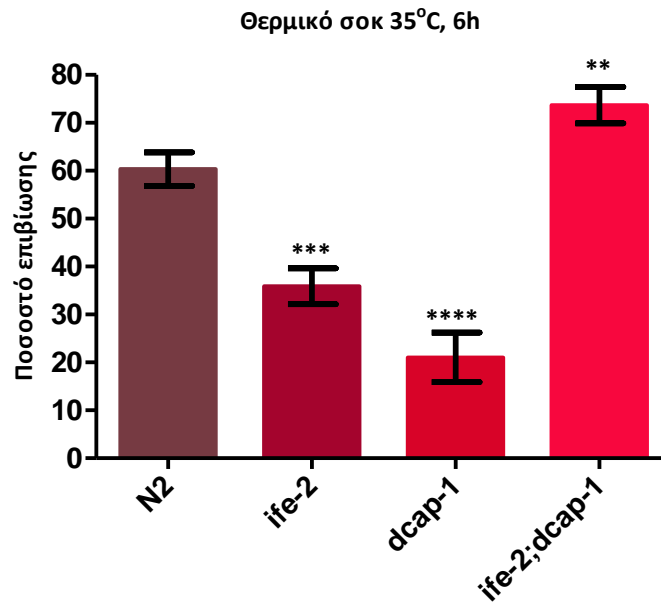


Γράφημα 3.1: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, οι οποίοι φέρουν μεταλλαγές στα γονίδια *dcap-2*, *dcap-1* ή/και στο *ife-2*, μετά από θερμικό σοκ σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Τα ζώα βρίσκονταν στην 1η ημέρα της ενηλικίωσής τους και είχαν αναπτυχθεί σε NGM OP-50 τρυβλία στους 20°C. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό); ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Τα δεδομένα μας αποκαλύπτουν μία εξαιρετικής σημασίας μείωση της ικανότητας ανάκαμψης μετά από θερμική καταπόνηση στα στελέχη που φέρουν μεταλλαγές στα γονίδια *dcap-1* και *dcap-2*, υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια αυτά είναι σημαντικά για την διατήρηση της ομοιόστασης κατά το θερμικό στρες.

Ωστόσο, εάν η έλλειψη του *dcap-1* συνδυαστεί με την έλλειψη του *ife-2*, η ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ ξεπερνά σε σημαντικό βαθμό ακόμη και αυτή του αγρίου τύπου (N2). Άρα η μείωση των επιπέδων πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία οδηγεί στη συσσώρευση μη-μεταφραζόμενων mRNAs και την αύξηση στον σχηματισμό PBs, σώζει τον *dcap-1* φαινότυπο όσο αφορά την ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ. Πιθανώς η έλλειψη ενός παράγοντα που συμμετέχει στην έναρξη της μετάφρασης (IFE-2) και ενός που συμμετέχει στην διάσπαση του mRNA (DCAP-1), εξισορροπεί αυτές τις δύο ανταγωνιζόμενες διαδικασίες.

Καθώς η επίδραση της έλλειψης του IFE-2 είναι ισχυρότερη όταν οι νηματώδεις αναπτύσσονται στους 25°C, στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανθεκτικότητας στο θερμικό σοκ σε *C.elegans* μεταλλαγμένα για το *dcap-1* ή/και το *ife-2* με σκοπό να διαπιστώσουμε αν εξακολουθεί να είναι ανθεκτικό το διπλά μεταλλαγμένο *ife-2; dcap-1* στέλεχος. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Στελέχη νηματωδών

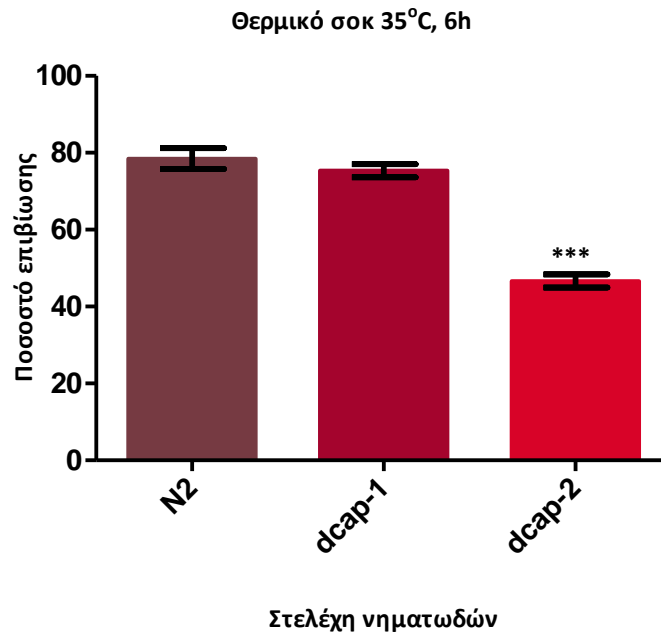
Γράφημα 3.2: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, οι οποίοι φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *dcap-1* ή/και *ife-2*, μετά από θερμικό σοκ σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Τα ζώα βρισκόταν στην 1η ημέρα της ενηλικίωσης τους και είχαν αναπτυχθεί σε NGM OP-50 τρυβλία στους 25°C. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό); ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Όταν τα ζώα αναπτύσσονται στους 25°C, ιδιαίτερα δυσμενή αποτελέσματα στην επιβίωση μετά από θερμική καταπόνηση δεν έχει μόνο η έλλειψη της DCAP-1, αλλά και του IFE-2, του οποίου η έλλειψη δεν είχε επίδραση όταν η θερμοκρασία ανάπτυξης ήταν οι 20°C (Γράφημα 3.1). Αντίθετα, η ανθεκτικότητα του διπλά μεταλλαγμένου *ife-2;dcap-1* στελέχους παρουσιάζεται εξαιρετικά αυξημένη ακόμη και σε σχέση με αυτή των αγρίου τύπου ζώων, μία αύξηση η οποία ξεπέρνα αυτή που είχε παρατηρηθεί όταν οι νηματώδεις αναπτύσσονταν στους 20°C (Γράφημα 3.1). Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο γράφημα 3.2, ο συνδυασμός δύο μεταλλαγών οι οποίες έχουν αρνητικές συνέπειες, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε θετικό αποτέλεσμα.

Έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα θηλαστικών ότι τα mRNAs που είναι δεσμευμένα από eIF4E και 4E-T είναι ανθεκτικά σε αφαίρεση της καλύπτρας και κατά προτίμηση να αποθηκεύονται στα PBs, αντί να αποικοδομούνται. Η έλλειψη του eIF4E ενδέχεται να οδηγούσε στην αποικοδόμηση αυτών των mRNAs, τα οποία όμως κανονικά θα έπρεπε να αποθηκευτούν και να επιστρέψουν στα πολυσώματα όταν τερματιστεί η κατάσταση στρες. Πιθανώς, η ελαττωματική αποικοδόμηση των mRNAs εξαιτίας της έλλειψης της DCAP-1 αποτρέπει την διάσπαση τους, με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμα για μετάφραση προκειμένου να επιδιορθωθούν οι οφειλόμενες στο στρες βλάβες¹⁰⁶.

Μεταβολές στον σχηματισμό των σωματίων P έχουν παρατηρηθεί και με την αύξηση της ηλικίας. Συγκεκριμένα, σε μεγαλύτερης ηλικίας (5-6 ημερών) ενήλικα, ο σχηματισμός των PBs είναι αυξημένος, δείχνοντας ότι οι δομές αυτές επάγονται κατά την διάρκεια της ζωής¹²⁵. Για να εξακριβωθεί εάν η μεταβολή αυτή έχει κάποια επίδραση στην απόκριση και ανάκαμψη μετά από θερμική καταπόνηση, αντίστοιχα πειράματα έγιναν με *C.elegans* που βρισκόταν στην πέμπτη ημέρα της ενηλικίωσης τους.

Η επιβίωση ενήλικων πέντε ημερών μετά από θερμικό σοκ μειώνεται μόνο από την έλλειψη του *dcap-2*.



Γράφημα 3.3 Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, οι οποίοι φέρουν μεταλλάξεις σε βασικές συνιστώσες των SGs σε σύγκριση με τον άγριο τύπο, μετά από θερμικό σοκ. Τα σκουλήκια βρέσκονταν στην 5^η ημέρα της ενηλικίωσής τους και είχαν καλλιεργηθεί σε NGM OP-50 τρυβλία στους 20°C. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό), ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Το ποσοστό επιβίωσης μετά από θερμικό σοκ δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της DCAP-1 σε ενήλικα που βρίσκονται στην 5^η ημέρα της ενηλικίωσής τους, σε αντίθεση με την DCAP-2 της οποίας η έλλειψη επιδεινώνει σε εξαιρετικό βαθμό την ικανότητα επιβίωσης (Γράφημα 3.3). Αντίθετα, σε νεαρά ενήλικα (1^η ημέρα ενηλικίωσης) η επιβίωση στο θερμικό σοκ δεν εξαρτάται μόνο από το γονίδιο *dcap-2*, αλλά και από το *dcap-1* (αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το *dcap-2*) (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**). Έχει παρατηρηθεί μία ύξηση του σχηματισμού συσσωματωμάτων της DCAP-1 με την ηλικία η οποία πιθανώς να συνδέεται με την ηλικιοεξαρτώμενη μεταβολή της ανθεκτικότητας των στελεχών από τα οποία απουσιάζει η *dcap-1*.

Επομένως, η DCAP-2 είναι απαραίτητη για την φυσιολογική απόκριση στο θερμικό στρες ανεξάρτητα της ηλικίας. Είναι γνωστό από δεδομένα του εργαστηρίου μας, ότι στα *dcap-2* μεταλλάγματα παρατηρείται επαγωγή της δημιουργίας DCAP-1 συσσωματωμάτων. Ωστόσο, τα επίπεδα του mRNA του *dcap-1* δεν παρουσιάζουν αύξηση, υποδηλώνοντας ότι ο αυξημένος σχηματισμός PBs οφείλεται στη συσσώρευση των υπαρχουσών DCAP-1 πρωτεϊνών.

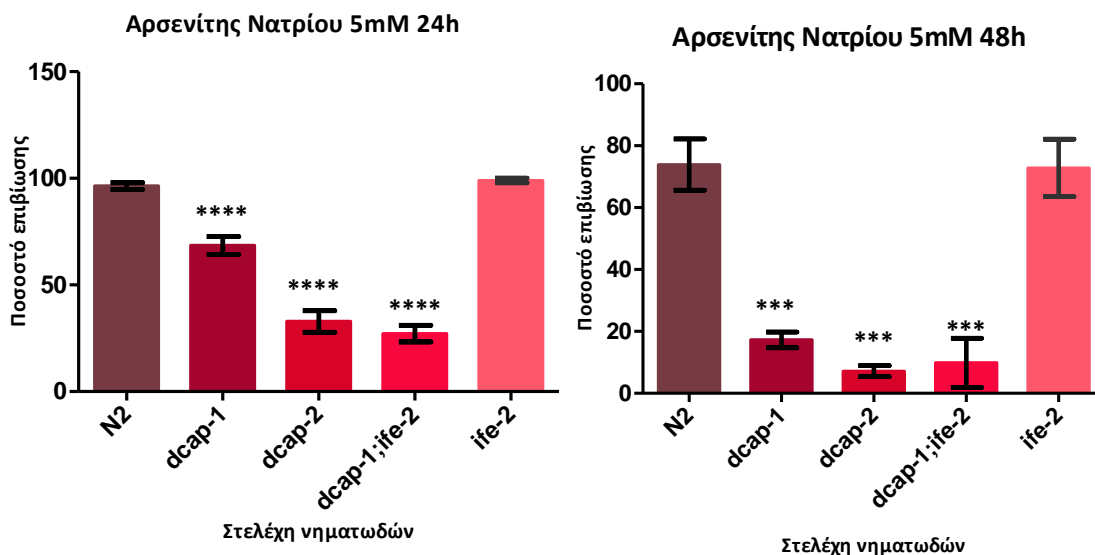
3.1.2 Ανθεκτικότητα στο προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) οξειδωτικό στρες

Με σκοπό να μελετήσουμε περαιτέρω την σημασία του μεταβολισμού των mRNAs στα σωματία P στις διεργασίες που διέπουν την απόκριση και επιβίωση κατά το στρες, εκθέσαμε τα ίδια μεταλλαγμένα στελέχη νηματωδών σε αρσενίτη του νατρίου. Ο αρσενίτης παρεμβαίνει σε διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, παρεμποδίζει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα προξενεί την οξείδωση των κατάλοιπων κυστεΐνης των αντιοξειδωτικών μορίων του κυττάρου, καθιστώντας τα αδρανή. Αυτό έχει ως επακόλουθο την αύξηση των επιπέδων ROS (reactive oxygen species) και την πρόκληση οξειδωτικού στρες, με αρνητικές συνέπειες για την επιβίωση.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ανθεκτικότητας σε αρσενίτη, νηματώδεις που είχαν αναπτυχθεί στους 20°C μέχρι την πρώτη ημέρα της ενηλικίωσής τους, μεταφέρονταν σε τρυβλία που περιείχαν αρσενίτη του νατρίου σε

συγκέντρωση 5mM και επώαζονταν στους 20°C. Το ποσοστό επιβίωσης προσδιοριζόταν μετά από 24 και 48 ώρες (αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.5.2).

Οι πρωτεΐνες DCAP-1 και DCAP-2 είναι απαραίτητες για την επιβίωση κατά το προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) οξειδωτικό στρες.



Γράφημα 3.4: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών μετά από έκθεση σε 5mM αρσενίτη νατρίου επί 24 και 48 ώρες, οι οποίοι φέρουν μεταλλαγές γονίδια που κωδικοποιούν βασικές συνιστώσες των PBs ή/και στο *ife-2* σε σύγκριση με τον άγριο τύπο.

*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Όπως απεικονίζεται στο παραπάνω διάγραμμα, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι τα γονίδια *dcap-1* και *dcap-2* είναι άκρως αναγκαία για την φυσιολογική απόκριση και επιβίωση κατά το προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου στρες. Η μείωση των επιπέδων πρωτεϊνοσύνθεσης λόγω έλλειψης του *ife-2* είχε δείχθει να προστατεύει τους νηματώδεις από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το paraquat ή το NaN_3 ¹²⁷. Ωστόσο στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από αρσενίτη, η απώλεια του *ife-2* δεν φαίνεται να έχει θετικές επιδράσεις στην ικανότητα επιβίωσης καθώς το ποσοστό επιβίωσης του μεταλλαγμένου για το *ife-2* στελέχους είναι όμοιο με αυτό των νηματωδών αγρίου τύπου, τόσο μετά από 24 όσο και μετά από 48 ώρες.

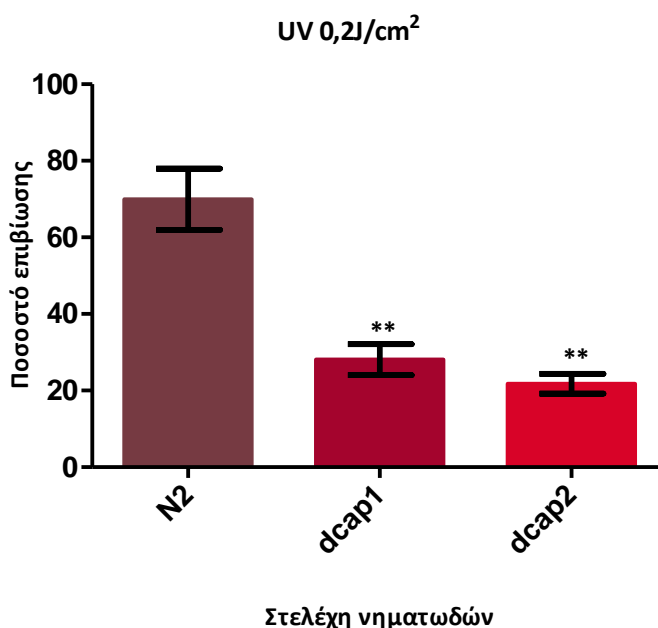
Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο ότι ο αρσενίτης, εξαιτίας των αρνητικών του επιδράσεων στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, εν μέρει επάγει και τους μηχανισμούς απόκρισης στο θερμικό σοκ, κατά το οποίο η απώλεια του γονιδίου *ife-2* είχε μάλλον αρνητικές επιδράσεις. Ως εκ τούτου η παρατηρούμενη ικανότητα επιβίωσης η οποία να ανάλογη με του N2 πιθανώς να προκύπτει μέσω αθροιστικών επιδράσεων της μειωμένης έναρξης της μετάφρασης οι οποίες στην μία περίπτωση (οξειδωτικό στρες) είναι θετικές ενώ στην άλλη (θερμικό είναι αρνητικές).

Επιπλέον, η έλλειψη του *ife-2* δεν επηρεάζει την οφειλόμενη στην απώλεια του *dcap-1*, ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες. Αντίθετα, όπως προκύπτει από την αυξημένη ανθεκτικότητα του *dcap-1; ife-2* διπλά μεταλλαγμένου στελέχους, η ταυτόχρονη με την απώλεια του γονιδίου *dcap-1*, έλλειψη του *ife-2* είχε ευνοϊκές επιδράσεις στην επιβίωση μετά από θερμικό σοκ (Γράφημα 3.1), υποδεικνύοντας ότι διαφορετικοί μηχανισμοί διέπουν την απόκριση στο προκαλούμενο από αρσενίτη στρες και στην θερμική καταπόνηση, τουλάχιστον όσο αφορά την ισορροπία των διεργασιών έναρξης της μετάφρασης και διάσπασης/αποθήκευσης στα σωματίδια P.

3.1.3 Έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της ελαττωματικής διάσπασης του mRNA εξαιτίας της απουσίας της DCAP-1 ή της DCAP-2 μελετήθηκαν και μετά από την έκθεση των νηματωδών σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για τις εν λόγω δοκιμές, νηματώδεις ηλικίας πέντε ημερών, οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί σε NGM/OP-50 τρυβλία στους 20°C, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία χωρίς βακτηριακή καλλιέργεια (ώστε να μην μεταβληθεί την πρόσπτωση των ακτινών) και εκτέθηκαν σε UV ακτινοβολία εντάσεως 0,2J/cm². Μετά από λίγα λεπτά μεταφέρθηκαν σε νέα NGM/OP-50 τρυβλία στους 20°C και ο προσδιορισμός του ποσοστού επιβίωσης τους έλαβε χώρα μετά από 3 ημέρες (αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.5.3).

Τα *dcap-1* ή *dcap-2* μεταλλαγμένα στελέχη είναι ευαίσθητα στην UV ακτινοβολία.



Γράφημα 3.5 Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών (5 ημερών), οι οποίοι φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια βασικών συνιστωσών των PBs, μετά από έκθεση σε 0,2J/cm² UV ακτινοβολίας, σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό); ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Οι λειτουργίες που διαμεσολαβούνται από τα γονίδια *dcap-1* και *dcap-2* είναι πολύ σημαντικές για την φυσιολογική απόκριση στην UV ακτινοβολία. (Γράφημα 3.5).

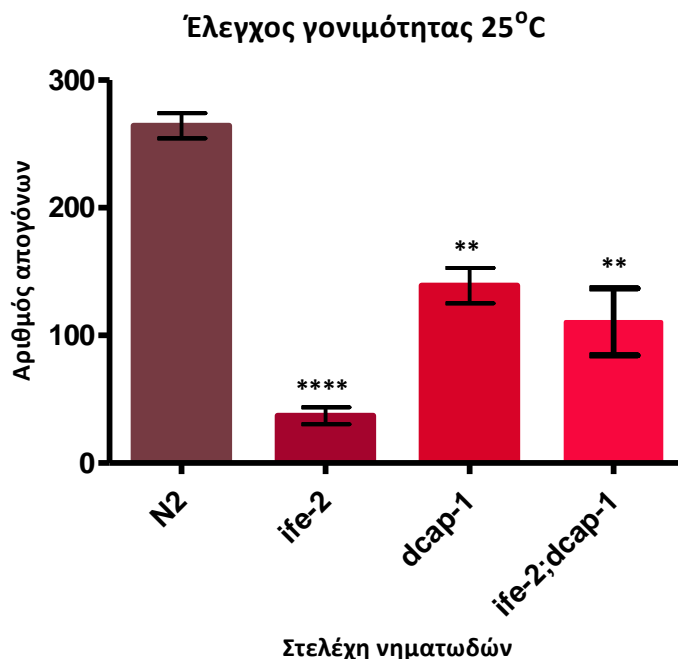
Από τα δεδομένα μας γίνεται φανερό ότι ο σχηματισμός λειτουργικών σωματίων P (ο οποίος απαιτεί την DCAP-1 και DCAP-2) είναι απαραίτητος για την απόκριση και ανάκαμψη μετά από όλες τις στρεσογόνες συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Μία εξαίρεση αποτελεί η αμετάβλητη από την έλλειψη της DCAP-1 ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ σε ενήλικα πέντε ημερών.

3.1.4 Γονιμότητα

Τα γονίδια *ife-2* και *dcap-1* είναι απαραίτητα για την φυσιολογική γονιμότητα στους 25°C.

Τα ζώα που έφεραν μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας των γονιδίων *dcap-1* ή *ife-2* έχουν σημαντικά μειωμένη γονιμότητα μόνο στους 25°C. Μετά την παρατήρηση των θετικών επιδράσεων του συνδυασμού των μεταλλαγών στα γονίδια αυτά κατά την απόκριση στο θερμικό σοκ, θελήσαμε να εξακριβώσουμε την επίδραση της ταυτόχρονης

μεταλλαγής των γονιδίων *dcap-1* και *ife-2* στην γονιμότητα των νηματωδών στους 25°C, για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει κάποια θετική επίδραση.



Γράφημα 3.6: Αναπαραγωγική ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών για το γονίδιο *dcap-1* ή *ife-2* σε σχέση με το στέλεχος φυσικού τύπου (N2) στους 25°C.

*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Όπως αναμενόταν, τα ζώα που δεν διαθέτουν λειτουργικό IFE-2 έχουν ιδιαίτερα περιορισμένη δυνατότητα αναπαραγωγής στους 25°C και πολλά από τα αυγά που εναπόθεταν δεν εκκολάπτονταν. Η μειωμένη γονιμότητα του συγκεκριμένου στελέχους στους 25°C αποδίδεται στο ότι ο IFE-2 είναι απαραίτητος για τη διαδικασία του ανασυνδυασμού κατά τη μείωση¹²¹. Επιπροσθέτως, μια πολύ σημαντική μείωση στην αναπαραγωγική ικανότητα παρατηρείται στο στέλεχος *dcap-1*. Η γονιμότητα του διπλά μεταλλαγμένου *dcap-1;ife-2* στελέχους είναι ανάλογη με αυτή του *dcap-1* και σε κάποιο βαθμό υψηλότερη από του *ife-2*. Το τελευταίο υποδηλώνει ότι στην περίπτωση αυτή η έλλειψη του *dcap-1* έχει κάποιες ευνοϊκές επιδράσεις στον *ife-2* φαινότυπο.

3.2 Επιδράσεις των άμεσων μεταβολών των συστατικών των κοκκίων στρες (SGs).

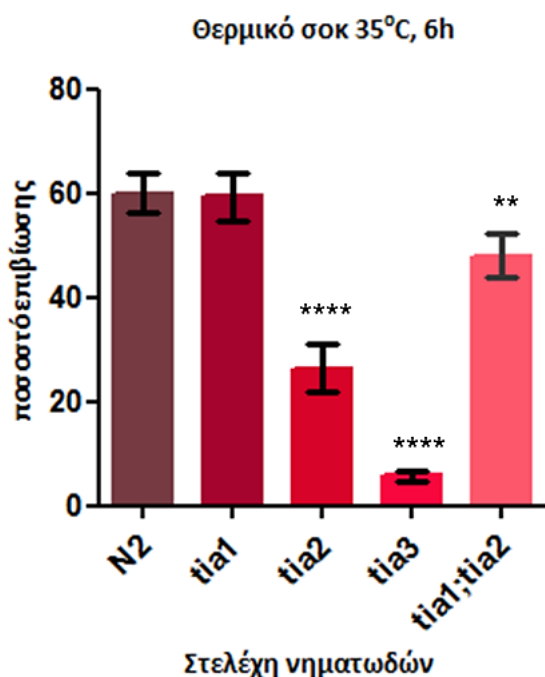
Τα κοκκία στρες αποτελούν ριβονουκλεϊκά σωματίδια συνδεδεμένα στη λειτουργία και την σύνθεση με τα PBs. Τα SGs σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των θηλαστικών σε απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες και διαμεσολαβούν την μεταφραστική σίγηση και τον επαναπρογραμματισμό της μετάφρασης, με τρόπο τέτοιο ώστε να διατηρείται το αναβολικό δυναμικό και τα απαραίτητα mRNAs, άλλα και να προωθείται η επιδιόρθωση των προκαλούμενων από το στρες μοριακών βλαβών (Anderson & Kedersha, 2006). Κατά συνέπεια, οι μεταβολές στα συστατικά τους ενδέχεται να επηρεάσουν την ικανότητα ενός οργανισμού να ανταπεξέλθει στο στρες. Στα θηλαστικά, βασικές συστατώσεις των SGs και υπεύθυνες για τον σχηματισμό τους είναι οι πρωτεΐνες TIA-1 (T-cell-restricted

intracellular antigen-1) και TIAR (TIA-1-related) (Kedersha 1999). Η συστηματική ανάλυση του γονιδιώματος του *C.elegans* κατέδειξε τρία γονίδια που κωδικοποιούν ορθόλογα των TIA πρωτεϊνών, τα *tia1*, *tia2* και *tia3*. Οι απώλεια της λειτουργίας ή η υπερέκφραση των γονιδίων αυτών, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσεγγίσουμε τον ρόλο των κοκκίων στρες στην απόκριση στις αντίξοες συνθήκες και την διάρκεια ζωής του *C.elegans*.

3.2.1 Ανθεκτικότητα στη θερμική καταπόνηση

Για τις δοκιμές ανθεκτικότητας στο θερμικό στρες οι νηματώδεις αναπτύσσονταν στους 20 °C μέχρι την πρώτη ή την πέμπτη ημέρα της ενηλικίωσής τους και υποβάλλονταν σε θερμικό σοκ σε θερμοκρασία 35 °C επί 6 ώρες. Έπειτα επαναφέρονταν στους 20 °C και ο προσδιορισμός του ποσοστού επιβίωσης γινόταν μετά από ~18h (αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.5.1).

Η έλλειψη των *tia2* και *tia3* γονιδίων μειώνει την δυνατότητα απόκρισης στο θερμικό στρες σε νεαρούς νηματώδεις.



Γράφημα 3.7: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, οι οποίοι φέρουν μεταλλάξεις σε βασικές συνιστώσες των SGs, μετά από θερμικό σοκ σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου άτομα. Τα ζώα είχαν αναπτυχθεί σε NGM OP-50 τρυβλία στους 20°C και βρίσκονταν στην 1^η ημέρα της ενηλικίωσής τους.

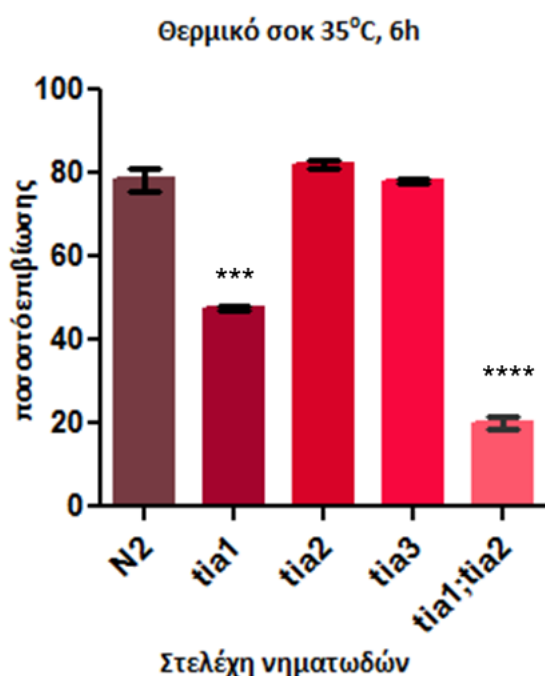
*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Όπως φαίνεται και στο γράφημα 3.6, η λειτουργία της πρωτεΐνης TIA3 είναι απολύτως απαραίτητες για την απόκριση και ανάκαμψη από την θερμική καταπόνηση σε νεαρούς νηματώδεις. Επιπροσθέτως, το *tia2* μεταλλαγμένο στέλεχος είναι ευάλωτο στο θερμικό στρες, ενώ η έλλειψη του *tia1* γονιδίου δεν φαίνεται να επηρεάζει την αντοχή στην αυξημένη θερμοκρασία. Η ικανότητα επιβίωσης του διπλά μεταλλαγμένου στελέχους είναι σημαντικά βελτιωμένη σε σχέση με το *tia2* μετάλλαγμα, αλλά και σημαντικά μειωμένη σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ακόμη, αξίζει να

σημειωθεί, ότι η παρατηρούμενη διαφορά των ποσοστών επιβίωσης μεταξύ των *tia1* και *tia1;tia2* μεταλλαγμένων στελεχών δεν είναι στατιστικά σημαντική (τιμή $P=0,083$).

Σε ενήλικα πέντε ημερών, η επιβίωση μετά από θερμικό σοκ μειώνεται από την απώλεια λειτουργίας του *tia1*, ή την συνδυασμένη έλλειψη των *tia1* και *tia2*.

Με σκοπό να ελέγξουμε το εάν η αντοχή στο θερμικό σοκ μεταβάλλεται στα διάφορα μεταλλαγμένα για τις TIA πρωτεΐνες στελέχη με την αύξηση της ηλικίας, έγινε ανάλογη σειρά πειραμάτων ανθεκτικότητας στο θερμικό σοκ κατά την πέμπτη ημέρα της ενηλικίωσης των νηματωδών.

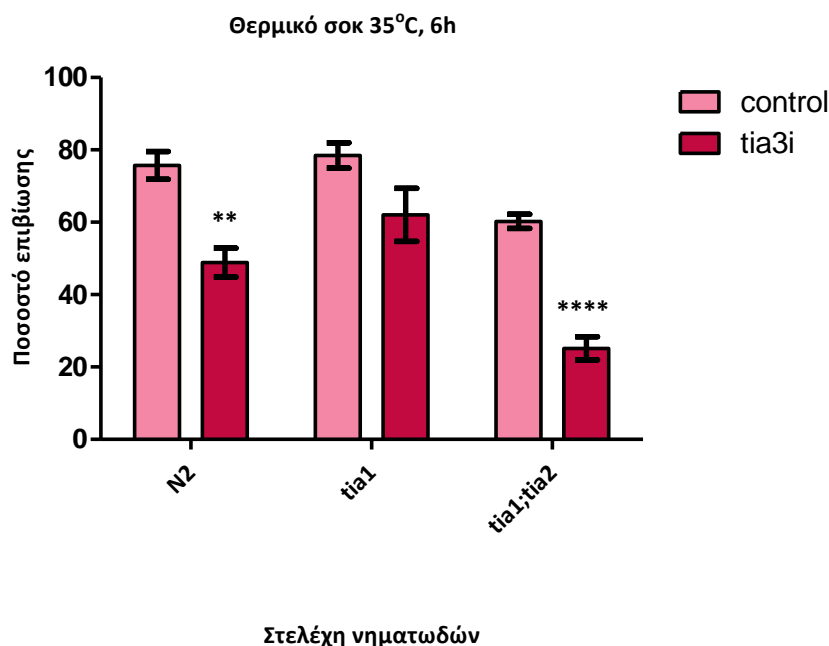


Γράφημα 3.8: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, οι οποίοι φέρουν μεταλλαγές σε βασικές συνιστώσες των SGs σε σύγκριση με τον άγριο τύπο, μετά από θερμικό σοκ. Τα σκουλήκια βρέσκονταν στην 5^η ημέρα της ενηλικίωσής τους και είχαν καλλιεργηθεί σε NGM OP-50 τρυβλία στους 20°C. *: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό), ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Τα δεδομένα που απεικονίζονται στο γράφημα 3.7 προτείνουν ότι στα μεγαλύτερης ηλικίας ενήλικα η ύπαρξη της TIA1 είναι εξαιρετικά σημαντική για την φυσιολογική απόκριση στο θερμικό σοκ, καθώς υπάρχει μεγάλη μείωση του ποσοστού επιβίωσης στα στελέχη στα οποία λείπει η *tia1*, η οποία επιδεινώνεται από την συνδυασμένη έλλειψη του *tia2*. Είναι εμφανές ότι η ανθεκτικότητα των ενήλικων 5 ημερών που φέρουν μεταλλαγές σε βασικά συστατικά των SGs, παρουσιάζει μεγάλη αντίθεση σε σχέση με αυτή των νεαρών ενηλικίων (γράφημα 3.6), που δεν διαθέτουν τα αντίστοιχα γονίδια. Η αντοχή στο θερμικό σοκ μεταβάλλεται με την ηλικία στα διάφορα μεταλλάγματα και πιθανώς αντανάκλα τυχόν μεταβολές της διαθεσιμότητας ή της ενεργότητας των TIA πρωτεϊνών κατά την διάρκεια ζωής ή/και συνδέεται με διάφορες ηλικιοεξαρτώμενες μεταβολές.

Καθώς η παρουσία του γονιδίου *tia1* φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ μόνο στους νηματώδεις μεγαλύτερης ηλικίας, σε αντίθεση με τα *tia2* και *tia3* και γνωρίζοντας ότι η έκφραση του *tia3* μειώνεται με την ηλικία, υποθέσαμε ότι η παρατηρούμενη ευαισθησία των *tia1* και *tia1;tia2* μεταλλαγμάτων πιθανώς να οφείλεται στη πτώση των επιπέδων έκφρασης του *tia3*, το οποίο θα μπορούσε μερικώς να μετριάξει την έλλειψη των άλλων *tia* γονιδίων. Προκειμένου να διαπιστώσουμε την εγκυρότητα αυτής της υπόθεσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανθεκτικότητας στη θερμική καταπόνηση ασκώντας RNAi για το *tia3* σε ενήλικα που βρίσκονταν στην πρώτη ημέρα της ενηλικίωσής τους (Γράφημα 3.8).

Η αδρανοποίηση του *tia3* μέσω RNAi έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανθεκτικότητα στην θερμική καταπόνηση.



Γράφημα 3.9: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, που βρίσκονταν στην 1^η ημέρα της ενηλικίωσής τους και ανεπτυγμένων σε control και *tia3i* τρυβλία στους 20°C, μετά από θερμικό σοκ.

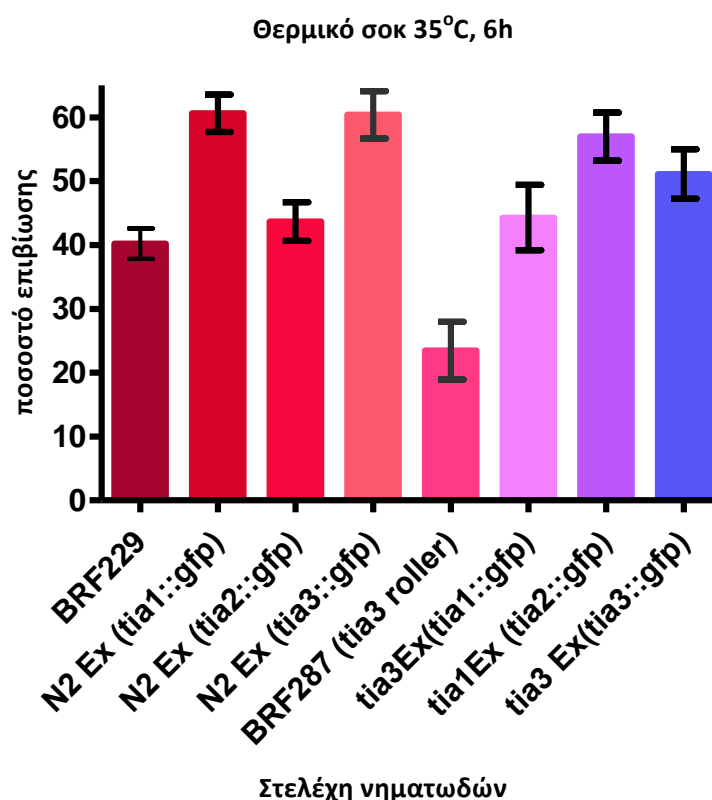
Μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων με two-way ANOVA τεστ, καταλήγουμε ότι υπάρχει γενικά εξαιρετικά μεγάλη επίδραση της απενεργοποίησης του *tia3* μέσω RNAi (τιμή $P < 0,0001$). Ακόμη, η επίδραση φαίνεται να μην εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την απουσία της TIA1 ή της TIA1 και TIA2.

Επομένως το γεγονός ότι τα μεταλλαγμένα για το *tia1* ενήλικα πέντε ημερών είναι πολύ πιο ευαίσθητα στο θερμικό σοκ από τα αντίστοιχης ηλικίας αγρίου τύπου ενήλικα, ενώ τα νεαρά ενήλικα δεν επηρεάζονται από την έλλειψη της TIA, δεν φαίνεται να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων της TIA3 στα ενήλικα μεγαλύτερης ηλικίας. Δηλαδή, καθώς η έλλειψη της TIA3 έχει σχεδόν την ίδια επίδραση σε όλα τα υπόβαθρα όσον αφορά την ανθεκτικότητα στη θερμική καταπόνηση, η εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση της έκφρασής της δεν είναι υπεύθυνη για το γεγονός ότι μόνο στα ενήλικα πέντε ημερών παρατηρείται μειωμένη επιβίωση σε σχέση με το N2.

Αν και η μείωση του ποσοστού επιβίωσης του *tia-1* μεταλλάγματος μετά από απενεργοποίηση του *tia3* δεν προκύπτει να είναι στατιστικά σημαντική, υπάρχει μία πτωτική τάση. Για τον λόγο αυτό απαιτούνται περισσότερα πειράματα προκειμένου να εξασφαλισθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Καθώς η έλλειψη των *tia* γονιδίων έχει γενικά αρνητικές επιπτώσεις στην ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ, η αύξηση των επιπέδων τους μέσω διαγονιδιακής υπερέκφρασης θα μπορούσε να βελτιώσει την ικανότητα επιβίωσης μετά από θερμική καταπόνηση. Με σκοπό την διαπίστωση της ισχύος αυτής της υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που εκφράζουν διαγονιδιακά χιμαιρικές TIA πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GFP είτε σε αγρίου τύπου είτε σε μεταλλαγμένο για συνιστώσες των κοκκίων στρες υπόβαθρο.

Η υπερέκφραση των γονιδίων *tia1* ή *tia3* επιδρά θετικά στην ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ.



Γράφημα 3.10: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών μετά από θερμικό σοκ, οι οποίοι υπερεκφράζουν βασικές συνιστώσες των SGs σε σύντηξη με την GFP. Ως μάρτυρες χρησιμοποιούνται τα στελέχη c38, BRF229 και ειδικά για τα διαγονιδιακά στελέχη με *tia3* υπόβαθρο, το ιδανικό στέλεχος μάρτυρα είναι το BRF287.

Όπως απεικονίζεται στο παραπάνω διάγραμμα, η υπερέκφραση της TIA1 ενισχύει σε πολύ υψηλό βαθμό την ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες (τιμή $P < 0,0001$), όπως προκύπτει από την σύγκριση του ποσοστού επιβίωσης των στελεχών BRF229 (μάρτυρας) και του N2 Ex(*tia1::gfp*). Επιπλέον η αύξηση των επιπέδων της TIA1 ανατρέπει την ευαισθησία του μεταλλαγμένου για την *tia3* στελέχους (τιμή $P=0,26$, σύγκριση μεταξύ των στελεχών BRF287 και *tia3 Ex(tia1::gfp)*) καθώς το *tia3 Ex(tia1::gfp)* στέλεχος έχει ανθεκτικότητα ανάλογη με του μάρτυρα, αλλά χαμηλότερη από αυτή που προκύπτει από την έκφραση της TIA1 σε N2 (αγρίου τύπου) υπόβαθρο.

Παρόλο που η TIA2 είναι σημαντική στην απόκριση στο θερμικό στρες σε ενήλικους νηματώδεις αντίστοιχης ηλικίας, η ενίσχυση έκφρασής της σε αγρίου τύπου υπόβαθρο δεν φαίνεται να έχει επιδράσεις στην αντοχή σε αυτή τη μορφή στρες. Ωστόσο σε *tia1* μεταλλαγμένο υπόβαθρο προκαλεί μια μικρή αύξηση της ανθεκτικότητας (τιμή $P= 0,0165$,

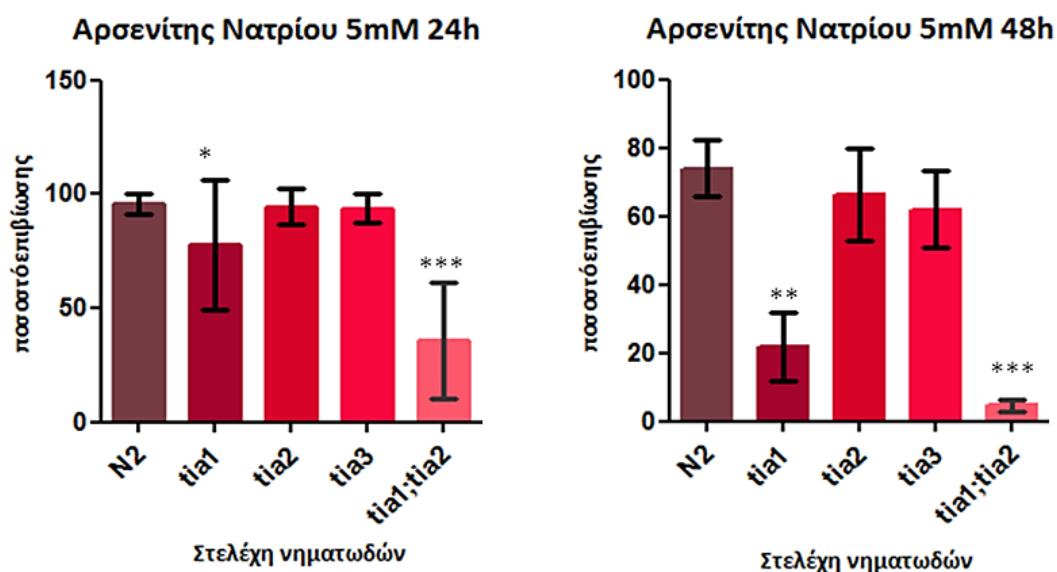
σύγκριση μεταξύ των στελεχών BRF229 και *tia1Ex (tia2::gfp)*). Εξάλλου, σε νεαρά ενήλικα η έλλειψη του *tia1* προκαλούσε μία ελάχιστη ανοδική τάση του ποσοστού επιβίωσης. (Γράφημα 3.7)

Επιπλέον, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα διαγονιδιακά για το *tia3* στελέχη εκφράζουν όντως λειτουργική πρωτεΐνη και σε ικανοποιητικά επίπεδα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανθεκτικότητας στην θερμική καταπόνηση σε στέλεχος στο οποίο εκφράζεται διαγονιδιακά η TIA3::GFP, απουσία του ενδογενούς *tia3* γονιδίου (*tia3 Ex(tia3::gfp)*), ώστε να εξακριβωθεί εάν η TIA3::GFP συμπληρώνει (rescues) τον *tia3* φαινότυπο.

Πράγματι, η διαγονιδιακή έκφραση της TIA3::GFP ενισχύει σε μεγάλο βαθμό την ανθεκτικότητα στην θερμική καταπόνηση ακόμη και απουσία ενδογενούς *tia3* γονιδίου. Συγκεκριμένα μετά από σύγκριση των στελεχών BRF229 και N2 *Ex(tia3::gfp)*, αποκαλύπτεται μία εξαιρετικής σημασίας αύξηση (τιμή $P < 0,0001$) της ικανότητας απόκρισης και ανάκαμψης μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία. Η διαγονιδιακή έκφρασή της σε *tia3* μεταλλαγμένο υπόβαθρο επιφέρει μίας μικρότερης βαρύτητας ενίσχυση της ανθεκτικότητας σε σχέση με το BRF229 στέλεχος, στο οποίο εκφράζεται η ενδογενής TIA3, ενώ σε σχέση με στέλεχος στο οποίο απουσιάζει το *tia3* γονίδιο (BRF287) η ανθεκτικότητα παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένη (τιμή $P=0,0009$). Η παρατηρούμενη βελτίωση της ικανότητας επιβίωσης μετά από θερμική καταπόνηση συνάδει με τα μειωμένα ποσοστά επιβίωσης των *tia3* μεταλλαγμένων νηματωδών ίδιας ηλικίας (πρώτη ημέρα ενηλικίωσης, Γράφημα 3.7).

3.2.2 Αντοχή στο προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου (sodium arsenite) οξειδωτικό στρες

Η έλλειψη του γονιδίου *tia1* έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ικανότητα επιβίωσης κατά το προκαλούμενο από αρσενίτη οξειδωτικό στρες.



Γράφημα 3.11: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών μετά από έκθεση σε 5mM αρσενίτη νατρίου επί 24 και 48 ώρες, οι οποίοι φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν βασικές συνιστώσες των SGs σε σχέση με τον άγριο τύπο.

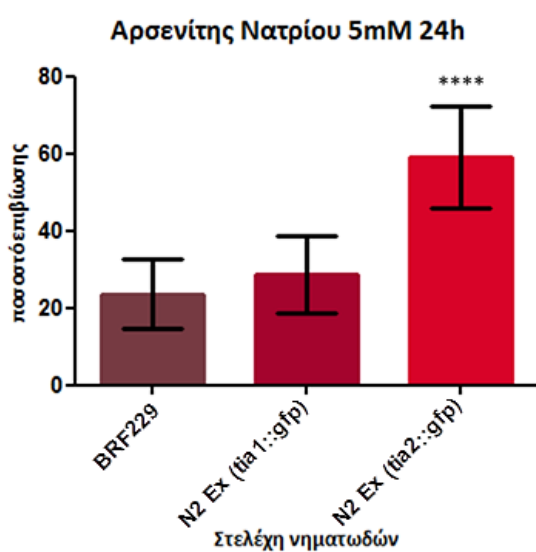
*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Η TIA1 είναι απαραίτητη για την απόκριση στο στρες που προκαλεί ο αρσενίτης του νατρίου, όπως απορρέει από τα μειωμένα ποσοστά επιβίωσης των στελεχών στα οποία απουσιάζει το *tia1* γονίδιο. Αντίθετα τα γονίδια *tia2* και *tia3* δεν φαίνεται να έχουν ιδιαίτερη σημασία καθώς η βιωσιμότητα των *tia2* και *tia3* μεταλλαγμένων νηματωδών είναι παρόμοια με αυτή των ζώων αγρίου τύπου. Ωστόσο η έλλειψη λειτουργικής TIA2 πρωτεΐνης επιδεινώνει τα αποτελέσματα της έλλειψης της TIA1. Η εικόνα που παρατηρείται στο προκαλούμενο από αρσενίτη στρες, είναι πολύ

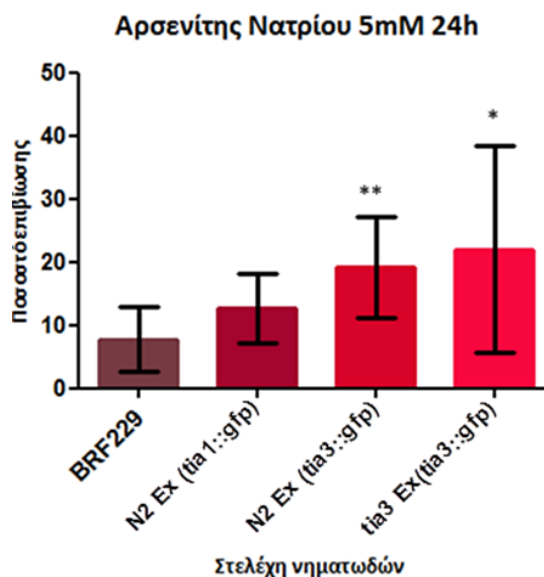
διαφορετική από αυτή που παρατηρείται μετά από θερμικό σοκ. Διαφαίνεται επομένως ότι οι καθεμία από τις TIA πρωτεΐνες συμμετέχει σε διαφορετικό βαθμό στην απόκριση σε διαφορετικές μορφές στρες.

Η υπερέκφραση της TIA2 αλλά και της TIA3 έχει θετικές επιδράσεις στην επιβίωση κατά την έκθεση σε αρσενίτη του νατρίου.

Οι *C.elegans* με roller φαινότυπο (δηλαδή όλα τα διαγονιδιακά και τα αντίστοιχα στελέχη μάρτυρες π.χ. BRF229), αποδείχθηκαν να είναι γενικά πιο ευαίσθητοι στον αρσενίτη του νατρίου και για τον λόγο αυτό οι μετρήσεις των ποσοστών επιβίωσης έλαβαν χώρα μόνο μετά από 24 ώρες.



Γράφημα 3.13: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών, μετά από έκθεση σε 5mM αρσενίτη νατρίου επί 24 ώρες, οι οποίοι υπερεκφράζουν την TIA1 ή τη TIA2 σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα BRF229. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό), ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).



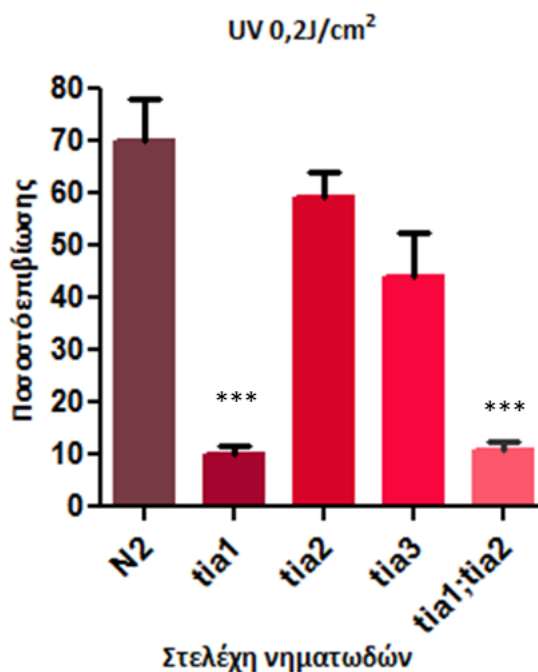
Γράφημα 3.13: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών μετά από έκθεση σε 5mM αρσενίτη νατρίου επί 24, οι οποίοι υπερεκφράζουν την TIA1 ή τη TIA3 σε αγρίου τύπου ή tia3 υπόβαθρο σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα BRF229. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό), ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Παρόλο που η έλλειψη της TIA2 ή της TIA3 δεν είχε επιπτώσεις στην ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες (Γράφημα 3.11), η υπερέκφραση μίας εκ των δύο βελτιώνει σε πολύ μεγάλο βαθμό την ικανότητα επιβίωσης των νηματωδών που εκτίθενται στην εν λόγω μορφή στρες (Γραφήματα 3.12 και 3.13).

3.2.3 Έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία

Οι δοκιμές ανθεκτικότητας στην UV ακτινοβολία για τα στελέχη που φέρουν μεταλλαγές σε συστατικά των κοκκίων στρες ή τα υπερεκφράζουν έγιναν με τον τρόπο που πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες δοκιμές στους μεταλλαγμένους για τις συνιστώσες των σωματίων P νηματώδεις.

Το γονίδιο *tia1* είναι σημαντικό για την απόκριση στην UV ακτινοβολία.

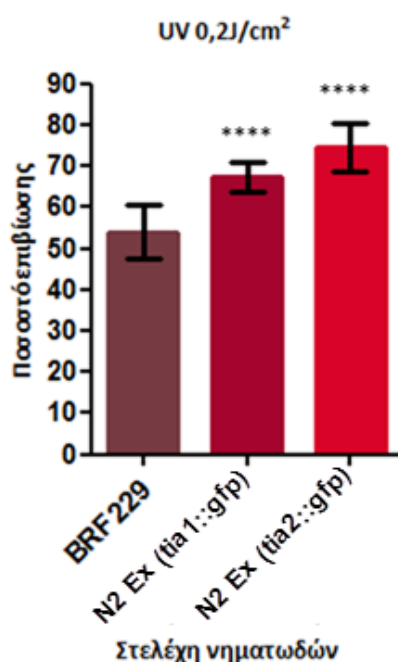


Γράφημα 3.14 Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών πέντε ημερών, μετά από έκθεση σε $0,2\text{J}/\text{cm}^2$ UV ακτινοβολίας, οι οποίοι φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια βασικών συνιστωσών των SGs σε σύγκριση με τον άγριο τύπο.

*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο γράφημα 3.14 φανερώνουν τις αρνητικές επιπτώσεις της έλλειψης της TIA1 στην ικανότητα ανάκαμψης των νηματωδών μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον η TIA1 είχε δείχθει να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο θερμικό σοκ σε ενήλικα αντίστοιχης ηλικίας (5 ημερών) (Γράφημα 3.8), καθώς και στο οξειδωτικό στρες σε νεαρά ενήλικα (Γράφημα 3.11). Αντίθετα, η απουσία του *tia2* ή του *tia3* γονιδίου δεν περιορίζει σημαντικά την ικανότητα επιβίωσης μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Το ίδιο συνέβαινε και κατά την έκθεση σε αρσενίτη (Γράφημα 3.11). Επιπλέον ούτε σε ενήλικα πέντε ημερών που υπέστησαν θερμικό σοκ, η έλλειψη της TIA2 ή της TIA3 είχε επίδραση στην βιωσιμότητα τους, ωστόσο σε νεαρά ενήλικα η TIA2 και η TIA3 ήταν απολύτως απαραίτητες για την επιβίωση μετά από έκθεση υψηλή θερμοκρασία.

Η υπερέκφραση της TIA1 ή της TIA2 αυξάνει την ανθεκτικότητα στην UV ακτινοβολία.



Γράφημα 3.15: Διάγραμμα επιβίωσης νηματωδών πέντε ημερών, μετά από έκθεση σε 0,21/cm² UV ακτινοβολίας οι οποίοι υπερεκφράζουν την TIA1 ή τη TIA2 σε σχέση με το στέλεχος μάρτυρα BRF229. *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό); ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Σε συνέπεια με τη σπουδαιότητά της για την απόκριση και ανάκαμψη μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, η υπερέκφραση της TIA1 προστατεύει τους νηματώδεις από τις αρνητικές επιδράσεις της εν λόγω ακτινοβολίας. Επιπροσθέτως, αν και η έλλειψη της TIA2 δεν είχε ιδιαίτερες επιπτώσεις στην επιβίωση νηματωδών που εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία, η αύξηση των επιπέδων αυξάνει σε εξαιρετικό βαθμό την ικανότητα απόκρισης σε αυτή τη μορφή στρες.

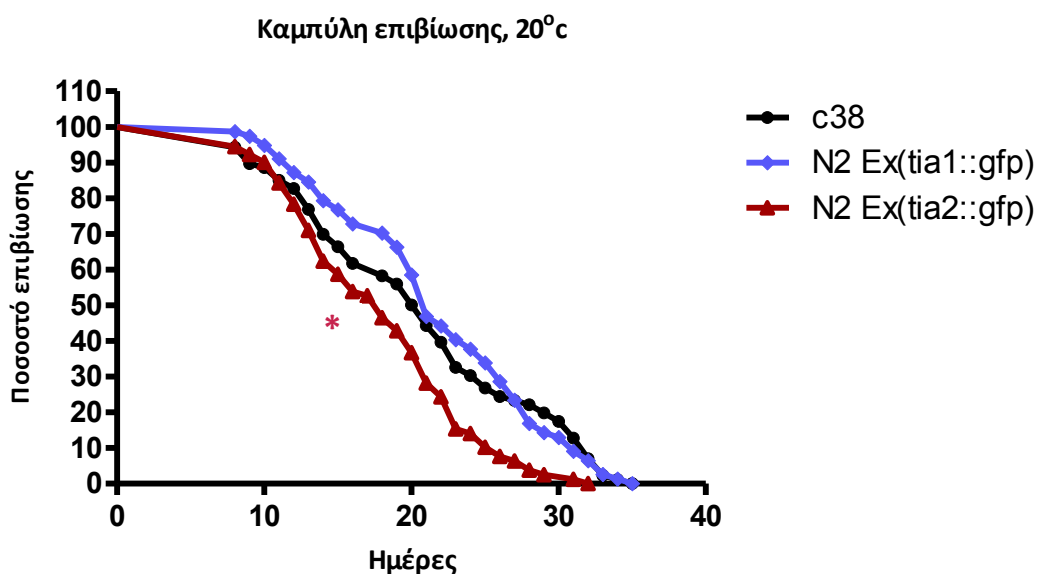
Η υπερέκφραση της TIA1 είχε προστατευτικό ρόλο και κατά το θερμικό σοκ (Γράφημα 3.10), ενώ της TIA2 κατά το προκαλούμενο από αρσενίτη οξειδωτικό στρες (Γράφημα 3.13).

3.2.4 Διάρκεια ζωής

Η αυξημένη ανθεκτικότητα σε διάφορες μορφές στρες, αν δεν σχετίζεται άμεσα, σε γενικές γραμμές ευνοεί την μακροζωία σε πολλά είδη οργανισμών. Καθώς η γήρανση μπορεί να θεωρηθεί ως μια χρόνια κατάσταση στρες, οι ισχυροί μηχανισμοί προσαρμογής απαιτούνται όχι μόνο για την άμεση επιβίωση κατά την έκθεση σε στρεσογόνες συνθήκες αλλά και για την επίτευξη της μακροζωίας. Τόσο κατά τη διάρκεια διαφόρων μορφών περιβαλλοντικού στρες όσο και κατά τη γήρανση διαταράσσεται η ομοιόσταση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την απώλεια της σταθερότητας ή και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Ένα δίκτυο γονιδίων το οποίο είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση της ακεραιότητας του πρωτεώματος συνδέει τους μηχανισμούς απόκρισης στο στρες με τη διάρκεια ζωής. Δείξαμε ότι η απώλεια λειτουργίας ή η υπερέκφραση βασικών συστατικών των SGs επηρεάζουν (η πρώτη αρνητικά ενώ η δεύτερη θετικά) την ικανότητα επιβίωσης των νηματωδών όταν υποβάλλονται σε διάφορες μορφές στρες. Για τους παραπάνω λόγους θεωρήθηκε ότι ο σχηματισμός και η λειτουργία των SGs ενδέχεται να επηρεάζει την διαδικασία της γήρανσης και κρίθηκε απαραίτητη η διεξαγωγή ανάλογων μελετών μακροζωίας.

Δεδομένα του εργαστηρίου μας δείχνουν ότι η απώλεια λειτουργίας των γονιδίων *tia1*, *tia2*, *tia3*, έχει αρνητική επίδραση στην διάρκεια ζωής των νηματωδών και σε συνδυασμό με τη μειωμένη ανθεκτικότητα των *tia* μεταλλαγμάτων, συμφωνεί με την σύνδεση μεταξύ ανθεκτικότητας στο στρες και μακροζωίας.

Με αυτή τη λογική, καθώς η υπερέκφραση των TIA πρωτεϊνών προσέδωσε ανθεκτικότητα σε διαφορετικές μορφές στρες, θα μπορούσε να προωθεί και τη μακροζωία. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μακροζωίας σε νηματώδεις που εκφράζουν διαγονιδιακά την TIA1::GFP ή την TIA2::GFP. Για την διεξαγωγή τους, περίπου 100 νηματώδεις L4 σταδίου ανάπτυξης από καθένα εκ των στελεχών c38 (μάρτυρας), N2 Ex TIA1::GFP και N2 Ex TIA2::GFP, οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί σε NGM/OP-50 τρυβλία στους 20°C, μεταφέρονταν σε νέα NGM/OP-50 τρυβλία και διατηρούνταν στην ίδια θερμοκρασία (ημέρα μηδέν). Τα ζώα μεταφέρονταν σε φρέσκα τρυβλία κάθε δύο ημέρες, ενώ γινόταν καθημερινή μέτρηση του ποσοστού επιβίωσης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Γράφημα 3.16: Καμπύλη επιβίωσης νηματωδών οι οποίοι υπερεκφράζουν την TIA1::GFP ή την TIA2::GFP σε σχέση με το c38 (στέλεχος μάρτυρας) στους 20°C. *: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

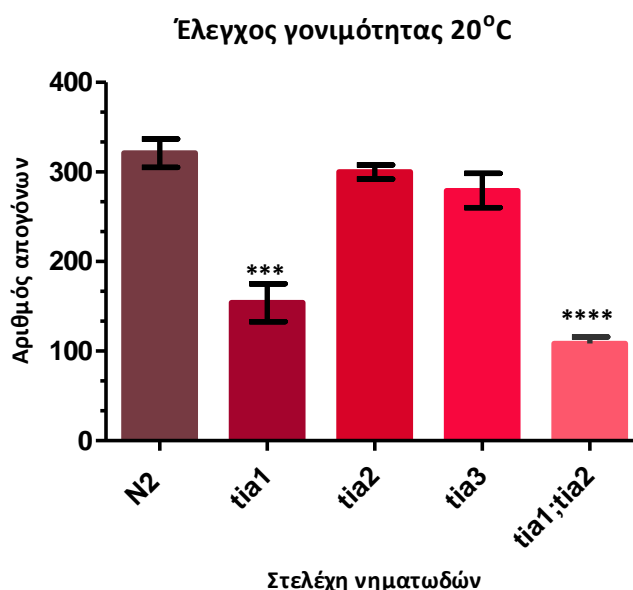
Η υπερέκφραση της TIA1 δεν επηρεάζει σημαντικά την διάρκεια ζωής του νηματώδους στους 20°C (Γράφημα 3.13). Μάλιστα η μέση διάρκεια ζωής τόσο του στελέχους-μάρτυρα c38 όσο και του στελέχους διαγονιδιακού για την TIA1 στελέχους ήταν 21 ημέρες. Απροσδόκητα, η υπερέκφραση της TIA2 σε μικρό βαθμό είχε αρνητικές επιπτώσεις στην μακροζωία, με την μέση διάρκεια ζωής του αντίστοιχου στελέχους να είναι 18 ημέρες.

Κατά συνέπεια, αν και οι πρωτεΐνες αυτές είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική διάρκεια ζωής, η αύξηση των επιπέδων τους δεν έχει θετικές επιδράσεις στην μακροβιότητα.

Ωστόσο, καθώς δεν έγιναν αρκετές επαναλήψεις του πειράματος, χρειάζονται περισσότερες ανάλογες δοκιμές για να καταλήξουμε σε ασφαλές συμπέρασμα.

3.2.5 Γονιμότητα

Η έλλειψη της TIA1 οδηγεί σε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας.



Γράφημα 3.17: Ικανότητα αναπαραγωγής νηματωδών που φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν βασικά συστατικά των SGs, σε σύγκριση με τον άγριο τύπο στους 20°C.

*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Όπως απεικονίζεται και στο παραπάνω διάγραμμα, η έλλειψη του *tia1* γονιδίου έχει πολύ σημαντικές συνέπειες στην ικανότητα αναπαραγωγής. Παρατηρήσαμε ότι τα μεταλλαγμένα για το *tia1* στελέχη γεννούσαν αρκετά αυγά τα οποία όμως δεν εκκολάπτονταν. Ακόμη, οι νηματώδεις που δεν διέθεταν TIA1 παρουσίαζαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη και προβλήματα στην κίνηση. Ο φαινότυπος αυτός ήταν ισχυρότερος στο διπλά μεταλλαγμένο για το *tia1* και *tia2* στέλεχος. Τα παραπάνω τονίζουν την σημασία των γονιδίων αυτών στην ανάπτυξη του *C.elegans*.

Σε γενικές γραμμές, τα συστατικά των SGs είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγική ικανότητα, την μακροζωία, την απόκριση και επιβίωση κατά το στρες και παρόλο που αύξηση των επιπέδων τους έχει προστατευτικό ρόλο στο στρες, δεν επηρεάζει θετικά την διάρκεια ζωής

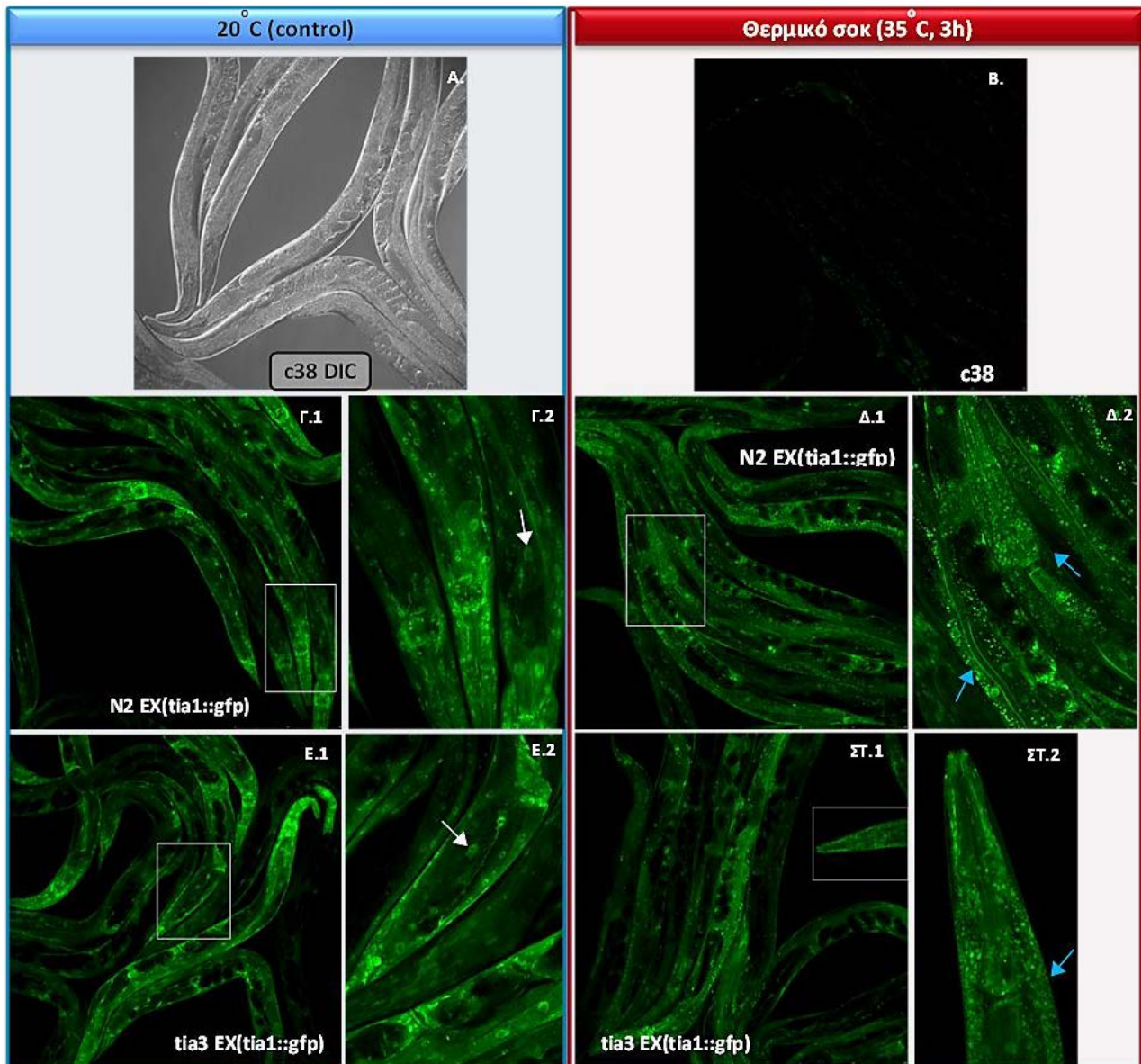
3.3 Πρότυπο έκφρασης των βασικών συνιστωσών των κοκκίων στρες TIA1 και TIA2

Προκειμένου να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *tia1* και να παρατηρήσουμε την κατανομή και τον σχηματισμό των κοκκίων στρες *in vivo* τόσο σε κανονικές συνθήκες όσο και υπό συνθήκες θερμικού στρες, χρησιμοποιήθηκε το διαγονιδιακό στέλεχος (N2Ex[TIA1::GFP]) που παράγει την TIA1 σε σύντηξη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη-μάρτυρα GFP, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της TIA έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι ο παρατηρούμενος φθορισμός αντικατοπτρίζει όσο περισσότερο δυνατόν την πραγματική έκφραση του γονιδίου της.

Επιπλέον προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι η παρατηρούμενη εικόνα δεν οφείλεται σε αυτοφθορισμό ορισμένων δομών, χρησιμοποιήσαμε διαγονιδιακό στέλεχος με N2 υπόβαθρο που φέρει ενσωματωμένο στο γονιδίωμά του ένα αντίγραφο του πλασμιδίου pRF4. Η φωτογραφίες (υπό κανονικές συνθήκες ή σε αυξημένη θερμοκρασία) του στελέχους αυτού λήφθηκαν μετά από αυτές των διαγονιδιακών για το *tia1::gfp* στελεχών, ώστε να καθοριστεί το κατώφλι (threshold). Καθώς η TIA1::GFP φθορίζει σε εξαιρετικά ικανοποιητικό βαθμό, το κατώφλι είναι υψηλό και ελάχιστο μέρος του παρατηρούμενου φθορισμού είναι αποτέλεσμα αυτοφθορισμού (Εικόνα 3.1 B).

Η προετοιμασία των δειγμάτων-μαρτύρων περιλάμβανε την αναισθητοποίηση των νηματώδων μίας ημέρας, οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί σε NGM OP-50 τρυβλία στους 20°C, Levamisole (το οποίο σε αντίθεση με το NaN₃ δεν προκαλεί στρες στους νηματώδεις) και την μεταφορά τους σε στρώμα αγαρόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Για το θερμικό σοκ, νηματώδεις ίδιας ηλικίας που είχαν αναπτυχθεί ταυτόχρονα και υπό ίδιες συνθήκες με τους μάρτυρες εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 35°C για το μη θανατηφόρο χρονικό διάστημα των τριών ωρών. Η παρασκευή και παρατήρηση των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά.



Εικόνα 3.1: Πρότυπο έκφρασης της TIA1. Φωτογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου (φωτεινό πεδίο/DIC ή φθορισμός) : **A.** Στέλεχος μάρτυρας c38 υπό κανονικές συνθήκες, DIC **B.** Στέλεχος μάρτυρας μετά από θερμικό σοκ διάρκειας τριών ωρών. **Γ. 1.** Διαγωνιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χμιαϊκή πρωτεΐνη TIA1::GFP σε N2 υπόβαθρο σε κανονικές συνθήκες. **Γ.2.** Μεγέθυνση της φωτογραφίας Γ1. **Δ.1.** Διαγωνιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χμιαϊκή πρωτεΐνη TIA1::GFP σε N2 υπόβαθρο μετά από θερμικό σοκ (35°C, 3h). **Δ.2.** Μεγέθυνση της φωτογραφίας Δ.1. **Ε.1.** Διαγωνιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χμιαϊκή πρωτεΐνη TIA1::GFP σε *tia3* μεταλλαγμένο υπόβαθρο σε κανονικές συνθήκες. **Ε.2.** Μεγέθυνση της φωτογραφίας Ε.1. **ΣΤ.1 .** Διαγωνιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χμιαϊκή πρωτεΐνη TIA1::GFP σε *tia3* μεταλλαγμένο υπόβαθρο μετά από θερμικό σοκ (35°C, 3h) . Τα λευκά βέλη δείχνουν πυρήνες, ενώ τα γαλάζια δείχνουν συσσωματώματα της TIA::GFP. Με γκρι πλαίσιο σημειώνεται η περιοχή η οποία εμφανίζεται δίπλα σε μεγαλύτερο μέγεθος.

Η TIA1 δείχνει να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ζώου και να εντοπίζεται κυρίως στους πυρήνες (Εικόνα 3.1 Γ) Σε συνθήκες θερμικού στρες (Εικόνα 3.1 Δ) παρατηρούμε μια αύξηση του φθορισμού της υπό μελέτη πρωτεΐνης σε σχέση με το μάρτυρα, η οποία εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικά κοκκία (Εικόνα 3.1 Γ), γεγονός που δείχνει ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες η TIA1::GFP δημιουργεί συσσωματώματα τα οποία μάλλον αντιστοιχούν με τα SGs. Επιπροσθέτως δεν είναι πλέον δυνατή η παρατήρηση πυρήνων. Επομένως κατά την θερμική καταπόνηση η TIA απεντοπίζεται από τους πυρήνες και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου σχηματίζει διακριτά κοκκία στρες.

Για να προσδιορίσουμε το ρόλο της TIA-3 στον σχηματισμό των συσσωματωμάτων της TIA1 υπό συνθήκες θερμικού στρες, δημιουργήσαμε διαγονιδιακά ζώα που φέρουν το διαγονίδιο *tia1::gfp* και παράλληλα είναι μεταλλαγμένα για το γονίδιο *tia3* (BRF262: *tia3*Ex [GFP::TIA1::3'UTR;pRF4]).

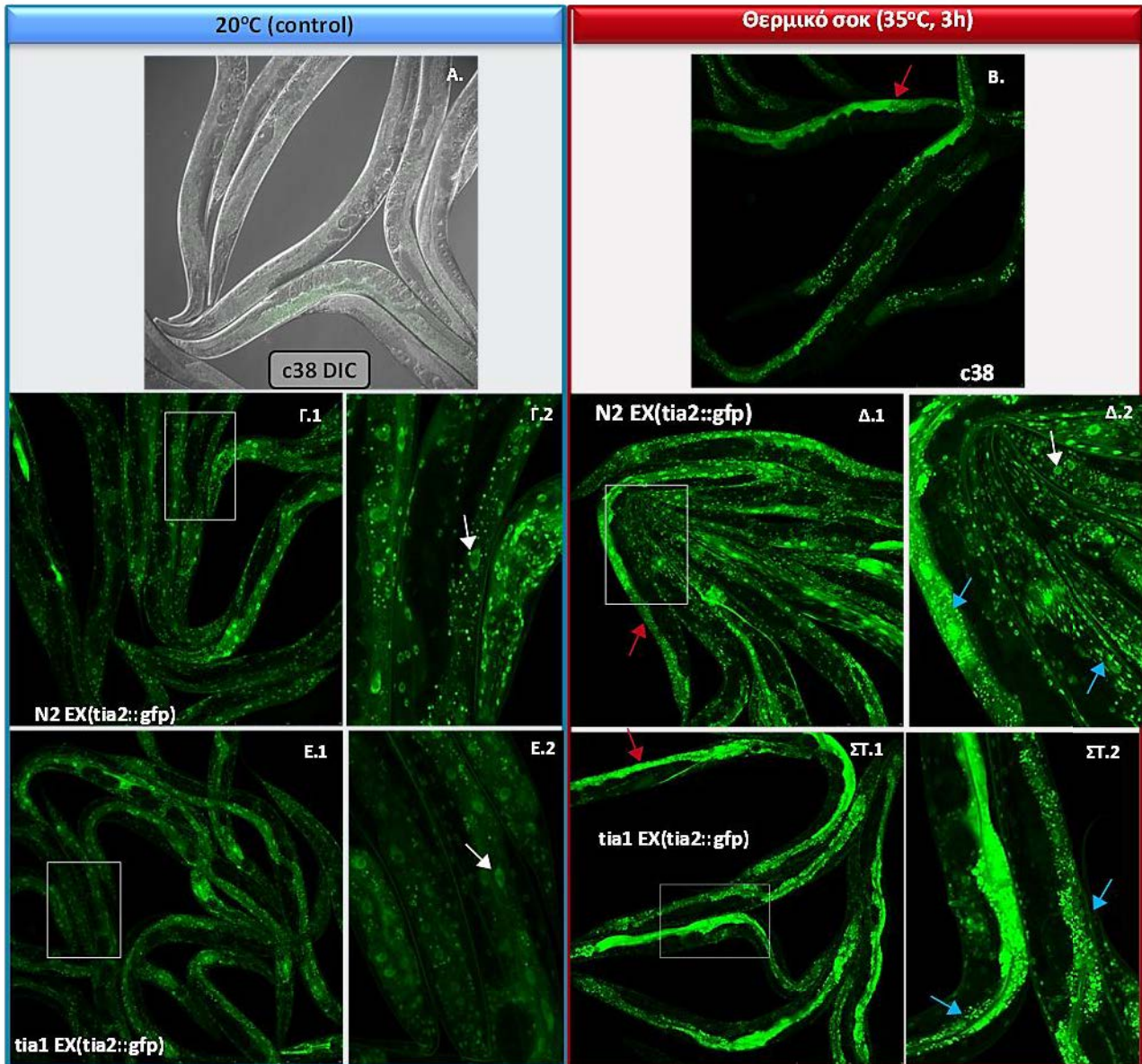
Τόσο σε κανονικές συνθήκες όσο μετά από θερμικό σοκ η έλλειψη του *tia3* δεν προκαλεί κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στο πρότυπο φθορισμού της TIA1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η TIA3 δεν επηρεάζει τον σχηματισμό TIA1 συσσωματωμάτων. Η TIA3 του νηματώδη σε αντίθεση με τις TIA1 και TIA2 στερείται επικράτειας PRD (prion related domain) η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία συσσωματωμάτων και πιθανώς να είναι αυτός ένας από τους λόγους που η απουσία της δεν διαταράσσει τον σχηματισμό εστιών της TIA1. Ωστόσο, το *tia3* γονίδιο είναι σημαντικό για την απόκριση στο θερμικό στρες, όπως προκύπτει από την μειωμένη ανθεκτικότητα των νεαρών νηματωδών που δεν διαθέτουν λειτουργικό *tia3* γονίδιο και την αυξημένη ανθεκτικότητα στο θερμικό στρες χάρις στην αύξηση των επιπέδων της TIA3.

Παράλληλα, με σκοπό την προσέγγιση του ρόλου της TIA2 στην δημιουργία των κοκκίων στρες μετά από έκθεση σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης *in vivo*, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη που εκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη TIA2::GFP, υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών στοιχείων της (BRF255: N2 Ex[PromTIA2::GFP::TIA2::3'UTR]).

Η προετοιμασία των δειγμάτων και ο καθορισμός του κατωφλιού του φθορισμού έγινε όπως και για τους διαγονιδιακούς για την TIA1::GFP νηματώδεις. Ωστόσο, τα επίπεδα φθορισμού της TIA2::GFP είναι σχετικά χαμηλά και για τον λόγο αυτό ένα μικρό ποσοστό του φθορισμού οφείλεται σε αυτοφθορισμό (Εικόνα 3.2 Β).

Στα παραπάνω διαγονιδιακά σκουλήκια (N2 Ex[*tia2::gfp*]) που βρίσκονται σε κανονικές συνθήκες (20°C), το ανασυνδυασμένο γονίδιο εκφράζεται σε κύτταρα, κυρίως στον πυρήνα, που ανήκουν σε διαφορετικούς ιστούς του ζώου (Εικόνα 3.2 Γ). Σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, υπάρχει μία αύξηση του φθορισμού της TIA2::GFP κυρίως στα εντερικά κύτταρα και ταυτόχρονα επάγεται η δημιουργία στικτών περιοχών, που υποδηλώνουν κοκκία στρες. Επιπλέον είναι δυνατή η παρατήρηση του εντοπισμένου φθορισμού και στους πυρήνες. Άρα, σε αντίθεση με την TIA1, η οποία γίνεται ως επί το πλείστον κυτταροπλασματική υπό αυτές τις συνθήκες, η TIA2 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στους πυρήνες. (Εικόνα 3.2 Δ).

Επιπλέον, με στόχο την διερεύνηση πιθανών επιδράσεων της TIA1 στο πρότυπο έκφρασης και την κατανομή της TIA2, δημιουργήσαμε διαγονιδιακά ζώα που φέρουν το διαγονίδιο *tia2::gfp* σε *tia1* μεταλλαγμένο υπόβαθρο (BRF263 *tia1*Ex [PromTIA2::GFP::TIA2::3'UTR]). Σε κανονικές συνθήκες το πρότυπο της TIA2::GFP δεν μεταβάλλεται αισθητά από την έλλειψη της TIA1, όμως υπό συνθήκες θερμικού στρες παρατηρείται εξαιρετική αύξηση της έντασης του φθορισμού στο έντερο και μείωσή του στους υπόλοιπους ιστούς του ζώου (Εικόνα 3.1 ΣΤ). Επομένως, υπό συνθήκες θερμικού στρες η TIA1 συνδέεται με την έκφραση ή/και τον σχηματισμό συσσωματωμάτων της TIA2 και συνάγεται ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν για τον σχηματισμό κοκκίων στρες.



Εικόνα 3.2: Πρότυπο έκφρασης της TIA2. Φωτογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου: **A.** Στέλεχος μάρτυρας c38 υπό κανονικές συνθήκες. DIC **B.** Στέλεχος μάρτυρας μετά από θερμικό σοκ διάρκειας τριών ωρών. **Γ. 1.** Διαγονιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χιμαιρική πρωτεΐνη TIA2::GFP σε N2 υπόβαθρο σε κανονικές συνθήκες. **Γ.2.** Μεγέθυνση της φωτογραφίας Γ.1. **Δ.1.** Διαγονιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χιμαιρική πρωτεΐνη TIA2::GFP σε N2 υπόβαθρο μετά από θερμικό σοκ (35°C, 3h). **Δ.2.** Μεγέθυνση της φωτογραφίας Δ.1. **Ε.1.** Διαγονιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χιμαιρική πρωτεΐνη TIA2::GFP σε tia1 μεταλλαγμένο υπόβαθρο σε κανονικές συνθήκες. **Ε.2.** Μεγέθυνση της φωτογραφίας Ε.1. **ΣΤ.1** . Διαγονιδιακό στέλεχος που εκφράζει την χιμαιρική πρωτεΐνη TIA2::GFP σε tia1 μεταλλαγμένο υπόβαθρο μετά από θερμικό σοκ (35°C, 3h) . Τα λευκά βέλη δείχνουν πυρήνες, ενώ τα γαλάζια δείχνουν συσσωματώματα της TIA2::GFP. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν το έντερο. Με γκρι πλαίσιο σημειώνεται η περιοχή η οποία εμφανίζεται δίπλα σε μεγαλύτερο μέγεθος.

Αξιοσημείωτα, όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.10, η έκφραση της TIA2::GFP σε tia1 μεταλλαγμένο υπόβαθρο προσδίδει αυξημένη ικανότητα επιβίωσης μετά από θερμική καταπόνηση ενώ σε N2 υπόβαθρο δεν ανάλογες επιδράσεις. Πιθανώς η αύξηση της συσσώρευσης της TIA2 στο έντερο μετά από θερμικό σοκ όταν απουσιάζει η TIA1 (Εικόνα 3.1 ΣΤ), να έχει θετική επίδραση στην απόκριση και ανάκαμψη μετά από έκθεση σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας. Σημειώνεται ότι το έντερο του *C. elegans* είναι μια κύρια περιοχή της απόκρισης σε στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες και στις τοξίνες για το συντονισμό του μεταβολισμού.

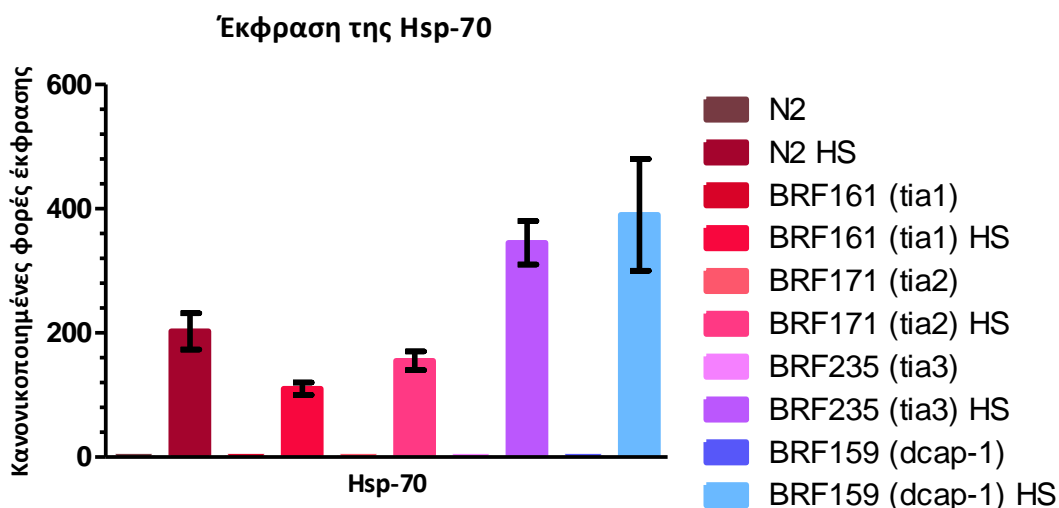
3.4 Επιδράσεις του θερμικού σοκ στην γονιδιακή έκφραση

Για τη μελέτη της απόκρισης στο θερμικό στρες, κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση των επιδράσεων του στη γονιδιακή έκφραση τόσο ορισμένων πρωτεϊνικών συνιστωσών των σωματίων P και των κοκκίων στρες, όσο και της έκφρασης της Hsp-70, ενός καθιερωμένου πρωτεϊνικού παράγοντα που επάγεται υπό στρεσογόνες συνθήκες για να αντιμετωπίσει την προκαλούμενη από το στρες μετουσίωση των άλλων πρωτεϊνών. Ακόμη εκτός από τους νηματώδεις αγρίου τύπου η έρευνα διευρύνθηκε και σε νηματώδεις μεταλλαγμένους για βασικές πρωτεϊνικές συνιστώσες των κοκκίων στρες, οι οποίες αποδείχθηκαν σημαντικές για την επιβίωση μετά από θερμικό στρες.

Για τους σκοπούς του πειράματος, απομονώθηκε RNA από νηματώδεις, που βρίσκονταν στην πρώτη ημέρα της ενηλικίωσης τους και ανεπτυγμένων σε NGM OP-50 τρυβλία στους 20°C, εκ των στελεχών αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων για το *tia1*, *tia2* ή *tia3*. Οι νηματώδεις συλλέχθηκαν είτε κατευθείαν από τους 20°C είτε αμέσως μετά από έκθεση διάρκειας 3 ωρών σε θερμοκρασία 35°C (συνθήκες μη θανατηφόρου θερμικού σοκ).

3.4.1 Το θερμικό σοκ επάγει την μεταγραφή της Hsp-70

Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (heat shock proteins, Hsps) είναι ένα ευρέως διαδεδομένο χαρακτηριστικό των κυττάρων και εμπλέκονται στην αναδίπλωση των άλλων πρωτεϊνών. Η έκφρασή τους αυξάνεται από την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες ή άλλη μορφή στρες και ως εκ τούτου αναφέρονται ως πρωτεΐνες στρες, του οποίου αποτελούν δείκτη¹¹⁵. Η δραματική αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι ένα βασικό μέρος της αντίδρασης στο θερμικό σοκ και επάγεται μεταγραφικά κυρίως από τον παράγοντα θερμικού σοκ (HSF)¹³⁹. Η οικογένεια των hsp70 πρωτεϊνών είναι παρούσα στα υποκυτταρικά διαμερίσματα και ο ρόλος τους είναι να συνδέονται με πρωτεΐνες-στόχους για να διαμεσολαβήσουν την αναδίπλωση τους, τη μεταφορά τους και την επιδιόρθωση τους. Υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, η σύνθεση της Hsp70 αυξάνεται για να προστατεύσει τα κύτταρα από την πρωτεωτοξικότητα. Εκτός από τη βελτίωση της ακεραιότητας του πρωτεώματος, η Hsp 70 αναστέλλει άμεσα την απόπτωση¹¹⁵.



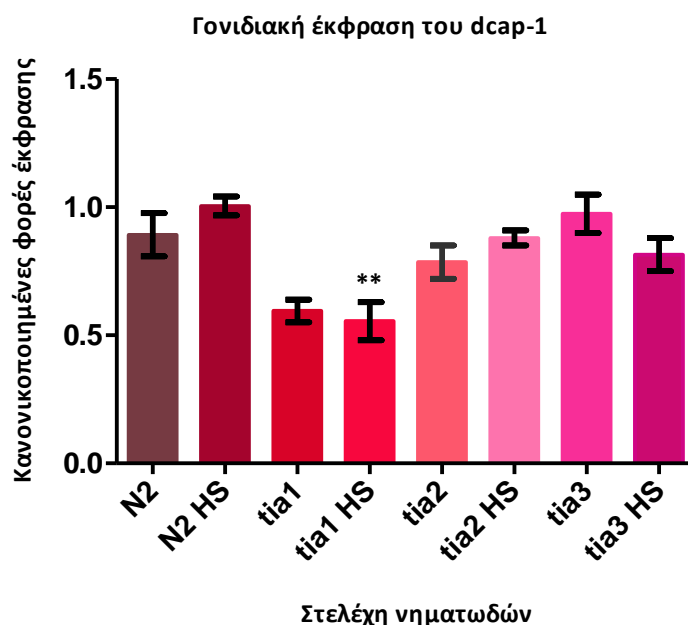
Γράφημα 3.18: Ποσοτικοποίηση του hsp-70 mRNA με RT-PCR σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγές για βασικές συνιστώσες των SGs ή των PBs ή αγρίου τύπου σε κανονικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ (HS).

Όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με τα παραπάνω, η έκφραση του γονιδίου της Hsp-70 επάγεται ραγδαία. Η αύξηση των επιπέδων του hsp-70 mRNA συμβαίνει σε όλα τα στελέχη όταν εκτεθούν σε θερμικό στρες, ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση του hsp70 γονιδίου είναι ελαχίστη.

3.4.2 Έκφραση των συστασών των SGs ή των PBs σε κανονικές συνθήκες και σε αυξημένη θερμοκρασία.

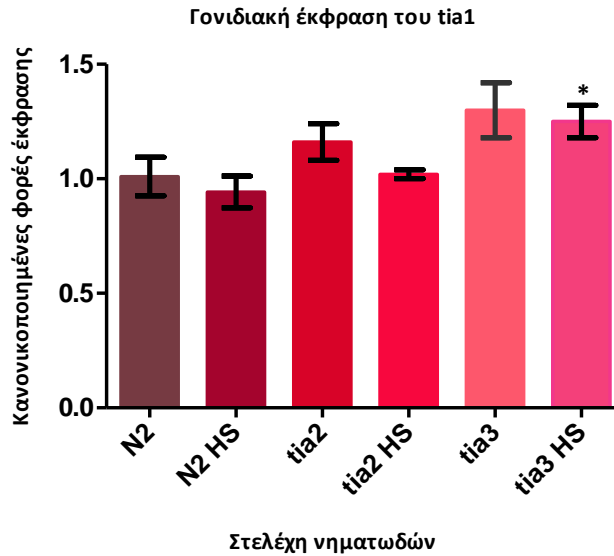
Δείξαμε ότι τα σωματίδια P και τα κοκκία στρες έχουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στη θερμική καταπόνηση, καθώς η απουσία σημαντικών συστασών τους έχει συνέπειες στην ικανότητα επιβίωσης μετά από διάφορες μορφές στρες, συμπεριλαμβανομένου του θερμικού. Κρίθηκε έτσι σκόπιμη η εξέταση των επιπέδων έκφρασης βασικών συστατικών των συγκεκριμένων ριβοπρωτεϊνικών σωματιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες (20°C) και μετά από έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία (35°C), τόσο σε νηματώδεις αγρίου τύπου όσο και σε μεταλλαγμένους για βασικές πρωτεϊνικές συστασές των κοκκίων στρες. Το τελευταίο θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης τους απουσία των άλλων σχετικών συστασών και σχετικά με τη μειωμένη ανθεκτικότητα ορισμένων μεταλλαγμάτων.

Συγκριμένα, ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *dcap-1*, δηλαδή του ενζύμου που εντοπίζεται στα PBs και είναι υπεύθυνο για την αφαίρεση της καλύπτρας των υπό διάσπαση mRNAs, καθώς και των *tia1*, *tia2* και *tia3* τα οποία κωδικοποιούν για σημαντικά πρωτεϊνικά συστατικά των SGs σε στελέχη μεταλλαγμένα για τα *tia1*, *tia2* ή *tia3* εκτός από νηματώδεις αγρίου τύπου.



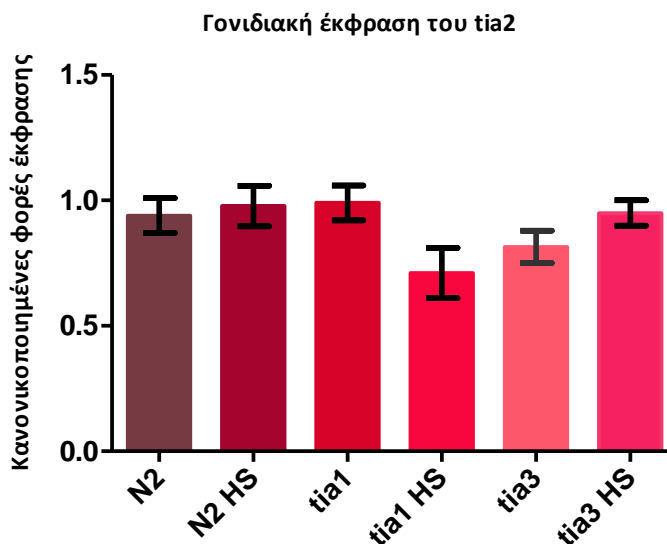
Γράφημα 3.19: Ποσοτικοποίηση του *dcap-1* mRNA, μέσω RT-PCR, σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγές για βασικές συστασές των SGs ή αγρίου τύπου κανονικές συνθήκες (20°C) και μετά από θερμικό σοκ τριών ωρών στους 35°C (HS). Ως μάρτυρας υπό κανονικές συνθήκες χρησιμοποιείται το στέλεχος αγρίου τύπου (N2), ενώ υπό συνθήκες στρες το στέλεχος αγρίου τύπου που υπέστη θερμικό σοκ (N2 HS).
*: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Η έκφραση του *dcap-1* δεν παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ φυσιολογικών συνθηκών και θερμικού στρες σε κανένα από τα στελέχη. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα PBs επάγονται μετά από θερμικό σοκ στον *C.elegans*¹²⁵. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής Real Time PCR που φαίνονται στο Γράφημα 3.20 δείχνουν ότι η επαγωγή της δημιουργίας αυτών των δομών δεν οφείλεται σε μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου *dcap-1*, αλλά σε συσσώρευση της πρωτεΐνης του. Επιπλέον, απουσία της TIA1, η έκφραση του *dcap-1* μειώνεται σημαντικά, ιδίως στο θερμικό στρες (Γράφημα 3.20). Καθώς τα κοκκία της DCAP-1 (PBs) και τα κοκκία της TIA1 (SGs) συνεντοπίζονται στον *C.elegans* και αλληλεπιδρούν στενά¹²⁵, η μείωση της έκφρασης του *dcap-1* όταν δεν υπάρχει λειτουργική TIA1 πιθανώς να είναι μηχανισμός ρύθμισης και αντιστάθμιση της δημιουργίας κοκκίων στρες και σωματίων P.



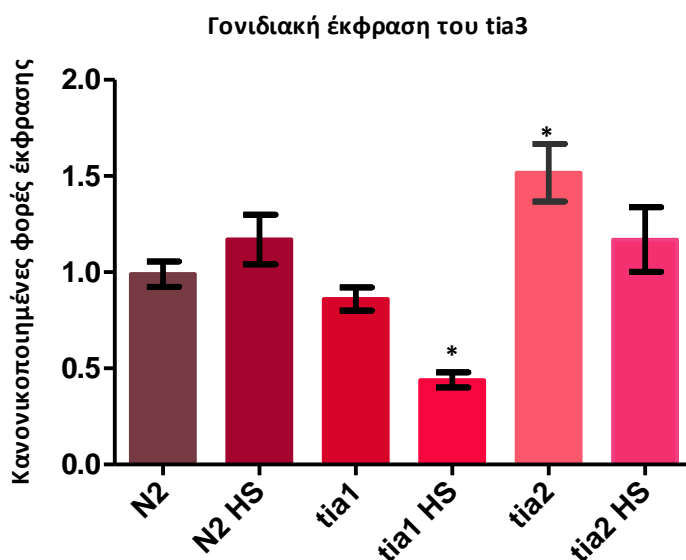
Γράφημα 3.20: Ποσοτικοποίηση του *tia1* mRNA, μέσω RT-PCR, σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγές για βασικές συνιστώσες των SGs ή αγρίου τύπου κανονικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ τριών ωρών στους 35°C (HS). Ως μάρτυρας υπό κανονικές συνθήκες χρησιμοποιείται το στέλεχος αγρίου τύπου (N2), ενώ υπό συνθήκες στρες το στέλεχος αγρίου τύπου που έχει υποστεί θερμικό σοκ (N2 HS). *: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Επιπλέον τα επίπεδα του *tia1* mRNA δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση από το θερμικό σοκ ή από την έλλειψη των άλλων TIA πρωτεϊνών (Γράφημα 3.20). Επομένως, όπως και στην περίπτωση της DCAP-1 και της δημιουργίας σωματίων P, η δημιουργία κοκκίων της TIA1, άρα και κοκκίων στρες, υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης είναι ανεξάρτητη της μεταγραφής και οφείλεται στην δημιουργία συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης αυτής. Όπως είδαμε, η TIA1 υπό κανονικές εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ζώου και εντοπίζεται περισσότερο στους πυρήνες, ενώ μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου και σχηματίζει κοκκία (Εικόνα 3.1. Γ και Δ). Επιπροσθέτως η έλλειψη του *tia3* προκαλεί ελαφρώς την αύξηση της έκφρασης του *tia1* υπό συνθήκες στρες (Γράφημα 3.20) με το σχηματισμό κοκκίων της TIA1 να παραμένει ανεπηρέαστος (Εικόνα 3.1. ΣΤ).



Γράφημα 3.21: Ποσοτικοποίηση του *tia2* mRNA, μέσω RT-PCR, σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγές για βασικές συνιστώσες των SGs ή αγρίου τύπου κανονικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ διάρκειας τριών ωρών στους 35°C (HS). Ως μάρτυρας υπό κανονικές συνθήκες χρησιμοποιείται το στέλεχος αγρίου τύπου (N2), ενώ υπό συνθήκες στρες το στέλεχος αγρίου τύπου που υπέστη θερμικό σοκ (N2 HS). *: $P < 0.05$ (σημαντικό), **: $P < 0.01$ (πολύ σημαντικό); ***: $P < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό).

Όπως απεικονίζεται στο Γράφημα 3.21, η έκφραση του *tia2* γονιδίου δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές μετά από θερμικό σοκ ή μεταξύ των στελεχών αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων για τα *tia1* ή *tia3* γονίδια. Σε σύγκριση με το πρότυπο έκφρασης της TIA2 (Εικόνα 3.2) και αν λάβουμε υπόψη μας ότι τα *tia1* και *tia2* γονίδια δεν επάγονται μεταγραφικά εξαιτίας της θερμικής καταπόνησης, γίνεται φανερό ότι ο σχηματισμός των κοκκίων στρες δεν εξαρτάται από την μεταγραφική επαγωγή αυτών των βασικών συστασών του αλλά από την συσσώρευση των υπάρχουσων πρωτεϊνών TIA1 και TIA2.



Γράφημα 3.22: Ποσοτικοποίηση του *tia3* mRNA, μέσω RT-PCR, σε στελέχη που φέρουν μεταλλαγές για βασικές συστασές των SGs ή αγρίου τύπου κανονικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ τριών ωρών στους 35°C (HS). Ως μάρτυρας υπό κανονικές συνθήκες χρησιμοποιείται το στέλεχος αγρίου τύπου (N2), ενώ υπό συνθήκες στρες το στέλεχος αγρίου τύπου που υπέστη θερμικό σοκ (N2 HS). *: P < 0.05 (σημαντικό), **: P < 0.01 (πολύ σημαντικό); ***: P < 0.001 (εξαιρετικά σημαντικό).

Σε αντίθεση, η έκφραση του *tia3* διαφοροποιείται αρκετά μεταξύ των στελεχών στις διάφορες συνθήκες (Γράφημα 3.22). Συγκεκριμένα η έκφραση του *tia3* παρουσιάζει μείωση στους νηματώδεις που δεν διαθέτουν λειτουργικό *tia1* γονίδιο μετά από έκθεση σε θερμικό σοκ τόσο σε σχέση με τον άγριο τύπο υπό τις ίδιες συνθήκες. Ίσως αυτό να αποτελεί μία εξήγηση για το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα του *tia1* στελέχους στο θερμικό στρες επηρεάζεται λιγότερο σε σχέση με του αγρίου τύπου από την σίγηση του *tia3* μέσω RNAi (Γράφημα 3.9). Σημαντική μείωση επίσης της έκφρασης του *tia3* παρατηρείται στο μεταλλαγμένο για το *tia1* στέλεχος όταν υποστεί θερμικό σοκ. Επιπλέον, αν και τα επίπεδα του *tia3* mRNA είναι αυξημένα όταν απουσιάζει το *tia2* σε κανονικές συνθήκες (20°C), μετά την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία πέφτει σε επίπεδα ίδια με του αγρίου τύπου υπό τις ίδιες συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Αντίθετα στους νηματώδεις αγρίου τύπου η έκφραση του *tia3* δεν μεταβάλλεται από το θερμικό σοκ.

4 Συμπεράσματα και συζήτηση

Η γήρανση σε συνδυασμό με την απόκριση στο στρες, μπορεί να θεωρηθεί ως μία δυναμική κατάσταση, η οποία είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων διατηρείται η ακεραιότητα και η ομοιότητα όλων των βιολογικών διεργασιών. Η μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης έχει δείχθει ότι οδηγεί σε εκτεταμένη διάρκεια ζωής. Παράλληλα σε απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες (π.χ. θερμικό και οξειδωτικό στρες), τα ευκαρυωτικά κύτταρα μειώνουν την πρωτεϊνοσύνθεση εξοικονομώντας αναβολική ενέργεια για την επιδιόρθωση των προκαλούμενων από το στρες βλαβών. Ένας σημαντικός στόχος του στρες σε κυτταρικό επίπεδο είναι το πρωτέωμα: τόσο κατά τη διάρκεια διαφόρων στρεσογόνων συνθηκών όσο και κατά τη γήρανση διαταράσσεται η ομοιότητα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απώλεια της σταθερότητας ή και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Η ακεραιότητα του πρωτεώματος ρυθμίζεται από ένα δίκτυο γονιδίων το οποίο συνδέει τους μηχανισμούς απόκρισης στο στρες με τη διάρκεια ζωής⁹⁷.

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να διερευνήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που συνδέουν τη διάρκεια ζωής με το ρυθμό σύνθεσης πρωτεϊνών καθώς και τη σχέση τους με την απόκριση στο στρες, εστιαστήκαμε στη μελέτη παραγόντων και διεργασιών που επηρεάζουν την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο του μεταβολισμού του mRNA. Ορισμένα κυτταροπλασματικά σωματίδια mRNP, τα κοκκία στρες και τα σωματίδια P, έχει αποδειχθεί ότι έχουν καθοριστική σημασία στη ρύθμιση του μεταβολισμού του mRNA στους ευκαρυώτες. Συγκεκριμένα, τα σωματίδια P εμπλέκονται στην αποθήκευση, στη σίγηση και στην διάσπαση των mRNAs και τα κοκκία στρες στον επαναπρογραμματισμό της μετάφρασης, μέσω της επιλεκτικής σίγησης ορισμένων μεταγράφων, κατά την διάρκεια του στρες, ενώ υπάρχουν αποδείξεις ότι οι δομές αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τον συντονισμό του μεταβολισμού mRNA. Χρησιμοποιώντας ως οργανισμό-μοντέλο το νηματώδη *C. elegans*, ένα καθιερωμένο και πανίσχυρο σύστημα για βιολογικές μελέτες, λόγω της πληθώρας των πλεονεκτημάτων του, κατορθώσαμε να διαλευκάνουμε κάποιες από τις παραμέτρους που διέπουν τους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο του μεταβολισμού του mRNA μέσω της αξιολόγησης του ρόλου του στην απόκριση στο στρες, στην διάρκεια ζωής και σε ορισμένες πτυχές της φυσιολογίας του συγκεκριμένου οργανισμού. Στον *C. elegans* ο μεταβολισμός του mRNA είχε μελετηθεί κυρίως κατά τα στάδια της ωογένεσης και της εμβρυογένεσης και ελάχιστα στη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ ο ρόλος του κατά την απόκριση στο στρες και τη διαδικασία της γήρανσης ήταν επίσης ελάχιστα κατανοητός.

Μια πρώτη προσέγγιση του ρόλου των σωματιών P και των κοκκίων στρες πραγματοποιήθηκε μέσω μελέτης της επίδρασης των άμεσων μεταβολών ορισμένων σημαντικών συστατικών τους στην ικανότητα επιβίωσης του *C. elegans* σε αντίξοες συνθήκες. Ο σχηματισμός σωματιών P έχει δείχθει ότι επάγεται στον *C. elegans* από την αύξηση της θερμοκρασίας και της ηλικίας (¹²⁵, δεδομένα του εργαστηρίου μας), καθώς και από διαταραχές διαδικασιών που ποικίλουν από την πρωτεϊνοσύνθεση ως την συντήρηση των μιτοχονδρίων¹²⁵. Ακόμη ότι τα επίπεδα του *dcap-1* mRNA δεν επηρεάζονται από την αύξηση της θερμοκρασίας, προτείνοντας ότι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων της DCAP-1 που είχε παρατηρηθεί δεν εξαρτάται από μεταγραφική επαγωγή των γονιδίων αλλά από συσώρευση της πρωτεΐνης του. Αρχικά, εκθέτοντας στελέχη νηματωδών από τα οποία απουσίαζαν οι λειτουργίες αφαίρεσης της καλύπτρας που διαμεσολαβούνται από τα ένζυμα DCAP-1 και DCAP-2 στα σωματίδια P (ομόλογα των Dcp1 και Dcp2 του ανθρώπου) σε συνθήκες θερμικού σοκ, οξειδωτικού στρες και σε υπεριώδη ακτινοβολία, δείξαμε ότι και οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την απόκριση σε όλες τις μορφές στρες που δοκιμάστηκαν. Μία εξαίρεση αποτελεί η ανεπηρέαστη από την έλλειψη του γονιδίου *dcap-1* ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ των ενήλικων που βρίσκονταν στην πέμπτη ημέρα της ενηλικίωσής τους, παρά την ευαισθησία που επέδειξαν σε μικρότερη ηλικία (πρώτη ημέρα ενηλικίωσης). Το τελευταίο πιθανώς να αντανάκλα τις ηλικιοεξαρτώμενες μεταβολές του σχηματισμού των σωματιών P.

Επιπλέον η *dcap-1* και περισσότερο η *dcap-2* είναι απαραίτητες για την φυσιολογική ανάπτυξη των νηματωδών, καθώς η έλλειψή τους προξενεί και καθυστέρηση στην ανάπτυξη και έχει και δυσμενείς επιπτώσεις στην γονιμότητα και στην ικανότητα κίνησης.

Η μείωση των επιπέδων της πρωτεϊνοσύνθεσης στο μεταλλαγμένο για το *dcap-1* στέλεχος εξαιτίας της έλλειψης του γονιδίου *ife-2*, το οποίο κωδικοποιεί ένα κομβικό παράγοντα στην έναρξη της μετάφρασης και αποτελεί μια από τις πέντε ισομορφές του eIF4E, αυξάνει την ικανότητα απόκρισης και ανάκαμψης των νηματωδών μετά από θερμικό σοκ και κυρίως όταν η θερμοκρασία ανάπτυξης τους ήταν οι 25°C, όπου οι συνέπειες της έλλειψης του *ife-2* ή του *dcap-1* είναι ισχυρότερες. Υποδεικνύεται κατά τον τρόπο αυτό ότι αν και τα ελαττώματα σε μία από τις διεργασίες έναρξης ή διάσπασης έχουν αρνητικές συνέπειες, ο συνδυασμός τους σε έναν οργανισμό δύναται να έχει θετικές επιδράσεις. Η απώλεια του *ife-2* οδηγεί σε αυξημένο σχηματισμό σωματίων P και στη συσσώρευση μη-μεταφραζόμενων mRNAs λόγω καταστολής της έναρξης της μετάφρασης, ενώ παράλληλα ο IFE-2 έχει δειχθεί ότι συσσωρεύεται σε δομές ανάλογες των PBs στον *C.elegans* μετά από θερμικό σοκ. Επιπλέον σε κύτταρα θηλαστικών έχει δειχθεί ότι ο eIF4E επηρεάζει την επιδεκτικότητα των μεταγράφων σε αποικοδόμηση¹⁰⁶. Οι πρωτεΐνες DCAP-1 και IFE-2 συμμετέχουν σε δύο ανταγωνιζόμενες διαδικασίες, στην διάσπαση των mRNAs και στην έναρξη της μετάφρασης αντίστοιχα. Το τελευταίο σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις θα μπορούσε να σημαίνει ότι ελαττώματα και στις δύο αυτές διεργασίες οδηγούν σε μία εξισορρόπηση του μεταβολισμού του mRNA που έχει θετικές επιδράσεις στην ανάκαμψη μετά από θερμικό σοκ (αλλά όχι από οξειδωτικό στρες). Παρόλα αυτά η θετική αυτή επίδραση περιορίζεται στην ανθεκτικότητα στην θερμική καταπόνηση, καθώς δεν επηρεάζεται σημαντικά η ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου για την *dcap-1* και *ife-2* στο οξειδωτικό στρες ή η γονιμότητά του στους 25°C.

Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι ο μεταβολισμός του mRNA στα σωματίνα P είναι απαραίτητος για την ανάκτηση της ομοιόστασης του οργανισμού υπό συνθήκες στρες καθώς και για να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις της αναπτυξιακής διαδικασίας.

Η μελέτη της σημασίας της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από τον σχηματισμό κοκκίων στρες για την επιβίωση των *C.elegans* μετά από συνθήκες θερμικού και οξειδωτικού στρες καθώς και μετά την έκθεση σε UV ακτινοβολία, επιτεύχθηκε μέσω μεταλλαγμένων στελεχών νηματωδών για τις βασικές συνιστώσες των SGs (*tia1*, *tia2* και *tia3*), καθώς και διαγονιδιακών νηματωδών που υπερεκφράζουν τα προαναφερθέντα γονίδια σε αγρίου τύπου ή σε μεταλλαγμένο υπόβαθρο. Η έλλειψη των γονιδίων αυτών έχει αρνητικές επιπτώσεις στη μακροζωία, ενώ η έλλειψη της TIA1 προκαλεί διαταραχές στην ανάπτυξη συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησής της και της μειωμένης ικανότητας αναπαραγωγής. Ο *tia1* μεταλλαγμένος φαινότυπος επιδεινώνεται από την ταυτόχρονη έλλειψη του *tia2*. Επιπλέον το *tia1* και περισσότερο το *tia1;tia2* διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσιάζουν προβλήματα στην κίνηση. Δυσμενείς συνέπειες στην ανάπτυξη παρατηρούνται και στα θηλαστικά, όπου η στοχευμένη αδρανοποίηση της TIA-1 ή της TIAR έχει ως αποτέλεσμα την μερική εμβρυική θνησιμότητα^{13,109}. Επομένως, οι TIA πρωτεΐνες είναι σημαντικές για την αναπτυξιακή διαδικασία σπονδυλωτών και ασπόνδυλων οργανισμών.

Τα κοκκία στρες είναι απαραίτητα για τον επαναπρογραμματισμό της μετάφρασης προκειμένου οι νηματώδεις να αντιμετωπίσουν τις στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες, ωστόσο οι διαφορετικές TIA πρωτεΐνες συμμετέχουν σε διαφορετικό βαθμό στην απόκριση σε κάθε μορφή στρες και με τρόπο εξαρτώμενο από την ηλικία στην περίπτωση της θερμικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, η TIA1 είναι σημαντική για την απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία και στο οξειδωτικό στρες, ενώ στο θερμικό σοκ είναι σημαντική για την επιβίωση μόνο στα μεγαλύτερης ηλικίας ενήλικα. Το τελευταίο μάλλον δεν εξαρτάται από την έκφραση των άλλων *tia* γονιδίων. Η TIA2 και η TIA3 από την άλλη πλευρά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην απόκριση στην αυξημένη θερμοκρασία μόνο στα νεαρά ενήλικα. Η υπερέκφραση της TIA1 προσδίδει ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ και στην ακτινοβολία με UV, ενώ της TIA2 ενισχύει την ικανότητα επιβίωσης υπό το προκαλούμενο από αρσενίτη του νατρίου οξειδωτικό στρες και στην UV ακτινοβολία. Η αύξηση των επιπέδων της TIA3 έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην απόκριση και ανάκαμψη μετά από θερμική καταπόνηση ή οξειδωτικό στρες (η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία δεν δοκιμάστηκε). Όπως προκύπτει η υπερέκφραση της TIA πρωτεΐνης που φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο σε μία μορφή στρες, μπορεί να μην έχει θετικές επιδράσεις στην

ανθεκτικότητα των νηματωδών, ενώ η υπερέκφραση μίας άλλης της οποίας η έλλειψη δεν είχε αρνητικές επιπτώσεις να αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης.

Παρόλες τις ευεργετικές επιδράσεις της αύξησης των επιπέδων της TIA1 ή της TIA2 στην ικανότητα ανάκτησης της ομοιόστασης μετά από διάφορες μορφές περιβαλλοντικού στρες, δεν παρατηρούνται θετικές επιδράσεις στην μακροζωία. Αντίθετα, η υπερέκφραση της TIA2 προκαλεί μικρή μείωση της μέσης και μέγιστης διάρκειας ζωής των νηματωδών. Ωστόσο, επειδή λόγω του περιορισμένου χρόνου δεν έγιναν αρκετές επαναλήψεις του πειράματος, χρειάζονται περισσότερες σχετικές αναλύσεις της διάρκειας ζωής, προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι παρατηρούμενες επιδράσεις.

Η χρησιμοποίηση νηματωδών που εκφράζουν διαγονιδιακά τους δείκτες των κοκκίων στρες TIA1 και TIA2 σε σύντηξη με την GFP μας επέτρεψε να παρατηρήσουμε τον σχηματισμό κοκκίων στρες *in vivo* σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού. Δείξαμε ότι στον *C.elegans* η TIA1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ζώου και σχηματίζει συσσωματώματα μετά από έκθεση σε θερμικό στρες, όπως συμβαίνει και με την TIA-1 σε κύτταρα θηλαστικών^{72,93}. Η αύξηση της δημιουργίας συσσωματωμάτων δεν οφείλεται στην επαγωγή του *tia1* γονιδίου, αλλά στην συσσώρευση της πρωτεΐνης του. Ο σχηματισμός των κοκκίων που περιέχουν TIA1 σε απόκριση στη θερμική καταπόνηση συνοδεύεται από την μετακίνηση της πρωτεΐνης αυτής από τον πυρήνα, όπου εντοπιζόταν κατά μεγαλύτερο βαθμό, στο κυτταρόπλασμα όπου συμμετέχει στον σχηματισμό των κοκκίων στρες. Μία ανάλογη δυναμική μετακίνηση της TIA-1 και της TIAR έχει παρατηρηθεί και στα κύτταρα των θηλαστικών^{72,93}. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η TIA1 έχουν συντηρημένα στοιχεία στον τρόπο δράσης τους στον *C.elegans* και τα θηλαστικά.

Επιπλέον, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων της TIA1 δεν επηρεάζεται από την έλλειψη της TIA3, παρά την σημασία της για την επιβίωση μετά από θερμικό σοκ. Παράλληλα η TIA3 δεν έχει επικράτεια PRD, η οποία μάλλον είναι υπεύθυνη για την δημιουργία των συσσωματωμάτων της TIA1 και της TIA2, όπως υποδεικνύουν μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών, όπου η PRD της TIA-1 είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό κοκκίων αυτής⁴³. Η έλλειψη του *tia3* όμως επάγει ελαφρώς την έκφραση του *tia1*, κυρίως μετά από θερμικό σοκ, ενώ η έλλειψη του *tia1* μειώνει τα επίπεδα του *tia3* mRNA σε απόκριση στην υψηλή θερμοκρασία. Αντίθετα, η έλλειψη του *tia2* αυξάνει την έκφραση του *tia3*, μόνο όμως υπό κανονικές συνθήκες. Σε συνδυασμό από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι υπάρχουν περίπλοκοι μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης των *tia* γονιδίων, στους οποίους συμμετέχουν έμμεσα ή άμεσα τα άλλα γονίδια της ίδιας ομάδας. Παρόμοιοι βρόχοι αυτορρύθμισης μεταξύ των TIA-1 και TIAR έχουν παρατηρηθεί και σε κύτταρα θηλαστικών (για παράδειγμα η μετάφραση της TIA-1 καταστέλλεται από την TIAR)^{28,43,110}.

Όπως συμβαίνει και με την TIA1, υπό κανονικές συνθήκες η TIA2 εκφράζεται κυρίως στους πυρήνες σε ολόκληρο το σώμα του ζώου και σχηματίζει συσσωματώματα σε απόκριση στο θερμικό στρες ανεξάρτητα της μεταγραφής, ωστόσο το πρότυπο έκφρασής της μετά από την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία διαφέρει σε ορισμένες πτυχές από αυτό της TIA1. Συγκεκριμένα, η TIA2, σε αντίθεση με την TIA1, η οποία γίνεται ως επί το πλείστον κυτταροπλασματική υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης, εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όπου σχηματίζει κοκκία, όσο και στους πυρήνες, ενώ υπάρχει και μία εντοπισμένη αύξηση του φθορισμού της στο έντερο του οργανισμού. Ο φθορισμός και η δημιουργία συσσωματωμάτων στην περιοχή του εντέρου εντείνεται ακόμη περισσότερο από την αύξηση της θερμοκρασίας όταν απουσιάζει η TIA1, γεγονός το οποίο πιθανώς να συνδέεται με την αυξημένη ανθεκτικότητα των αντίστοιχων νηματωδών, οι οποίοι υπερεκφράζουν την TIA2 σε *tia1* μεταλλαγμένο υπόβαθρο. Παρομοίως, σε κύτταρα θηλαστικών έχει δειχθεί ότι η απώλεια της TIA-R αυξάνει την δημιουργία κοκκίων στρες^{28,43}.

Φαίνεται λοιπόν ότι η θερμική καταπόνηση εγείρει τον σχηματισμό SGs ως απόκριση στο στρες σε ολόκληρο τον οργανισμό του *C.elegans*, ένα φαινόμενο χαρακτηριστικό των πολυκυττάρων οργανισμών που τους επιτρέπει να συντονίζουν το μεταβολισμό τους για την διατήρηση της ομοιόστασής τους, όταν αντιμετωπίζουν δριμείες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Όπως αναμενόταν, η απόκριση στο θερμικό σοκ συνοδεύεται από μία δραματική αύξηση των επιπέδων της Hsp-70.

Συμπερασματικά, τόσο τα σωματίδια P όσο και τα κοκκία στρες παρέχουν ένα μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο του μεταβολισμού του mRNA, που επηρεάζει την επιβίωση του οργανισμού υπό στρεσογόνες συνθήκες, υπό τις οποίες παρατηρείται επαγωγή του σχηματισμού τους. Σημειώνεται ότι η έλλειψη του *tia1* προκαλεί την μείωση των επιπέδων του *dcar-1* mRNA, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχουν μηχανισμοί συντονισμού του σχηματισμού SGs και των PBs, στους οποίους συμμετέχουν συστατικά των δύο δομών. Η εύρυθμη λειτουργία των κοκκίων στρες και των σωματίων P είναι σημαντική για τις διεργασίες ανάπτυξης, αναπαραγωγής και κυρίως για την διατήρηση και επαναφορά της ομοιόστασης μετά από έκθεση σε συνθήκες στρες (ή και κατά την γήρανση όπως δείχνουν δεδομένα του εργαστηρίου μας). Το γεγονός ότι οι διαδικασίες αυτές διερευνήθηκαν σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού στον *C. elegans* μας παρείχε την δυνατότητα να αντιμετωπίσουμε τα ζητήματα αυτά σε ένα συνεκτικό επίπεδο.

Ο ρόλος των μηχανισμών του μεταβολισμού του mRNA στα κοκκία στρες και τα σωματίδια P είναι ένα νέο πεδίο στην έρευνα της απόκρισης στο στρες και της γήρανσης, που αναμένεται να αντιμετωπίσει πολλά αναπάντητα έως τώρα ζητήματα. Στους μελλοντικούς στόχους περιλαμβάνεται η μελέτη του προτύπου έκφρασης των συστατικών των σωματίων P και των κοκκίων στρες και μετά από άλλες μορφές στρες (π.χ. οξειδωτικό), καθώς και η περαιτέρω μελέτη των επιδράσεων της υπερέκφρασης τους στην μακροζωία. Επιπλέον, απομένει να διερευνηθεί ο ρόλος των σωματίων P και των κοκκίων στρες στην διάρκεια ζωής και την ικανότητα απόκρισης στο στρες νηματωδών που φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια με καθιερωμένους ρόλους στην μακροζωία και να πραγματοποιηθεί ανάλυση του προτύπου έκφρασης των συστατικών αυτών των mRNP δομών στους νηματώδεις αυτούς. Η κατανόηση της συμβολής του μεταβολισμού του mRNA στην διατήρηση της ομοιόστασης των οργανισμών και στη μακροζωία μπορεί να προτείνει νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις για την γήρανση και τις ασθένειες που σχετίζονται με τη λειτουργική έκπτωση.

5 Βιβλιογραφία

1. Aizer, A., Brody, Y., Ler, L. W., Sonenberg, N., Singer, R. H. and Shav-Tal, Y. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol. Biol. Cell* 19, 2008, 4154-4166.
2. Amrani N., Ganesan R., Kervestin S., Mangus D.A., Ghosh S., Jacobson A., A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay, *Nature*, 432 ,2004, pp. 112–118.
3. Anderson P, Kedersha N.. Stress granules: The Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* ,2008, 33: 141–150.
4. Anderson P, Kedersha N.J, RNA granules.*Cell Biol.* 2006 Mar 13;172(6):803-8.
5. Anderson, P., and Kedersha, N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7, 213–221, 2002.
6. Anderson, P., and Kedersha, N.. Stressful initiations. *J. Cell Sci.* 115, 3227–3234, 2002.
7. Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., and Luhrmann, R. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11: 717–727 2005..
8. Asano K, Clayton J, Shalev A, Hinnebusch AG. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* 2000 Oct;14(19):2534-46.
9. Aubry, M.L., Cowell, P., Davey, M.J., and Shevde, S. Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel. *Br. J. Pharmacol.* 38, 332–344, 1970.
10. Bagga S., Bracht J., Hunter S., Massirer K., Holtz J., Eachus R., Pasquinelli A.E., Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation, *Cell*, 122 ,2005, pp. 553–563.
11. Barbee S.A., Estes P.S., Cziko A.M., Hillebrand J., Luedeman R.A, Coller J.M., Johnson N., Howlett I.C., Geng C., Ueda R.et al, Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies, *Neuron*, 52 (2006), pp. 997–1009.
12. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001 Feb;8(2):113-26. Review.
13. Beck AR, Miller IJ, Anderson P, Streuli M., RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2331-6.
14. Behm -Ansmant I., Rehwinkel J., Doerks T., Stark A., Bork P., Izaurralde E., mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes, *Genes Dev.*, 20 ,2006, pp. 1885–1898.
15. Bolanowski, M.A., Russell, R.L., and Jacobson, L.A. Quantitative measures of aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Population and longitudinal studies of two behavioral parameters. *Mech. Ageing Dev.* 15, 279–295, 1981.
16. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974 May;77(1):71-94.
17. Bruno, I., Wilkinson M.F. . 2006. P-bodies react to stress and nonsense. *Cell.* 125:1036–1038.
18. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell.* 2009 Dec 25;36(6):932-41.
19. Chen D, Pan KZ, Palter JE, Kapahi P Longevity determined by developmental arrest genes in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6: 525–533, 2007.
20. Chu C.Y., Rana T.M., Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54, *PLoS Biol.*, 4 2006, p. e210
21. Cohen LS, Mikhli C, Jiao X, Kiledjian M, Kunkel G, Davis RE., Dcp2 Decaps m2,2,7GpppN-capped RNAs, and its activity is sequence and context dependent, *Mol Cell Biol.* 2005 Oct;25(20):8779-91.
22. Coller J, Parker R. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122: 875–886, 2005.
23. Coller J. M., Tucker M., Sheth U., Valencia-Sanchez M. A., Parker R. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7:1717–1727, 2001.

24. Collier J., Parker R., General translational repression by activators of mRNA decapping, *Cell*, 122, 2005, pp. 875–886.
25. Cougot N., Babajko S., and Séraphin B., Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells *J Cell Biol* 2004 165:31-40. Published April 5, 2004, doi:10.1083/jcb.200309008.
26. Coulson, S., King, J., & Kutas, M.. Expect the unexpected: Event-related brain responses to morphosyntactic violations. *Language and Cognitive Processes*,1998 ,13, 21–58.
27. Curran SP, Ruvkun G Lifespan Regulation by Evolutionarily Conserved Genes Essential for Viability. *PLoS Genet* 3: e56, 2007.
28. De Leeuw, G., M. Moerman, C. J. Zappa, W. R. McGillis, S. Norris and M. Smith, 2007: Eddy correlation measurements of sea spray aerosol fluxes. In: C.S. Garbe, R.A. Handler and B. Jahne (Editors), *Transport at the Air Sea Interface - Measurements, Models and Parameterizations*. Springer Verlag, pp. pp 297-311.
29. Dever TE. Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci*. 1999 Oct;24(10):398-403. Review.
30. Ding L., Spencer A., Morita K., Han M., The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*, *Mol. Cell*, 19 (2005), pp. 437–447
31. Duhon, S.A., and Johnson, T.E. Movement as an index of vitality: comparing wild type and the age-1 mutant of *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. 50, B254–261,1995.
32. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N., Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001 Dec;1(6):529-39.
33. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):9-22.
34. Eystathioy T., Chan E.K.L., Tenenbaum S. A., Keene J. D., Griffith K., Fritzler M. J.. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell* 13:1338–1351, 2002.
35. Feinberg E.H., Hunter C.P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*. 2003;301:1545–1547.
36. Fenger-Gron M., Fillman C., Norrild B, Lykke J.-Andersen , Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping, *Mol. Cell*, 20 ,2005, pp. 905–915
37. Fraser C. S. and Doudna J.A. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature Reviews Microbiology* 5, 29-38 (January 2007)
38. Fujimura, K., Katahira, J., Kano, F., Yoneda, Y. and Murata, M. ,2009. Microscopic dissection of the process of stress granule assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1728-1737.
39. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:214074.
40. Gallo CM, Munro E, Rasoloson D, Merritt C, Seydoux G. Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. *Dev Biol*. 2008 Nov 1;323(1):76-87.
41. Gallouzi, I.E., F. Parker, K. Chebli, F. Maurier, E. Labourier, I. Barlat, J.P. Capony, B. Tocque, and J. Tazi. 1998. A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol. Cell. Biol*. 18:3956–3965.
42. Gavin A. C., et al. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440:631–636.
43. Gilks N et al Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular Biology of the Cell* 15(12): 5383-5398 (2004).
44. Golden J.W. Riddle D.L. A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process, *PNAS* February 1, 1984 vol. 81 no. 3 819-823

45. Goldstrohm, A. C., Seay, D. J., Hook, B. A., and Wickens, M. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 533–539, 2006.
46. Grishok, A., Sinskey, J.L. and Sharp, P.A. Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes Dev.* 19, 683–696, 2005.
47. Gueydan CL et al Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor α mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 274(4): 2322-2326, 1999.
48. Han AP, Yu C, Lu L, Fujiwara Y, Browne C, Chin G, Fleming M, Leboulch P, Orkin SH, Chen JJ. Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* 2001 Dec 3;20(23):6909-18.
49. Hansen M., Taubert S., Crawford D., Libina N., Lee S. J., Kenyon C. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 2007 6, 95–110. (doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00267)
50. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000;6:1099–1108.
51. Hata, T., Yonehara, T., Aoki, S. et al. Three dimensional sonographic visualization of the fetal face. *Am. J. Roentgenol.*, 170, 481–483, 1998.
52. Hershey J.W.B, Merrick W.C. The pathway and mechanism of initiation of protein sythesis. In: *Translational Control of Gene Expression*, ed. Sonenberg N, Hershey, JWB, Mathews MB. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 33–88, 2000.
53. Hinnebusch AG Translational control of GCN4: Gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2. In: *Translational Control*, ed Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996., Cold Spring Harbor, NY, 199–244.
54. Hinnebusch AG. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J Biol Chem.* 1997;272:21661–21664.
55. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sørensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M. , Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry, *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):180-3.
56. Ivanov KI, Puustinen P, Gabrenaite R et al. 2003. Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell*, 15, 2124-2139.
57. Jakymiw A., Pauley K. M., Ikeda K., Lian S., Eystathioy Th., Satoh M., Fritzler M. J. and Chan E. K. L. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing, *J Cell Sci* , 2007 120:1702
58. Jakymiw A., Lian S, T. Eystathioy, Li S., Satoh M., Hamel J.C., Fritzler M.J., Chan E.K, Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference, *Nat. Cell Biol.*, 7, 2005, pp. 1267–1274
59. Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. Amino acids as regulators of gene expression at the level of mRNA translation. *J. Nutr.* 133, 2046S–2051S, 2003.
60. Jing Deng, Heather P. Harding, Brian Raught, Anne-Claude Gingras, Juan Jose Berlanga, Donalyn Scheuner, Randal J. Kaufman, David Ron, Nahum Sonenberg, Activation of GCN2 in UV-Irradiated Cells Inhibits Translation, *Current Biology*, Volume 12, Issue 15, 6 August 2002, Pages 1279-1286, ISSN 0960-9822, 10.1016/S0960-9822(02)01037-0.
61. Jud MC, Czerwinski MJ, Wood MP, Young RA, Gallo CM, Bickel JS, Petty EL, Mason JM, Little BA, Padilla PA, Schisa JA. Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev Biol.* 2008 Jun 1;318(1):38-51.

62. Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D., Zipperlen, P., and Ahringer, J. Systematic Functional Analysis of the *Caenorhabditis elegans* Genome using RNAi. *Nature*, 421(6920): 231-237, 2003.
63. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, et al. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* 14: 885–890, 2004.
64. Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N., Morishita R., Hoshino S., Ohno M., Dreyfuss, Ohno S., Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to G.the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay, *Genes Dev.*, 20 pp. 355–367, 2006.
65. Kaufman, R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1999, 1211–1233.
66. Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S.F., and Anderson, P. Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8681–8685, 1992.
67. Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M., Yacono P., Lykke-Andersen J., Fritzler M. J., Scheuner D., Kaufman R. J., Golan D. E., and Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169:871-884, 2005.
68. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. and Anderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431 -1442, 1999.
69. Kedersha, N., and P. Anderson. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. 2002.Trans.* 30:963–969.
70. Kedersha, N., Cho, M., Li, W., Yacono, P., Chen, S., Golan, D., and Anderson, P. Mammalian stress granules: highly dynamic sites of mRNA triage during stress induced translational arrest. Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 2000.
71. Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P.. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257–1268, 2000.
72. Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. Fritzler, D. Scheuner, R. Kaufman, D.E. Golan, and P. Anderson. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169:871–884, 2005.
73. Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I.J. Miller, J. Stahl, and P. Anderson. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell.* 13:195–210, 2002.
74. Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431–1441, 1999.
75. Keiper, B.D., Lamphear, B.J., Deshpande, A.M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E.J., Blumenthal, T., and Rhoads, R.E. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 275, 10590–10596, 2000.
76. Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Feb;284(2):C273-84Kimball SR. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Jan;31(1):25-9. Review.
77. Kimball SR. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Jan;31(1):25-9.
78. Kimball SR. Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Prog Mol Subcell Biol.* 2001;26:155-84. Review.
79. Klass, M.R.. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing Dev.* 6, 413–429, 1977.
80. Kolobova, E., Efimov, A., Kaverina, I., Rishi, A. K., Schrader, J. W., Ham, A. J., Larocca, M. C. and Goldenring, J. R. Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules. *Exp Cell Res.* 2009 Feb 1;315(3):542-55.

81. Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440:637–643, 2006.
82. Kwon (S.W.), Kim (B.Y.), Weon (H.Y.), Baek (Y.K.), Go (S.J.): *Arenimonas donghaensis* gen. nov., sp. nov., isolated from seashore sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, 57, 954-958.
83. Ladomery M., Wade E., Sommerville J., Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1997, pp. 965–973
84. Lall S, Piano F, Davis RE, *Caenorhabditis elegans* decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis, *Mol Biol Cell*. 2005 Dec;16(12):5880-90.
85. Liu J., Rivas F.V., Wohlschlegel J., Yates J.R. III, Parker R., Hannon G.J., A role for the P-body component GW182 in microRNA function, *Nat. Cell Biol.*, 7, 2005, pp. 1261–1266.
86. Liu J., Valencia-Sanchez M.A., Hannon G.J., Parker R, MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies, J. Liu, M.A. Valencia-Sanchez, G.J. Hannon, R. Parker, MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies *Nat. Cell Biol.*, 7 2005, pp. 719–723
87. Liu TT, Kishimoto T, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N & Kasai H. Exocytosis and endocytosis of small vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J Physiol*, 2005, 568, 917–929.
88. Liu, K.S. and Sternberg, P.W. Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 14: 79-89 1995.
89. Loschi, M., Leishman, C. C., Berardone, N. and Boccaccio, G. L.. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *J. Cell Sci.* 122, 2009, 3973-3982.
90. Lu L, Han AP, Chen JJ. Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol*. 2001 Dec;21(23):7971-80.
91. M.A. Ferraiuolo, S. Basak, J. Dostie, E.L. Murray, D.R. Schoenberg, N. Sonenberg, A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay, *J. Cell Biol.*, 170, 2005, pp. 913–924
92. Maquat L.E., Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 2004, pp. 89–99.
93. Mazan-Mamczarz K, Lal A, Martindale JL, Kawai T, Gorospe M. Translational repression by RNA-binding protein TIAR. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr;26(7):2716-27.
94. Mazroui R., Di Marco S., Kaufman R. J., Gallouzi I. E. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol. Biol. Cell* 18:2603–2618, 2007.
95. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):16925-33
96. Mello C, Fire A. DNA transformation. *Methods in Cell Biology*. 1995;48:451–82.
97. Miller RA. Cell stress and aging: new emphasis on multiplex resistance mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009 Feb;64(2):179-82
98. Minshall N., Thom G., Standart N., A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking, *RNA*, 7, 2001, pp. 1728–1742.
99. Morimoto R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12, 1998, 3788–3796.
100. Muhrad D., Parker R., The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p, *EMBO J.*, 24, 2005, pp. 1033–1045.
101. Murakami S. and Johnson T. E., A Genetic Pathway Conferring Life Extension and Resistance to UV Stress in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*. 1996 July; 143(3): 1207–1218.

102. Nakamura A., Amikura R., Hanyu K., Kobayashi S., Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis, *Development*, 128, 2001, pp. 3233–3242
103. Nakamura A., Sato K., Hanyu-Nakamura K., *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis, *Dev. Cell*, 6, 2004, pp. 69–78.
104. Navarro R.E., Shim E.Y., Kohara Y., Singson A., Blackwell T.K., *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans* *Development*, 128, 2001, pp. 3221–3232.
105. Pan K. Z., Palter J. E., Rogers A. N., Olsen A., Chen D., Lithgow G. J., Kapahi P. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6, 2007, 111–119.
106. Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*. 2007;25:635–646.
107. Pestova TV, Hellen CU. Ribosome recruitment and scanning: what's new? *Trends Biochem Sci*. 1999 Mar;24(3):85-7. Review.
108. Phan L, Schoenfeld LW, Valásek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG. *EMBO J*. A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met. 2001 Jun 1;20(11):2954-65.
109. Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krays V, Streuli M, Anderson P., TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J*. 2000 Aug 1;19(15):4154-63.
110. Pulman S., 2007, Formal and Computational Semantics: a Case Study, in Jeroen Geertzen, Elias Thijsse, Harry Bunt and Amanda Schiffrin (eds.) Proceedings of the Seventh International Workshop on Computational Semantics: IWCS-7, Tilburg, The Netherlands, 2007, ISBN 90-74029-31-0, pp 181-196.
111. Qing-Bai She, Nanyue Chen, Zigang Dong, ERKs and p38 Kinase Phosphorylate p53 Protein at Serine 15 in Response to UV Radiation, *J. Biol. Chem*. 2000 275: 20444-20449. First Published on April 25, 2000.
112. Rehwinkel J., Behm-Ansmant I., Gatfield D., Izaurralde E., A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing *RNA*, 11, 2005, pp. 1640–1647.
113. Richter J.D., Sonenberg N., Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins, *Nature*, 433, 2005, pp. 477–480
114. Rikhvanov EG, Gamburg KZ, Varakina NN, Rusaleva TM, Fedoseeva IV, Tauson EL, Stupnikova IV, Stepanov AV, Borovskii GB, Voinikov VK. Nuclear–mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture. *The Plant Journal* ,2007;52:763-778.
115. Santoro MG. "Heat shock factors and the control of the stress response". *Biochemical pharmacology* 59 (1): 55–63, 2000.
116. Schmidlin, M., Lu, M., Leuenberger, S.A., Stoecklin, G., Mallaun, M., Gross, B., Gherzi, R., Hess, D., Hemmings, B.A., Moroni, C. The ARE-dependent mRNA-destabilizing activity of BRF1 is regulated by protein kinase B. *EMBO J*. 2004, 23:4760–4769.
117. Sen, G. L., and Blau. H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol*. 2005, 7:633-636.
118. Sheth U., Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 2003, 300:805–808.
119. Sheth U., Parker R., Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies, *Cell*, 125, 2006, pp. 1095–1109.
120. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731–745, 2009.
121. Song Q, Liu G, Hu S, Zhang Y, Tao Y, Han Y, Zeng H, Huang W, Li F, Chen P, et al.. Novel autoimmune hepatitis-specific autoantigens identified using protein microarray technology. *J Proteome* ,2010, Res 9: 30–39

122. Squirrell JM, Eggers ZT, Luedke N, Saari B, Grimson A, Lyons GE, Anderson P, White JG, CAR-1, a protein that localizes with the mRNA decapping component DCAP-1, is required for cytokinesis and ER organization in *Caenorhabditis elegans* embryos, *Mol Biol Cell*. 2006 Jan;17(1):336-44.
123. Srivastava, S.P., Kumar, K.U., and Kaufman, R.J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 2416–2423.
124. Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F., Blackwell, T.K., Anderson, P. MK2-induced tristetraprolin:14–3–3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.*, 2004, 23:1313–1324.
125. Sun Y, Yang P, Zhang Y, Bao X, Li J, Hou W, Yao X, Han J, Zhang H. A genome-wide RNAi screen identifies genes regulating the formation of P bodies in *C. elegans* and their functions in NMD and RNAi. *Protein Cell*. 2011 Nov;2(11):918-39.
126. Sweet TJ, Boyer B, Hu W, Baker KE, Collier J., Microtubule disruption stimulates P-body formation. *RNA*. 2007 Apr;13(4):493-502.
127. Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445: 922–926, 2007.
128. Syntichaki P. & Tavernarakis N. Signaling pathways regulating protein synthesis during ageing. *Exp. Gerontol.* 41, 1020-1025, 2006.
129. Tanaka K.J., Ogawa K., Takagi M., Imamoto N., Matsumoto K., M. Tsujimoto, RAP55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in *Xenopus oocytes*, *J. Biol. Chem.*, 281, 2006, pp. 40096–40106.
130. Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S.F., and Anderson, P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629–639, 1991.
131. Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160: 823–831.
132. Tourrière H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J. RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: Selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* 21: 7747–7760, 2001.
133. Tsai, N. P., Tsui, Y. C. and Wei, L. N. Dynein motor contributes to stress granule dynamics in primary neurons. *Neuroscience* 159, 647-656, 2009.
134. Vigo, J. B., and J. T. Ellzey. "Effects of Arsenic Toxicity at the Cellular Level: A Review". *Texas Journal of Microscopy* 37 (2): 45–49, 2006.
135. Ward, S. and Carrel, J.S. 1979. Fertilization and sperm competition in the nematode *C. elegans*. *Dev. Biol.* 73: 304-321
136. Waterston, R. and Sulston, J. (1995). The genome of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 10836-10840.
137. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG, Coping with stress: eIF2 kinases and translational control, *Biochem Soc Trans.* 2006 Feb;34(Pt 1):7-11 Review.
138. Williams B. R. G., Signal Integration via PKR, *Sci. STKE*, Vol. 2001, Issue 89, p. re2, 3 July 2001
139. Wu C. "Heat shock transcription factors: structure and regulation". *Annual review of cell and developmental biology* 11: 441–69, 1995.
140. Yamasaki S, Anderson P., Reprogramming mRNA translation during stress, *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Apr;20(2):222-6.
141. Zhan, K., Vattem, K.M., Bauer, B.N., Dever, T.E., Chen, J.J., and Wek, R.C. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol. Cell. Biol.* 2002. 22, 7134–7146.