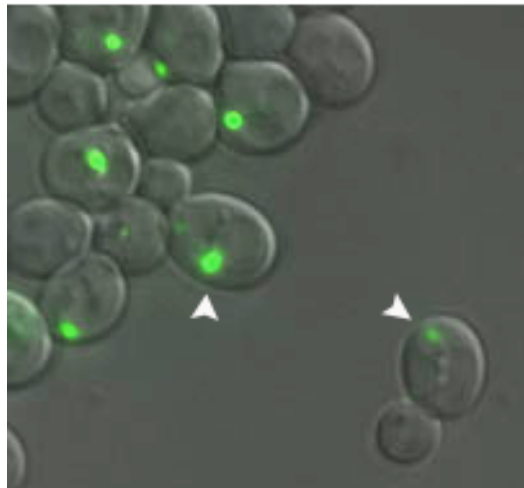


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΑΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ**

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Μελέτη της μεταγραφής πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*



Χαράλαμπος Α. Λάζαρης

**Μέλη διμελούς επιτροπής: Δρ. Ι. Παπαματθαϊάκης, Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ. Δ.Τζαμαρίας, Ερευνητής**

**Ηράκλειο Κρήτης
Ιανουάριος 2009**

Περιεχόμενα

Περίληψη-Abstract.....	3
1.Εισαγωγή	
1.1 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins) και ο ρόλος τους.....	4
1.2 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp26p του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.3 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp42p του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.4 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp104p στο σακχαρομύκητα.....	10
2.Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	16
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση	
3.1 Μελέτη συνθηκών που επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων των HSPs στο <i>S.cerevisiae</i>	17
3.2 Η μεταγραφή των γονιδίων <i>HSP104</i> , <i>HSP26</i> και <i>HSP42</i> δεν εμφανίζει μεταγραφική μνήμη.....	19
3.3 Η υβριδική πρωτεΐνη Hsp26GFPr διαιρείται ασύμμετρα, καθώς παραμένει αποκλειστικά στα μητρικά κύτταρα.....	21
3.4 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού της φθορίζουσας κηλίδας της Hsp26p.....	24
3.5 Έλεγχος της δράσης της Hsp26p <i>in vivo</i> , μέσω της ικανότητας της Hsp26GFPr να δεσμεύει μη κατάλληλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και να αποτρέπει τη δημιουργία μη λειτουργικών συσσωματωμάτων.....	25
3.6 Αναζήτηση ύπαρξης κάποιας φυσιολογικής σημασίας που να σχετίζεται με την άνιση κατανομή της Hsp26p.....	27
3.7 Η άνιση κατανομή παρατηρείται μόνο στην περίπτωση της υβριδικής Hsp26GFPr και όχι της Hsp26p.....	28
3.8 Έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός της Hsp104p σε συνθήκες στρες.....	30
3.9 Η Hsp104p εκφράζεται ετερογενώς σε κύτταρα που έχουν υποστεί μακρόχρονο ακραίο στρες (πολυήμερη παραμονή σε καθαρό νερό).....	32
3.10 Συζήτηση.....	38
4. Υλικά-Μέθοδοι.....	40
5. Ευχαριστίες.....	55
6. Βιβλιογραφία.....	56

Περίληψη-Abstract

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και πιο συγκεκριμένα των μελών που συνιστούν τη μηχανή ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών, σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου. Η ανάλυση μεταξύ άλλων έδειξε ότι υβριδική Hsp26p με GFP εμφανίζει ασύμμετρη κατανομή μεταξύ μητρικών και θυγατρικών κυττάρων και αναζητήθηκε η φυσιολογική και εξελικτική σημασία του εν λόγω φαινομένου. Ωστόσο, το φαινόμενο αυτό φαίνεται πως είναι ειδικό για την Hsp26GFPp και όχι για την Hsp26p, γεγονός που σημαίνει πως σε κάποιες ιδιαίτερες περιπτώσεις η χρήση υβριδικών μορίων μπορεί να καταστεί παραπλανητική. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μια άλλη πρωτεΐνη του θερμικού σοκ με αποδεδειγμένα ιδιαίτερη σημασία για την επιβίωση εμφανίζει φαινοτυπική ποικιλότητα ως προς την έκφρασή σε ακραίες συνθήκες στρες (πλήρης στέρηση θρεπτικών), κάτι που μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για την επιβίωση του πληθυσμού σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα.

During this work we focused on the analysis of expression of heat shock proteins in yeast (especially of those that constitute the so-called “protein-quality control machinery), in single-cell level resolution. This analysis revealed that heat-shock protein 26 (Hsp26p) that was hybridized with green fluorescent protein, was asymmetrically distributed between mother and daughter cells. We tried to reveal the physiological or evolutionary basis of this phenomenon but our attempt was absolutely fruitless. Finally, it was proven that this asymmetric distribution was a misleading artifact due to GFP hybrid and not a real phenomenon. A really interesting phenomenon that was uncovered during this study is the phenotypic variation in the expression of another heat-shock protein, Hsp104p. Hsp104p is a protein of major importance for cells under stress and the phenotypic variation revealed can be of major significance for the survival of population in fluctuating environments.

1. Εισαγωγή

1.1 Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins) και ο ρόλος τους

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών με μεγάλο εύρος μοριακών βαρών (9-110 KDa) (Lindquist, 1992). Η μεγάλη τους σημασία για την κυτταρική φυσιολογία δηλώνεται από την καθολική τους παρουσία στον έμβιο κόσμο, καθώς απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς και μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς (Lindquist, 1992) όσο και σε πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η ποικιλία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ αντικατοπτρίζεται και στο γεγονός ότι υπάρχουν τουλάχιστον 8 μεγάλες οικογένειες αυτών οι οποίες ονομάζονται με βάση τα μοριακά βάρη των μελών τους (hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, hsp27, DnaJ, hsp10, Lon).

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ποικίλει και σχετίζεται άμεσα με περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Πολλά μέλη των προαναφερθέντων οικογενειών απαντώνται στο κυτταρόπλασμα, άλλα στον πυρήνα, άλλα σε υποκυτταρικά οργανίδια και άλλα σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα ανάλογα με τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η sHSP (small heat-shock protein) Hsp26p που εντοπίζεται στον πυρήνα όταν κύτταρα *S.cerevisiae* υποστούν θερμικό σοκ όντας σε εκθετική φάση αύξησης, ενώ αντίθετα αν βρίσκονται σε στατική φάση αύξησης, η Hsp26p εντοπίζεται κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικά). (Rossi and Lindquist, 1989)

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από πολύ νωρίς (περίπου 30 χρόνια πριν) έγιναν προσπάθειες να αποδοθούν ιδιαίτεροι ρόλοι στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και να καθοριστεί η φυσιολογική τους σημασία. Παρά τις έντονες προσπάθειες, η ακριβής λειτουργία πολλών από τις πρωτεΐνες αυτές καθώς και ο τρόπος δράσης τους παραμένουν ασαφείς (Petko and Lindquist, 1986) (Susek and Lindquist, 1989). Παρά την ύπαρξη μεταλλαγμάτων όπου απουσιάζουν εντελώς οι κωδικές περιοχές των πρωτεϊνών αυτών, τα κύτταρα ζουν απολύτως φυσιολογικά. Η ανυπαρξία

φαινοτύπου λοιπόν καθιστά την απόδοση σαφούς λειτουργίας ιδιαίτερα δύσκολη σε κάποια από τα μέλη των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Σήμερα, η κύρια λειτουργία που αποδίδεται συνδυαστικά σε πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές, είναι η δράση τους ως μοριακές συνοδοί (molecular chaperones). Αυτό σημαίνει ότι κατά το θερμικό σοκ αλλά και άλλα είδη στρες, πρωτεΐνες θερμικού σοκ δεσμεύουν και διατηρούν μη αναδιπλωμένα άλλα πρωτεϊνικά μόρια, έτσι ώστε να αποτραπεί η δημιουργία αδιάλυτων και μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, που θα καταστήσει τα μόρια που τα συνιστούν, μη λειτουργικά (Liberek et al., 2008).

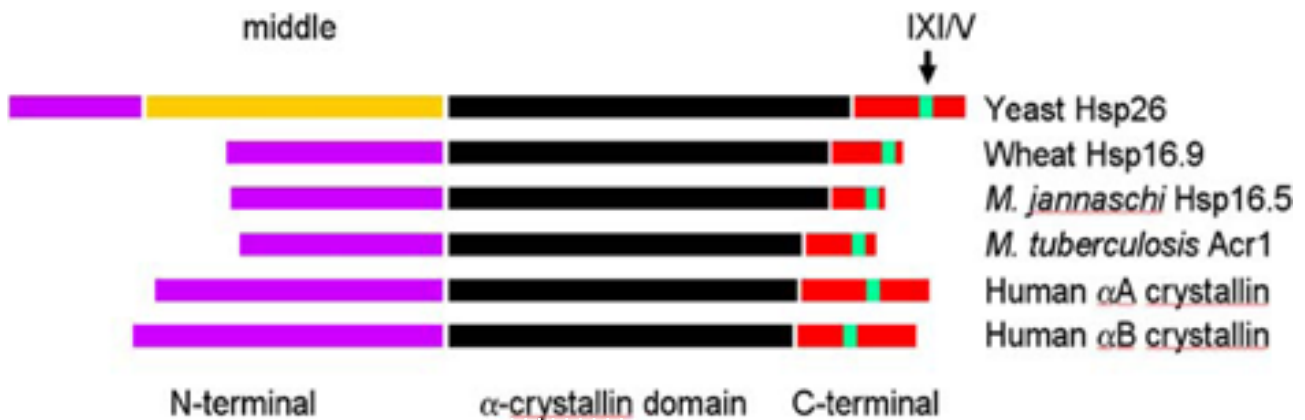
Η μοριακή μηχανή η οποία επιτυγχάνει την παραπάνω λειτουργία αποτελεί μια μηχανή ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών (protein quality control machinery) και χάρη στα μοναδικά πλεονεκτήματα και γενετικά εργαλεία που προσφέρει ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*, ως οργανισμός-μοντέλο, έχει μελετηθεί διεξοδικά σε αυτόν.

Ως βασικά στοιχεία της μηχανής έχουν χαρακτηριστεί οι πρωτεΐνες Hsp104p, Hsp70p, Hsp40p (Glover and Lindquist, 1998), ενώ στην όλη διαδικασία φαίνεται να εμπλέκεται και τουλάχιστον μια από τις δύο γνωστές σήμερα στο ζυμομύκητα, μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού στρες, η Hsp26p (Haslbeck et al., 1999) (Cashikar et al., 2005).

1.2 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp26p του *Saccharomyces cerevisiae*

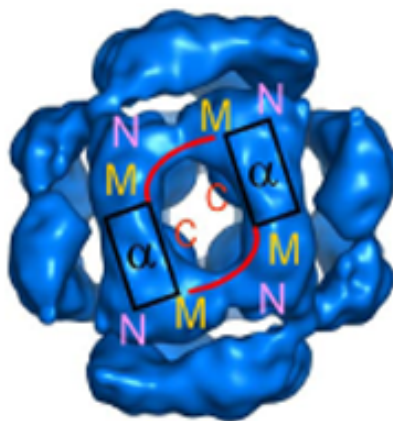
Το γονίδιο *HSP26* κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε το 1989 (Bossier et al., 1989). Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (Hsp26p) με μέγεθος 27 kDa (213aa), από την οποία απουσιάζουν εντελώς τα κατάλοιπα μεθειονίνης. Χαρακτηρίστηκε ως μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ εξαιτίας του μικρού της μοριακού βάρους και της ομολογίας της με άλλες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες θερμικού σοκ καθώς και με τις α-κρυσταλλίνες (Bossier et al., 1989). Ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που προαναφέρθηκαν, είναι η ύπαρξη της ιδιαίτερα υδρόφοβης τετραπεπτιδικής αλληλουχίας Gly-Val-Leu-Thr (Bossier et al., 1989).

Αναλυτικότερα, η γενική δομή της Hsp26p και άλλων ομόλογών της πρωτεϊνών από άλλα είδη φαίνεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Η γενική δομή των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (small heat-shock proteins, sHSPs) και των α -κρυσταλλινών (White et al., 2006)

Αποτελούνται από μια αμινοτελική περιοχή που στην περίπτωση της Hsp26p είναι ιδιαίτερα μεγάλη και μπορεί να διακριθεί σε τουλάχιστον δύο επιμέρους περιοχές (ακραία αμινοτελική και μέση (middle)), από έναν πρωτεϊνικό τομέα α -κρυσταλλίνης και μια καρβοξυτελική περιοχή (White et al., 2006). Τα τελευταία χρόνια αποδίδεται στην αμινοτελική περιοχή, η λειτουργία δέσμευσης υποστρώματος (των πρωτεϊνών δηλαδή που υπό συνθήκες στρες θα πρέπει να μείνουν μακριά για να αποτραπεί η δημιουργία μη λειτουργικών και αδιάλυτων συσσωματωμάτων) (Giese et al., 2005), ενώ η καρβοξυτελική περιοχή φαίνεται να σχετίζεται με τη δημιουργία ολιγομερών της ίδιας της Hsp26p (White et al., 2006). Η Hsp26p μπορεί να βρεθεί σε διμερή μορφή αλλά και να σχηματίσει ολιγομερή (συγκεκριμένα 24μερή) τα οποία μάλιστα εμφανίζουν τετραεδρική συμμετρία (βλ. εικόνα 2). Μεταλλάγματα στα οποία απουσιάζει η ακραία αμινοτελική περιοχή αλλά και η μέση (middle globular domain) σχηματίζουν διμερή αλλά όχι και ολιγομερή, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μέση περιοχή είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ολιγομερών (Stromer et al., 2003).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του 24μερούς με τετραεδρική συμμετρία που αποτελείται από μόρια Hsp26p. Οι χαρακτήρες N,M,C χαρακτηρίζουν την αμινοτελική περιοχή, τη μέση σφαιρική περιοχή (middle globular domain) και την καρβοξυτελική περιοχή αντίστοιχα (White et al., 2006)

Θερμοδυναμικά, με βάση πειράματα που έχουν γίνει *in vitro*, ευνοείται η μετάβαση από την ολιγομερή μορφή (24μερές) στη διμερή όταν η θερμοκρασία είναι υψηλή (42°C) ενώ αντίθετα στους 25°C ευνοείται η δημιουργία του 24μερούς (Stromer et al., 2004). Όπως λοιπόν γίνεται εύκολα αντιληπτό, θεωρείται ότι η ενεργή μορφή της Hsp26p είναι αυτή του διμερούς και όχι αυτή του 24μερούς. Ωστόσο έχει αναφερθεί πως είναι δυνατή η μετάβαση από την ανενεργό στην ενεργό μορφή της Hsp26p χωρίς αποδιάταξη του ολιγομερούς (Franzmann et al., 2005). Επίσης παρά το γεγονός ότι ενεργός μορφή θεωρείται το διμερές, σε πειράματα όπου υπερεκφράστηκε Hsp26p σε κύτταρα *S.cerevisiae* στους 30°C ή όταν απομονώθηκε από κύτταρα που υπέστησαν θερμικό σοκ ή άλλους τύπους στρες, απομονώθηκε με τη μορφή συσσωματώματος με διάμετρο 15-25nm και μοριακό βάρος 550kDa περίπου (Bentley et al., 1992). Το συσσωμάτωμα αυτό χαρακτηρίστηκε ως ελεύθερο από άλλα πολυπεπίδια πλην της Hsp26p (Bentley et al., 1992). Τα στοιχεία αυτά, με βάση σύγχρονα δεδομένα, παραπέμπουν σε χαρακτηριστικά του 24μερούς Hsp26p (White et al., 2006).

Όσον αφορά στη μεταγραφική δραστηριότητα του *HSP26* γονιδίου, έχει δειχτεί στο παρελθόν αλλά και σε αυτή την εργασία, ότι στους 30°C και σε εκθετική

φάση ανάπτυξης η μεταγραφή είναι μηδενική, ενώ αυξάνεται σημαντικά με απότομη αύξηση της θερμοκρασίας της τάξης των 10°C. Ενδεικτικά με βάση τα πειράματα με χρήση της υβριδικής πρωτεΐνης Hsp26GFPp, η μεταφορά μιας εκθετικής καλλιέργειας *S.cerevisiae* από τους 30°C στους 39°C και η παραμονή της εκεί για 1h30min οδηγεί σε αύξηση 40X της έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης Hsp26GFPp (βλ.σχετικά FACS διαγράμματα στην ενότητα: Αποτελέσματα-Συζήτηση). Η σημαντική αύξηση της ποσότητας της Hsp26p μέσα στα κύτταρα, κατά το θερμικό σοκ, σε συνδυασμό με την πρόσφατα αποκαλυφθείσα ιδιότητα της μέσης περιοχής (middle domain) ως ανιχνευτή μεταβολής θερμοκρασίας (Franzmann, 2008), δικαιολογούν τη συμβολή της Hsp26p στην επιτυχή απόκριση του κυττάρου στο θερμικό σοκ. Αυτό που φαίνεται να συμβαίνει είναι το εξής: η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην μαζική έκφραση και παραγωγή μορίων Hsp26p, τα οποία χάρη στην ύπαρξη της μέσης περιοχής, “αντιλαμβάνονται” την αλλαγή στη θερμοκρασία, μετατρέποντας από ανενεργά μόρια, σε ενεργές πρωτεΐνες-συνοδοί που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες υποστρώματα, αποτρέποντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων (Franzmann, 2008).

Αν και η ενεργοποίηση μεταγραφής του γονιδίου *HSP26* είναι ταχύτερη όταν το ερέθισμα αποτελεί η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας (Haslbeck et al., 1999), είναι έκδηλη και σε άλλες περιπτώσεις σοκ όπως έλλειψη θρεπτικού (βλ. και στην παρούσα τη FACS ανάλυση για Hsp26GFPp κατά την εξάντληση του αποθέματος γλυκόζης στο μέσο), μεταβολή pH, ωσμωτικό στρες. Επίσης μεταγραφική δραστηριότητα του εν λόγω γονιδίου παρατηρείται και στις περιπτώσεις που τα κύτταρα εισέρχονται στη στατική φάση ανάπτυξης ή αρχίζουν να σχηματίζουν σπόρια (Petko and Lindquist, 1986).

1.3 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp42p του *Saccharomyces cerevisiae*

Μέχρι το 1996, η Hsp26p που μόλις περιγράφηκε, αποτελούσε τη μόνη γνωστή μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ στο ζυμομύκητα. Τότε η ομάδα του David Shore ανακάλυψε μια δεύτερη sHSP, την Hsp42p (Wotton et al. 1996). Η πρωτεΐνη αυτή έχει μοριακό βάρος 42kDa και σχηματίζει μεγάλες δυναμικές ολιγομερείς δομές με μορφή βαρελιού (barrel-like structures) (Haslbeck et al., 2004). Σε αντίθεση με τη

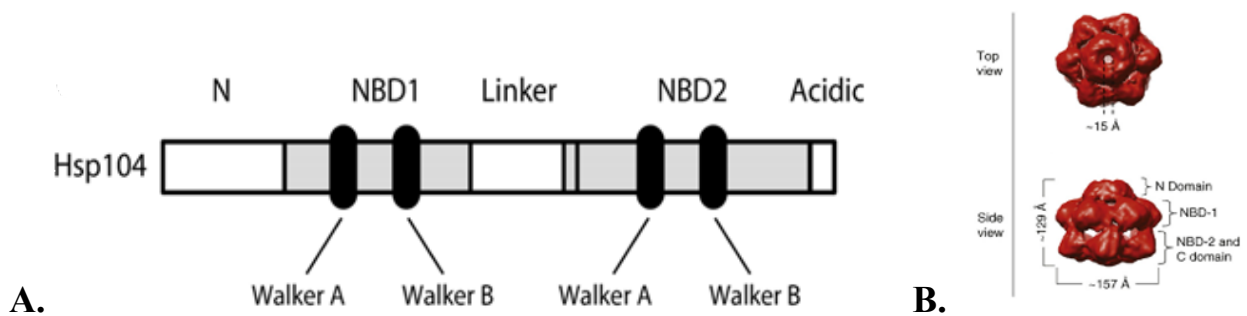
Hsp26p που εκφράζεται και δρα σε υψηλή θερμοκρασία ή γενικότερα συνθήκες στρες, η Hsp42p είναι ενεργή σε όλες τις συνθήκες (Haslbeck et al., 2004). Η έκφρασή του γονιδίου *HSP42* αυξάνεται σε ποικίλες συνθήκες στρες όπως και αυτή του *HSP26*. Επίσης σε επίπεδο αλληλουχίας, οι πρωτεΐνες Hsp26p και Hsp42p εμφανίζουν σημαντική ομολογία. Ωστόσο τα επίπεδα της Hsp42p αυξάνονται πιο γρήγορα από αυτά της Hsp26p σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και έλλειψης θρεπτικού μέσου (Wotton et al., 1996). Όπως ακριβώς συμβαίνει και με την Hsp26p, η Hsp42p αναφέρεται πως σχηματίζει ολιγομερή με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 200kDa. Για τη δυνατότητα δημιουργίας ολιγομερών φαίνεται να ευθύνεται μια συντηρημένη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, που απαντάται και σε άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως Hsp30p, Hsp26p, Hsp27p (Wotton et al., 1996). Αν και αναφέρεται πως η Hsp42p εκφράζεται ακόμα και υπό συνθήκες εκθετικής αύξησης και απουσίας στρες, η υβριδική Hsp42GFPp που χρησιμοποιήθηκε για FACS ανάλυση στην παρούσα εργασία δεν ήταν ανιχνεύσιμη στην εκθετική φάση ανάπτυξης και σε θερμοκρασία 30°C (βλ. σχετική καμπύλη FACS στην ενότητα “Αποτελέσματα-Συζήτηση”).

Με βάση το τρέχον μοντέλο για τη συμμετοχή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών (protein quality control), οι sHSPs Hsp26p και Hsp42p αποτελούν την πρώτη γραμμή, καθώς προσδένουν και αποτρέπουν τη συσσωμάτωση του 1/3 των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών του *Saccharomyces cerevisiae*. Μάλιστα το 90% των πρωτεϊνών αυτών είναι δυνατόν να δεσμεύονται και από τις δύο sHSPs. Φαίνεται λοιπόν πως οι sHSP διαδραματίζουν ρόλο στην ομοίωση του κυττάρου τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες. Παρόλα αυτά ο ρόλος τους δε φαίνεται να είναι ο κύριος, καθώς πειράματα με διπλά μεταλλάγματα *hsp26Δhsp42Δ*, δείχνουν ότι τα εν λόγω στελέχη δεν έχουν κάποια διαφορά στη βιωσιμότητα και στον τρόπο με τον οποίο ανταπεξέρχονται στο θερμικό σοκ, σε σχέση με τα αγρίου τύπου στελέχη (Cashikar et al., 2005). Αντίθετα άλλες μεγαλύτερες πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως η Hsp104p έχουν σημαίνοντα ρόλο στην κυτταρική βιωσιμότητα σε συνθήκες στρες καθώς μεταλλάγματά τους ή διπλά

μεταλλάγματα *hsp104Δhsp26Δ* εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα σε συνθήκες στρες, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου στελέχη (Cashikar et al., 2005).

1.4 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp104p στο σακχαρομύκητα

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp104p ανήκει στην οικογένεια των Hsp100/Clp πρωτεϊνών (Parsell et al., 1994). Απαντάται στη μορφή ομοεξαμερών σωματίων με σχήμα δακτυλίου (βλ. εικόνα 3B). Για τη δημιουργία των ολιγομερών αυτών μορφών απαιτείται η παρουσία νουκλεοτιδίων αδερίνης (Parsell et al., 1994). Η οργάνωση των πρωτεϊνικών τομέων της Hsp104p φαίνεται στο σχήμα της εικόνας 3A.



Εικόνα 3A. Η δομή της Hsp104p: Η Hsp104p περιέχει δύο πρωτεϊνικούς τομείς υπεύθυνους για την πρόσδεση νουκλεοτιδίων (NBD1 και NBD2) προσδέουν και υδρολύουν ATP και διαχωρίζονται από μια εκτεταμένη περιοχή συνδέτη (linker). Διακρίνονται επίσης η αμινοτελική (N) και καρβοξυτελική (acidic, C) περιοχή της (από (Schaupp et al., 2007)). **B)** Η δομή ενός ομοεξαμερούς σωματίου Hsp104p. Διακρίνεται η στερεοδιάταξη των επιμέρους πρωτεϊνικών τομέων στο χώρο.

Η μεταγραφή του γονιδίου *HSP104* όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του *HSP26*, επάγεται παρουσία θερμικού σοκ, αλλά και άλλων μορφών στρες όπως παρουσία αιθανόλης. Ακόμα η έκφραση της Hsp104 είναι αυξημένη κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης ανάπτυξης μιας καλλιέργειας αλλά και κατά τη σπορίωση (όπως συμβαίνει και με την Hsp26p) (Sanchez et al., 1992). Μάλιστα η έκφραση της Hsp104p στις συνθήκες σπορίωσης φαίνεται να σχετίζεται με την αυξημένη ανθεκτικότητα των σπορίων σε χαμηλές θερμοκρασίες (Sanchez et al.,

1992). Σε αντίθεση με την Hsp26p η Hsp104p, εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα ακόμα και στους 30°C. Ωστόσο με βάση την παρούσα αλλά και προηγούμενες μελέτες, η σχετική αύξηση των επιπέδων της έκφρασης της Hsp104p κατά τη μεταφορά από τους 30°C, σε υψηλή θερμοκρασία (πχ 39°C) είναι πολύ μικρότερη (4X) σε σχέση με την αντίστοιχη της Hsp26p (40X).

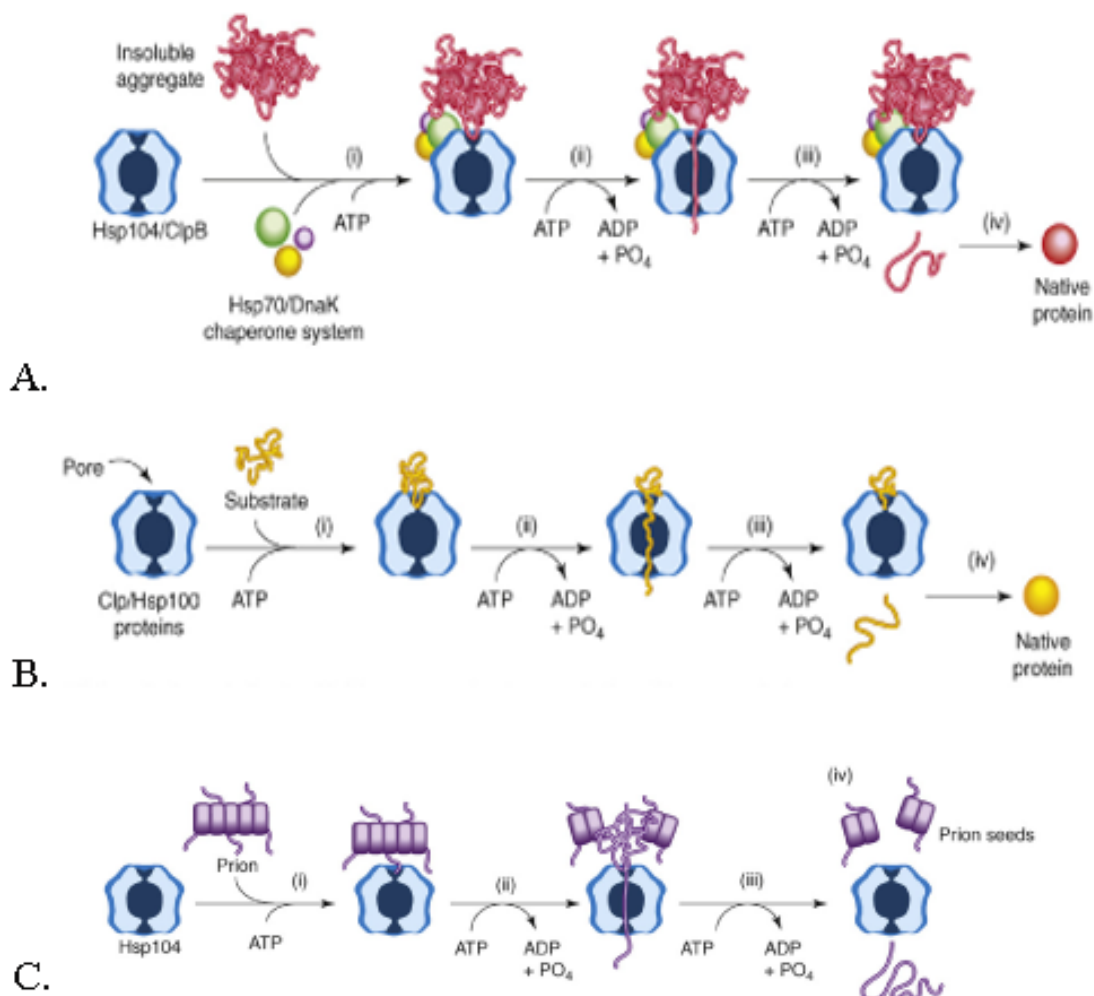
Ο κεντρικός ρόλος της Hsp104p στην απόκριση στο θερμικό και άλλα είδη στρες αναδεικνύεται από τη σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα των μεταλλαγμένων *Hsp104Δ* σε σχέση με στελέχη αγρίου τύπου (Parsell et al., 1994) (Cashikar et al., 2005), κάτι που όπως είδαμε δε συμβαίνει στις περιπτώσεις των *Hsp26Δ* και *Hsp70Δ*. Επίσης ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των *Hsp104Δ*, είναι η απώλεια της λεγόμενης θερμοανθεκτικότητας (thermotolerance). Ενώ τα αγρίου τύπου στελέχη επιβιώνουν σε ένα σύντομο αλλά έντονο θερμικό σοκ (που διαφορετικά θα τα σκότωνε) αν έχουν πριν υποβληθεί σε σύντομο αλλά μη θνησιγόνο (sublethal) θερμικό σοκ, δε συμβαίνει το ίδιο και με τα *hsp104Δ* στελέχη. Δεδομένου ότι *hsp42Δ* ή *hsp26Δ* στελέχη δε χάνουν τη θερμοανθεκτικότητά τους, η Hsp104p αρκεί για την εμφάνιση θερμοανθεκτικότητας (thermotolerance) (Sanchez and Lindquist, 1990) (Lindquist and Kim, 1996).

Ενώ οι sHSPs που προαναφέρθηκαν, απλά αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών σε συνθήκες σοκ (Cashikar et al., 2005), το τελικό βήμα της κατάλληλης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών αυτών απαιτεί την παρουσία της Hsp104p και των Hsp70/40. Το τρέχον μοντέλο λειτουργίας της “μηχανής” ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών είναι το εξής:

Αφού αρχικά δράσουν οι sHSPs και αποτρέψουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων, οι τελευταίες “παραδίδονται” στο σύμπλοκο Hsp104, Hsp70/40, για να επιτευχθεί η κατάλληλη αναδίπλωση των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων και τελική απελευθέρωσή τους (Haslbeck, 2005) (Glover and Lindquist, 1998), εφόσον βέβαια οι συνθήκες είναι και πάλι κατάλληλες, για να δράσουν.

Τα μεγαλομοριακά συσσωματώματα sHSPs και πρωτεϊνικών υποστρωμάτων είναι μεγάλοι αδιάλυτοι σχηματισμοί οι οποίοι επαναδιαλύονται χάρη στη δράση

μορίων όπως η Hsp104p και Hsp70p, που απαιτούν ATP για να ολοκληρώσουν τη δράση τους. Αν και η Hsp70p έχει δείξει να μπορεί να ελευθερώσει τις πρωτεΐνες-υποστρώματα από τα sHSP-πρωτεϊνικά συσσωματώματα *in vitro*, τα αδιάλυτα συσσωματώματα sHSP και πρωτεϊνών, τα οποία δημιουργούνται *in vivo* απαιτούν τη δράση της Hsp104p (Parsell et al., 1994) (Haslbeck, 2005) και πιθανά τη συνδυασμένη δράση αυτής και της Hsp70p (Sanchez et al., 1993). Για τη δέσμευση των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων από την Hsp104p, αρκεί η πρόσδεση μορίων ATP στις περιοχές NBD1 και NBD2 (βλ.εικόνα 3), ενώ για την τελική αναδίπλωση απαιτείται υδρόλυση των ATP μορίων (Doyle et al., 2007). Η συνδυασμένη δράση των sHSPs και των Hsp104p, Hsp70p και Hsp40p παρουσιάζεται στην εικόνα 4A.

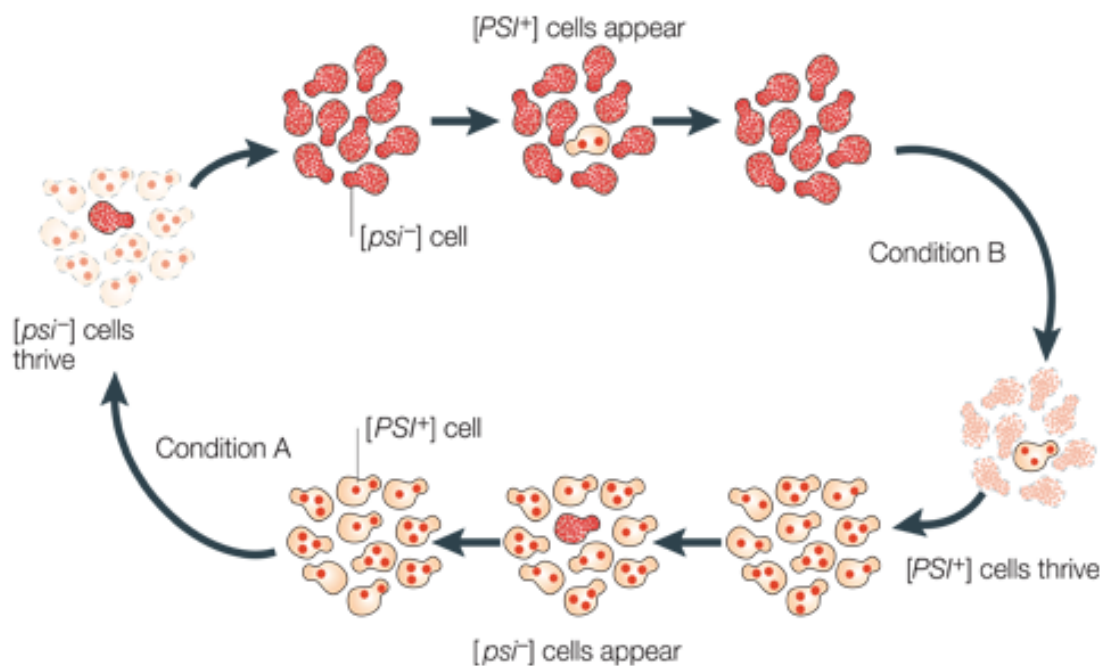


Εικόνα 4. Α) Η συνδυασμένη δράση των Hsp104/ClpB και Hsp70/DnaK για την απελευθέρωση των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων από συσσωματώματα και την ανάκτηση της δράσης τους. Β) Γενικό σχήμα για τη δράση ATPάσης των πρωτεϊνών της οικογένειας Hsp100/Clp όπου ανήκει και η Hsp104p. Γ) Σχηματική παρουσίαση της δράσης της Hsp104p για τη δημιουργία περισσότερων “πυρήνων” δημιουργίας prions (βλ. κείμενο παρακάτω) (από Doyle and Wickner, 2008, τροποποιημένο).

Η πρόσφατη αναφορά ασύμμετρης διαίρεσης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στην περίπτωση της *E.coli* και η συσχέτιση του φαινομένου αυτού με γήρανση (των μητρικών κυττάρων) και παράλληλη απαλλαγή των θυγατρικών από τα μη λειτουργικά πλέον συσσωματώματα (rejuvenation), ή ακόμα η ασύμμετρη κληρονόμηση καρβονυλιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών στο *Saccharomyces cerevisiae* (Aguilaniu, 2003) (Nyström, 2005) (Etjavec et al., 2007), καθιστά εύλογο το ερώτημα της κληρονόμησης του μηχανισμού που μόλις περιγράφηκε, ή των επιμέρους μερών του. Τα μεγαλομοριακά σύμπλοκα που δημιουργούνται μεταξύ HSPs και πρωτεϊνών-υποστρωμάτων σε συνθήκες στρες πώς κληρονομούνται στους απογόνους; Μήπως οι πρωτεΐνες-υποστρώματα που έχουν περάσει τη διαδικασία του σοκ δεν είναι πλέον το ίδιο λειτουργικές και τα θυγατρικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα μηχανισμό να μην τις κληρονομήσουν από τα μητρικά αλλά να συνθέτουν νέες *de novo*; Κι αν υποτεθεί ότι οι πρωτεΐνες-υποστρώματα απελευθερώνονται επιτυχώς από τα σύμπλοκα με τις HSPs όντας απόλυτα λειτουργικές και μετά την απελευθέρωση, με απλή διάχυση κληρονομούνται από τα μητρικά στα θυγατρικά κύτταρα, τι συμβαίνει με την ίδια τη “μηχανή ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών”; Οι επιμέρους πρωτεΐνες που την αποτελούν και περιγράφηκαν με λεπτομέρεια παραπάνω, εξακολουθούν να είναι το ίδιο αποτελεσματικές και μετά τη δράση τους; Μήπως όχι και αντί να διαχυθούν στα θυγατρικά κύτταρα, τα τελευταία συνθέτουν τις δικές τους προκειμένου να απαλλαγούν από το βαρύ και μη ωφέλιμο φορτίο των “γονιών” τους;

Εκτός από τη δράση των sHSPs και των Hsp104p, Hsp70p και Hsp40p στην επιτυχή απόκριση των κυττάρων στο στρες, οι τρεις τελευταίες φαίνονται με βάση πολύ πρόσφατα δεδομένα να εμπλέκονται στον έλεγχο της δημιουργίας prions όπως πχ. στη ρύθμιση της δημιουργίας του prion *[PSI⁺]* (αποτελούμενου από τον παράγοντα τερματισμού της μετάφρασης Sup35) του *Saccharomyces cerevisiae* (Shorter and Lindquist, 2008). Πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο Hsp70p:Hsp40p φαίνεται να έχει αντίθετη δράση από την Hsp104p, καθώς παρεμποδίζει τη δημιουργία “πυρήνων” δημιουργίας prions. Αντίθετα η Hsp104p όταν βρίσκεται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ευνοεί τον πολλαπλασιασμό και εξάπλωση των

prions, ενώ αντίθετα παρεμποδίζει τη δημιουργία των τελευταίων, όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Shorter and Lindquist, 2008). Με βάση σειρά προηγούμενων μελετών (για ανασκόπηση βλ. Shorter and Lindquist, 2005), τα prions μπορούν να λειτουργήσουν ως μηχανισμός επιγενετικής μνήμης προσφέροντας εξελικτικό πλεονέκτημα σε κάποια από τα άτομα ενός πληθυσμού σε μεταβαλλόμενο περιβάλλον (True and Lindquist, 2000) (Shorter and Lindquist, 2005). Αν η σύνδεση των HSPs με τα prions είναι πράγματι τόσο ισχυρή τότε είναι εύλογο να μελετηθεί και η έκφραση των HSPs που προαναφέρθηκαν, για να εντοπιστεί πιθανή ενδοπληθυσμιακή ετερογένεια, σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα.



Εικόνα 5. Το prion [PSI⁺] μπορεί να εξαπλωθεί στον πληθυσμό στην περιβαλλοντική κατάσταση B, αλλά στην περιβαλλοντική κατάσταση A, ευνοείται η εξάπλωση των [psi⁻] κυττάρων. Έτσι ισογενή κύτταρα έχουν διαφορετικές πιθανότητες επιβίωσης σε διαφορετικά περιβάλλοντα (από (Shorter and Lindquist, 2005)).

Αν και υπάρχει πληθώρα μελετών για το μηχανισμό δράσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, δεν υπάρχουν αναφορές για τον τρόπο που οι πρωτεΐνες αυτές

“συμπεριφέρονται” σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου και σε επίπεδο πληθυσμού. Πώς συμπεριφέρονται μεταγραφικά τα γονίδια αυτά στο στρες; Είναι κοινή η απόκριση των κυττάρων ενός πληθυσμού (όσον αφορά στη μεταγραφή των γονιδίων HSPs) σε διαφορετικά είδη σοκ ή κοινή; Μήπως το φαινόμενο της θερμοανθεκτικότητας (thermotolerance) που αναφέρθηκε παραπάνω μπορεί να εξηγηθεί με την ύπαρξη κάποιου μηχανισμού κυτταρικής μνήμης; Μήπως δηλαδή κύτταρα που έχουν υποστεί ένα αρχικό μη θανατηφόρο σοκ, “θυμούνται” αυτή την αρχική εμπειρία και όταν έρθουν ξανά σε επαφή με το ερέθισμα, ενεργοποιούν ταχύτατα κατάλληλους μηχανισμούς ώστε να αποκριθούν με επιτυχία; Μπορεί να υποθεθεί ότι αυτή η κυτταρική μνήμη είναι ουσιαστικά μεταγραφική μνήμη των *HSP* γονιδίων, καθώς μια διαφορετική μεταγραφική συμπεριφορά μεταξύ πρώτης και δεύτερης αντίδρασης στο σοκ μπορεί να εξηγεί γιατί πχ. τα ποσά HSP είναι πολύ διαφορετικά εντός του κυττάρου στις δύο περιπτώσεις και άρα γιατί η βιωσιμότητα των κυττάρων εμφανίζεται διαφορετική. Τέλος, μήπως η ασύμμετρη κατανομή οξειδωμένων πρωτεϊνών μεταξύ μητρικών και θυγατρικών κυττάρων με εμπλοκή των HSPs, υποδηλώνει και κάποια ασύμμετρη κατανομή των HSPs (βλ. και νωρίτερα στην εισαγωγή); Μήπως η εμπλοκή των HSPs στην εξάπλωση και κληρονόμηση των prions υποδηλώνει και πάλι ασύμμετρη κατανομή των HSPs; Γενικότερα, πώς κληρονομούνται οι HSPs, υπάρχει κάποια ιδιαιτερότητα στην κληρονόμησή τους; Και αν ναι ποιά θα μπορούσε να ‘ναι η εξελικτική σημασία της ιδιαιτερότητας αυτής;

2. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Μπορεί λοιπόν, ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας, να συνοψιστεί στα εξής ερωτήματα:

- Υπάρχει κάποιος μηχανισμός “μνήμης” που να χαρακτηρίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των βασικών στοιχείων της “μηχανής ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών” που περιγράφηκε;
- Σε τι είδη στρες αποκρίνεται η μηχανή; Αποκρίνεται με τον ίδιο τρόπο σε αυτούς τους τύπους στρες;
- Ποιός είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών αυτών σε συνθήκες σοκ ή μή; Πώς κληρονομούνται στα θυγατρικά κύτταρα αν υποτεθεί ότι τα τελευταία δεν υπόκεινται στο στρες που έχουν υποστεί τα μητρικά;
- Εμφανίζεται κάποιο είδος ετερογένειας εντός ενός πληθυσμού όσον αφορά στην έκφραση γονιδίων πρωτεϊνών θερμικού στρες, στις ίδιες συνθήκες; Αν ναι, ποιά θα μπορούσε να είναι η προέλευση και φύση της ετερογένειας αυτής; Θα μπορούσε η ετερογένεια αυτή να έχει μια ιδιαίτερη εξελικτική σημασία;

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

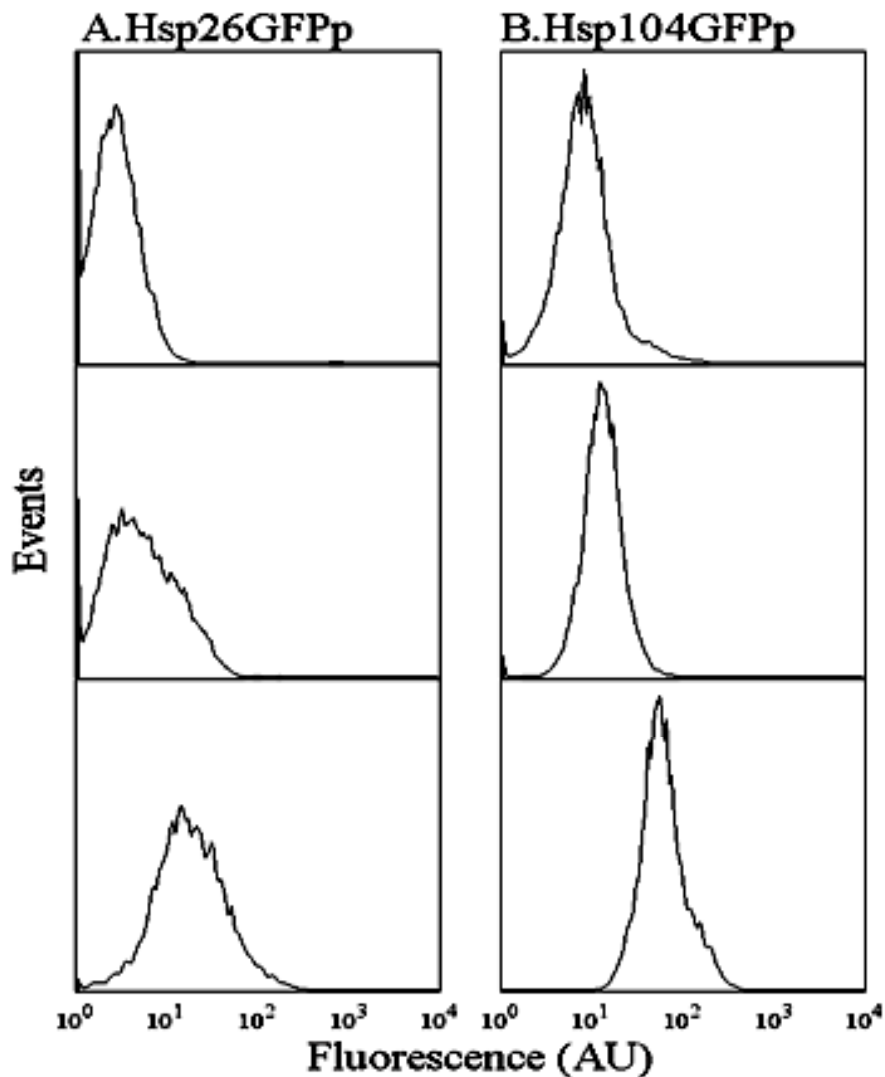
3.1 Ανάλυση της μεταγραφής γονιδίων των HSPs, σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου (single-cell level) στο ζυμομύκητα *S.cerevisiae*

Αρχικά θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων κατά το θερμικό σοκ αλλά και άλλες συνθήκες όπως για παράδειγμα η απώλεια θρεπτικών, η εισαγωγή της καλλιέργειας στη στατική φάση κτλ. Για τη δοκιμή αυτή, χρησιμοποιώντας το αγρίου τύπου στέλεχος FT5 (βλέπε σχετικό πίνακα στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι) και με χρήση της μεθόδου που περιγράφεται στην παράγραφο 4.5.4 (Sheff and Thorn, 2004), δημιουργήσαμε υβριδικά γονίδια *HSP26-GFP*, *HSP104-GFP*, *HSP42-GFP*, με τα οποία αντικαταστήσαμε τα αγρίου τύπου γονίδια στις φυσικές τους θέσεις και με εκμεταλλευόμενοι τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Η επιτυχής ολοκλήρωση της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με colony PCR.

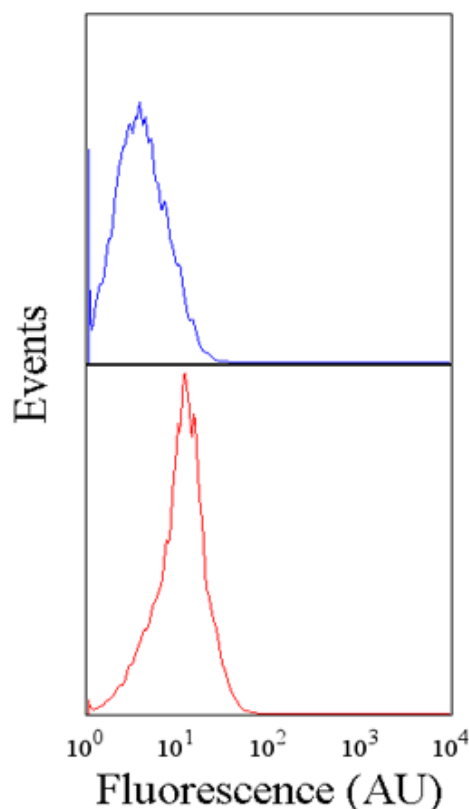
Η εν λόγω μελέτη επιβεβαιώνει πως οι υβριδικές πρωτεΐνες θερμικού σοκ συμπεριφέρονται σε επίπεδο μεταγραφικό όπως ακριβώς και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες αγρίου τύπου, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη της μεταγραφής σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής καθώς και μικροσκοπίας. Οι καμπύλες που προέκυψαν από πειράματα κυτταρομετρίας ροής για την επαγωγή γονιδίων HSPs λόγω απώλειας γλυκόζης από το μέσο, αλλά και κατά το θερμικό σοκ παρουσιάζονται στην εικόνα 6 και στην εικόνα 8 αντίστοιχα.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τις εικόνες αυτές η Hsp26GFPp δεν ανιχνεύεται όταν η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30°C και εκθετικά. Ωστόσο είτε παρουσία φτωχού σε γλυκόζη μέσου (0.05% γλυκόζη) (εικ.6A), είτε εξαιτίας θερμικού σοκ (30°C→39°C για 1h30m) (εικ.8A), η αύξηση των επιπέδων της υβριδικής πρωτεΐνης είναι πολύ μεγάλη. Το θερμικό σοκ μάλιστα έχει ως αποτέλεσμα μια ταχύτατη μεταγραφή του γονιδίου και τελικά επίπεδα πρωτεΐνης 40X σε σχέση με τα αρχικά. Στην περίπτωση της Hsp104p η μεταβολή στα επίπεδα της πρωτεΐνης δεν είναι τόσο ταχεία αλλά ούτε και τόσο δραματική καθώς τα τελικά επίπεδα είναι μόλις 4X σε σχέση με τα αρχικά και στις δύο περιπτώσεις σοκ που προαναφέρθηκαν (εικ.6B και 8B αντίστοιχα). Τα επίπεδα της Hsp42p είναι πολύ χαμηλότερα από αυτά της

Hsp104GFPp και φυσικά της Hsp26GFPp , μετά από θερμικό στρες (βλ εικ. 7 και 9) αλλά και κατά την απώλεια γλυκόζης από το μέσο (τα δεδομένα δε φαίνονται καθώς η επαγωγή της Hsp42p, είναι πολύ μικρή όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε 0.05% γλυκόζη).



Εικόνα 6. Η επαγωγή των γονιδίων HSP26 και HSP104 μετρημένη με βάση την ποσότητα υβριδικής με GFP πρωτεΐνης που παράγεται κατά τη μεταφορά των κυττάρων από πλούσιο (2% γλυκόζη) σε φτωχό σε γλυκόζη μέσο (0.05%) για 0h (1η σειρά), 2h (2η σειρά), 4h (3η σειρά). Για την απομάκρυνση της γλυκόζης κατά τη μεταφορά των κυττάρων από το πλούσιο στο φτωχό μέσο γίνεται γρήγορο ξέπλυμα με H₂O



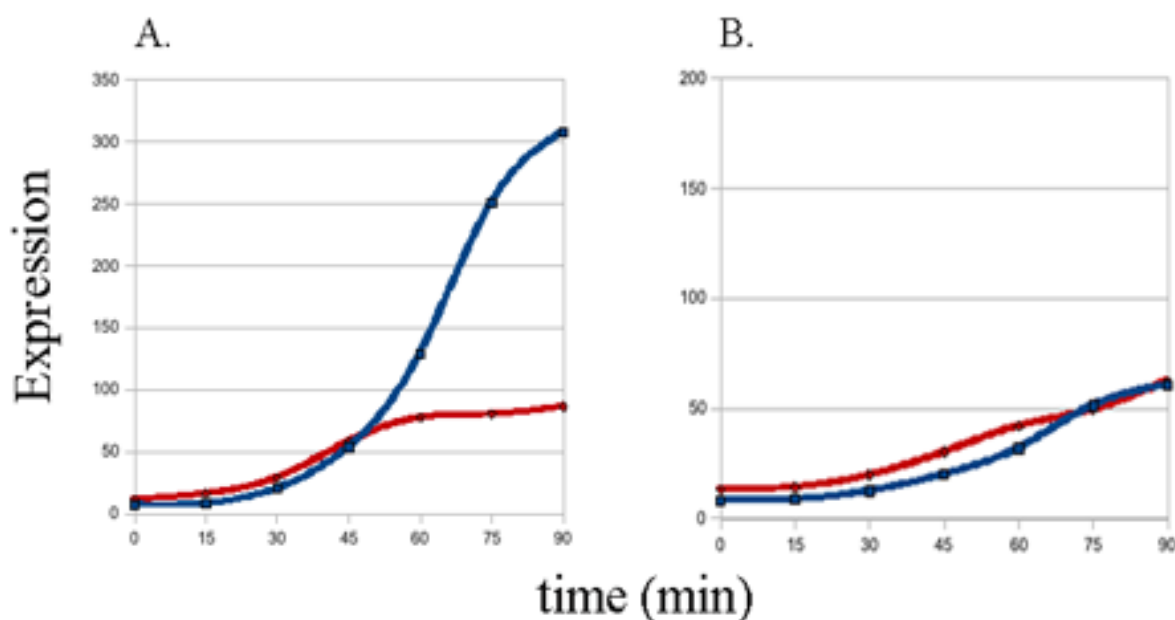
Εικόνα 7. Επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου *HSP42* κατά το θερμικό σοκ (30°C, μπλε καμπύλη, 39°C, 1h30min, κόκκινη καμπύλη), όπως προκύπτει από μέτρηση των επιπέδων Hsp42GFPp

3.2 Η μεταγραφή των γονιδίων *HSP104*, *HSP26* και *HSP42* δεν εμφανίζει μεταγραφική μνήμη.

Εμπνεόμενοι από προηγούμενες παρατηρήσεις ύπαρξης μεταγραφικής μνήμης όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του καταβολισμού της γαλακτόζης όπου αποδείχτηκε πρόσφατα ότι υπεύθυνο για τη διαφορετικό μεταγραφικό ρυθμό των γονιδίων *GAL*, μεταξύ κυττάρων που έχουν βρεθεί ήδη σε περιβάλλον με γαλακτόζη πριν βρεθούν κ πάλι σε αυτό και αυτών που αναπτύχθηκαν αποκλειστικά σε γλυκόζη και βρίσκονται σε γαλακτόζη για πρώτη φορά, είναι το ένζυμο Gal1p (Zacharioudakis *et al.*, 2007), θελήσαμε να εξετάσουμε την ύπαρξη κάποιου αντίστοιχου φαινομένου στην περίπτωση των HSP γονιδίων, χρησιμοποιώντας το θερμικό σοκ ως επαγωγέα της μεταγραφής. Αν ο ρυθμός μεταγραφής των εν λόγω γονιδίων μεταξύ πρώτης και δεύτερης έκθεσης τους στο θερμικό σοκ (κι αφού μεσολαβήσει μια χρονική περίοδος σε θερμοκρασία των 30°C για να επανέλθει η

έκφραση των γονιδίων αυτών στα αρχικά επίπεδα), είναι σημαντικά διαφορετικός, τότε μπορούμε να μιλήσουμε για ύπαρξη μνήμης στο σύστημα.

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 30°C ως OD≈0.2-0.3 και ακολούθησε μελέτη της κινητικής της μεταγραφής των γονιδίων *HSP104*, *HSP26* και *HSP42* στους 39°C για 1.5h. Μετά από παραμονή στους 30°C για 8h, ακολούθησε μια δεύτερη φάση επαγωγής της μεταγραφής και πάλι για 1.5h. Τα αποτελέσματα για τη συμπεριφορά των *HSP26-GFP* (A) και *HSP104-GFP* (B) παρουσιάζονται συνοπτικά στην εικόνα 8.

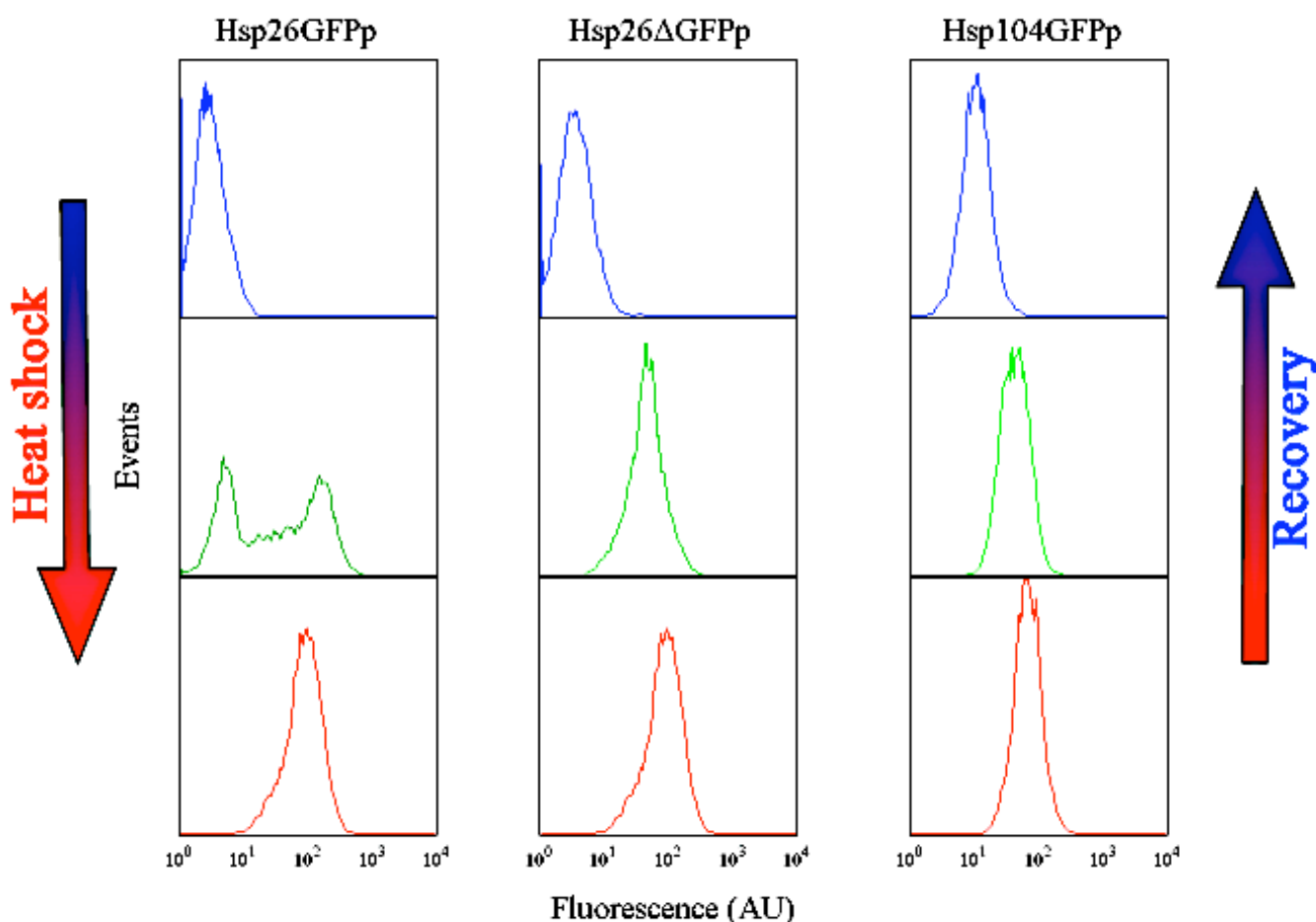


Εικόνα 8. Η κινητική της πρώτης (μπλε καμπύλη) και δεύτερης (κόκκινη καμπύλη) επαγωγής των *HSP26-GFP* (A) και *HSP104-GFP* (B) κατά τους αντίστοιχους κύκλους θερμικού σοκ (39°C, 1h30min)

Παρατηρώντας την κλίση των καμπυλών κατά την πρώτη (μπλε καμπύλη) και δεύτερη επαγωγή (κόκκινη καμπύλη) δεν υπάρχει ουσιαστική μεταβολή κινητικής, για τα πρώτα 45min της δεύτερης επαγωγής, στην περίπτωση της *HSP26-GFP* και καθόλη τη διάρκεια της επαγωγής στην περίπτωση της *HSP104-GFP*. Αν υπήρχε μνήμη, η δεύτερη επαγωγή θα διέφερε από πολύ νωρίς, σε ρυθμό, από την πρώτη. Άρα τουλάχιστον στην περίπτωση των δύο αυτών γονιδίων δεν υπάρχει μεταγραφική μνήμη. Όσον αφορά στη συμπεριφορά της Hsp42p, η επαγωγή της παρουσία

θερμικού σοκ είναι πολύ μικρή και τα επίπεδα της υβριδικής πρωτεΐνης καθόλη τη διαδικασία που προαναφέρθηκε σχεδόν αμετάβλητα. Γι' αυτό δεν παριστάνεται και γραφικά εδώ. Το μόνο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα είναι το γεγονός ότι τα τελικά επίπεδα πρωτεΐνης στην περίπτωση της δεύτερης επαγωγής, για την Hsp26p είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με αυτά της πρώτης επαγωγής.

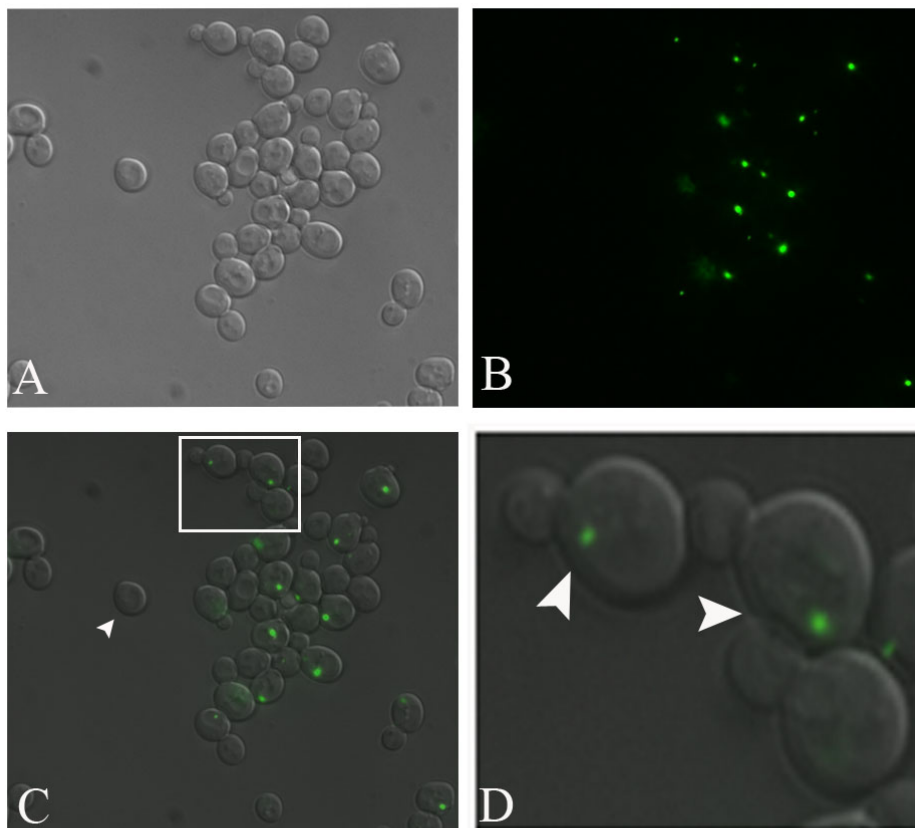
3.3 Η υβριδική πρωτεΐνη Hsp26GFPp διαιρείται ασύμμετρα, καθώς παραμένει αποκλειστικά στα μητρικά κύτταρα



Εικόνα 9. Κατανομή σε επίπεδο πληθυσμού της Hsp26GFP, Hsp26 promoter driven GFP και της Hsp104p πριν (μπλε) και μετά το θερμικό σοκ (κόκκινο) καθώς και μετά το θερμικό σοκ και μεταφορά στους 30°C για 2h (recovery).

Παρατηρώντας σε επίπεδο πληθυσμού την έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών Hsp26GFPp, Hsp104GFPp και Hsp42GFPp, διαπιστώσαμε κάτι ιδιαίτερα ενδιαφέρον όσον αφορά στη συμπεριφορά της Hsp26GFPp έναντι των άλλων. Στη φάση της επαναφοράς στους 30°C (2h 30°C), μετά την παραμονή στους 39°C

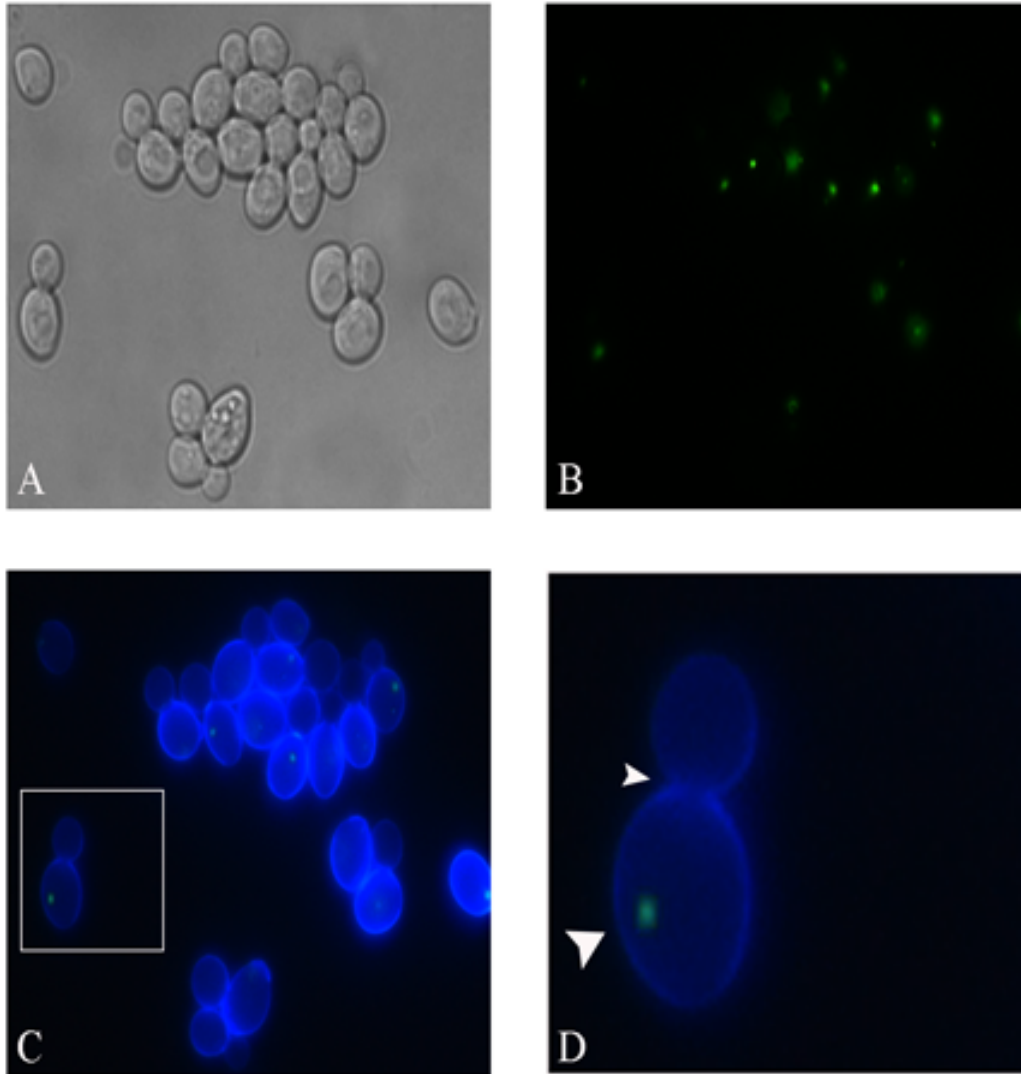
1h30min, η ποσότητα της Hsp26GFPp μειώνεται βέβαια αλλά όχι ομοιογενώς για όλα τα κύτταρα όπως συμβαίνει στην περίπτωση της Hsp104GFPp (βλ. εικ. 9 πράσινο γράφημα για Hsp26GFPp και το αντίστοιχο για Hsp104GFPp). Δημιουργώντας ένα στέλεχος όπου έγινε αφαίρεση της κωδικής περιοχής του γονιδίου *HSP26* και τοποθετώντας στη θέση του την κωδική περιοχή της GFP, έτσι ώστε η τελευταία να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του φυσικού Hsp104 υποκινητή (FT5/*HSP26::HSP26pr-GFP*) (βλ. (Sheff and Thorn, 2004) και λίστα εκκινητών στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι), διαπιστώσαμε ότι ο ιδιαίτερος αυτός τρόπος κατανομής της πρωτεΐνης Hsp26GFPp είναι ειδικός γι' αυτή και όχι για GFP εκφραζόμενη από τον ίδιο υποκινητή (βλ. εικ.9 και πράσινο γράφημα για Hsp104GFPp και Hsp104ΔGFPp).



Εικόνα 10. Η Hsp26GFPp συσσωρεύεται σε ένα σημείο στο μητρικό κύτταρο, με μορφή κηλίδας (spot) και δεν κληρονομείται στο θυγατρικό κύτταρο

Ακολούθησε μικροσκοπική εξέταση του εν λόγω φαινομένου με μικροσκοπία φθορισμού και διαπιστώθηκε το γεγονός ότι μια εκθετική καλλιέργεια κυττάρων FT5/HSP26::*HSP26pr-GFP*, μετά από μεταφορά από τους 30°C στους 39°C και παραμονή στη θερμοκρασία αυτή για κατάλληλο χρονικό διάστημα (πχ. 1h30min), εμφανίζεται με τη συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων της να διαθέτουν φθορίζουσα Hsp26GFPp συσσωρευμένη σε ένα σημείο στο μητρικό πάντα κύτταρο. Μετά δε από μεταφορά της εν λόγω καλλιέργειας στους 30°C και για χρονικό διάστημα που επιτρέπει σχεδόν μια διαίρεση, λαμβάνεται η εικόνα 10, όπου μπορεί κανείς να διακρίνει τόσο κύτταρα ελεύθερα από κηλίδα, τα οποία είναι κατά πάσα πιθανότητα θυγατρικά μετά τη διαίρεση (Εικόνα 10C, βλ βέλος), όσο και κύτταρα μητρικά που παραμένουν ακόμα ενωμένα με τα αντίστοιχα θυγατρικά, αλλά με τη φθορίζουσα κηλίδα (spot) να παραμένει πάντα στο μητρικό κύτταρο (βλ. κύτταρα εντός πλαισίου στην εικόνα 10C και τη μεγέθυνση της περιοχής αυτής στην εικόνα 10D. Τα βέλη στη 10D δείχνουν την παραμονή της φθορίζουσας κηλίδας στο μητρικό κύτταρο).

Η παραμονή της Hsp26GFPp αποκλειστικά στο μητρικό κύτταρο επιβεβαιώθηκε και με βαφή με calcofluor (fluorescent brightener 28) (βλ. Υλικά - Μέθοδοι (Pringle et al., 1989)), χάρη στην ικανότητα του calcofluor να συσσωρεύεται περισσότερο σε περιοχές όπου είναι έντονη η παρουσία χιτίνης, όπως πχ. στο δακτύλιο που δημιουργείται στην περιοχή εμφάνισης του θυγατρικού κυττάρου (bud). Αυτό φαίνεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Χρώση με calcofluor για τον εντοπισμό του σημείου δημιουργίας και αποκοπής του θυγατρικού κυττάρου (μικρό βέλος). Η Hsp26GFPp παραμένει αποκλειστικά στο μητρικό (μεγάλο βέλος)

3.4 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού της φθορίζουσας κηλίδας της Hsp26p

Η συσσώρευση της Hsp26GFPp με τη μορφή κηλίδας στο μητρικό και μόνο κύτταρο μας οδήγησε στην αναζήτηση του υποκυτταρικού εντοπισμού της κηλίδας αυτής. Με βάση προηγούμενη αναφορά, αναμενόταν μεταβολή της θέσης της Hsp26p από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα σε περίπτωση που η καλλιέργεια

δεχόταν θερμικό σοκ όντας στην εκθετική φάση {Rossi 1989}. Έτσι χρησιμοποιήσαμε DAPI (με βάση το πρωτόκολλο του Douglas E. Koshland, Carnegie Institution, USA, ελαφρώς τροποποιημένο (βλ. ενότητα Υλικά-Μέθοδοι)) για να “βάψουμε” τον πυρήνα και να ανιχνεύσουμε τη θέση της κηλίδας πριν και μετά το θερμικό σοκ. Ωστόσο σε καμιά περίπτωση η κηλίδα δεν εντοπίστηκε ενδοπυρηνικά.

3.5 Έλεγχος της δράσης της Hsp26p *in vivo*, μέσω της ικανότητας της Hsp26GFPp να δεσμεύει μη κατάλληλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και να αποτρέπει τη δημιουργία μη λειτουργικών συσσωματωμάτων

Όπως είδαμε στο θεωρητικό μέρος υπάρχουν πολλές αναφορές όπου περιγράφεται ο ρόλος της Hsp26p ως πρωτεΐνης που μετέχει στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά του σοκ, δεσμεύοντας πρωτεΐνες-υποστρώματα που δεν έχουν αποκτήσει την τελική διαμόρφωσή τους στο χώρο αλλά παραμένουν “μη αναδιπλωμένες” (unfolded), αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη δημιουργία μη λειτουργικών μεγαλομοριακών συσσωματωμάτων.

Τα πειράματα αυτά όμως έγιναν *in vitro*. Με χρήση ενός στελέχους όπου μια πρωτεΐνη, η Ubc9^{ts} εμφανίζει θερμοευαισθησία και δεν αναδιπλώνεται κατάλληλα σε θερμοκρασίας μεγαλύτερες των 30°C {Betting 1996} (αναλυτικά στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι), προσπαθήσαμε να μελετήσουμε αν *in vivo* η συμπεριφορά της Hsp26p είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται *in vitro*.

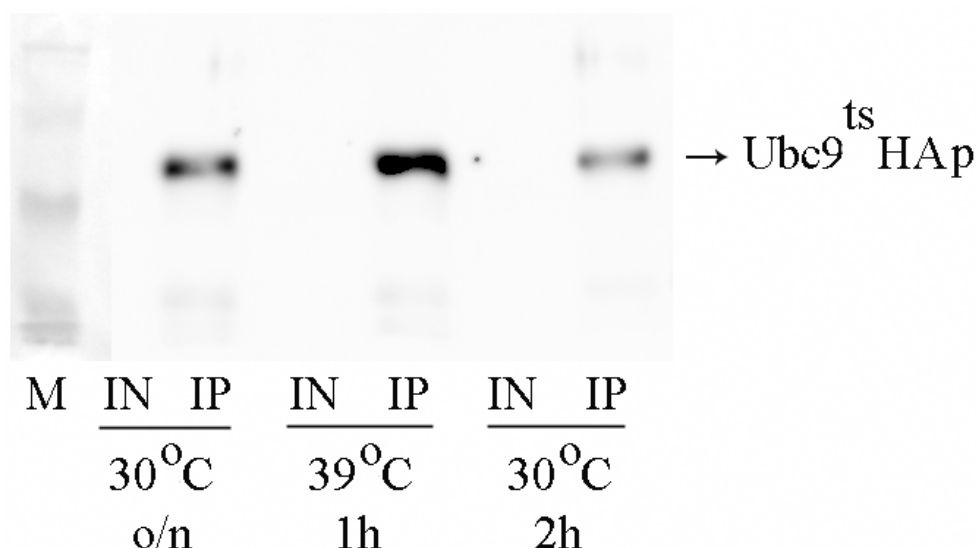
Στο στέλεχος με τη θερμοευαίσθητη Ubc9^{ts} έγινε αντικατάσταση του γονιδίου *HSP26* με *HSP26GFP*. Η αύξηση της θερμοκρασίας από 30°C σε 39°C είχε ως αποτέλεσμα τόσο την παραγωγή της Hsp26GFPp σε μεγάλες ποσότητες όσο και την αποδιάταξη της Ubc9^{ts}, με αποτέλεσμα να τείνει η τελευταία να δημιουργεί συσσωματώματα. Αν η Hsp26p έχει και *in vivo* τη δράση που περιγράφεται για αυτή με βάση *in vitro* πειράματα, οφείλει να δεσμεύει Ubc9^{ts}, όταν η θερμοκρασία είναι υψηλή και στη συνέχεια και αν η θερμοκρασία το επιτρέπει να απελευθερώνει τη

δεσμευμένη Ubr9^{ts}, η οποία χάρη στις Hsp104, Hsp70 και Hsp40, θα ανακτήσει την αρχική της δομή και λειτουργία.

Έτσι έγινε ανοσοκατακρήμνιση της Hsp26GFPp, χρησιμοποιώντας anti-GFP αντίσωμα (βλ Υλικά-Μέθοδοι), και ακολούθησε Western blot για ανίχνευση της Ubr9^{ts}p στο ανοσοκατακρημισμένο υλικό. Η ανίχνευση της Ubr9^{ts}p με Western blot, έγινε εύκολα χάρη στη συνέκφρασή της με HA επίτοπο.

Πάρθηκαν τρία δείγματα, ένα στους 30°C και πριν το θερμικό σοκ, ένα μετά το θερμικό σοκ κι ένα αφού επιτράπηκε στα κύτταρα να επανέλθουν στους 30°C για 2 ώρες.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ανοσοαποτύπωμα Western για την ανίχνευση Ubr9^{ts}, μετά την ανοσοκατακρήμνιση Hsp26GFP, στους 30°C, μετά από θερμικό σοκ στους 39°C για 1h και στους 30°C δύο ώρες μετά το θερμικό σοκ

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι για κάθε IP χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων και με βάση την εικόνα 12, φαίνεται εκ πρώτης όψεως η Hsp26GFPp να δεσμεύει Ubr9^{ts}p κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ, ενώ κατά τη φάση “ανάρρωσης” (recovery), η Ubr9^{ts}p, απελευθερώνεται και πάλι (το ποσό δεσμευμένης Ubr9^{ts}HAp είναι στην περίπτωση αυτή αντίστοιχο του background,

καθώς στους 30°C η Hsp26p δεν εκφράζεται και άρα η ποσότητα Ubp9^{ts}HAp, που κατακρημνίζεται θεωρείται background).

3.6 Αναζήτηση ύπαρξης κάποιας φυσιολογικής σημασίας που να σχετίζεται με την άνιση κατανομή της Hsp26p

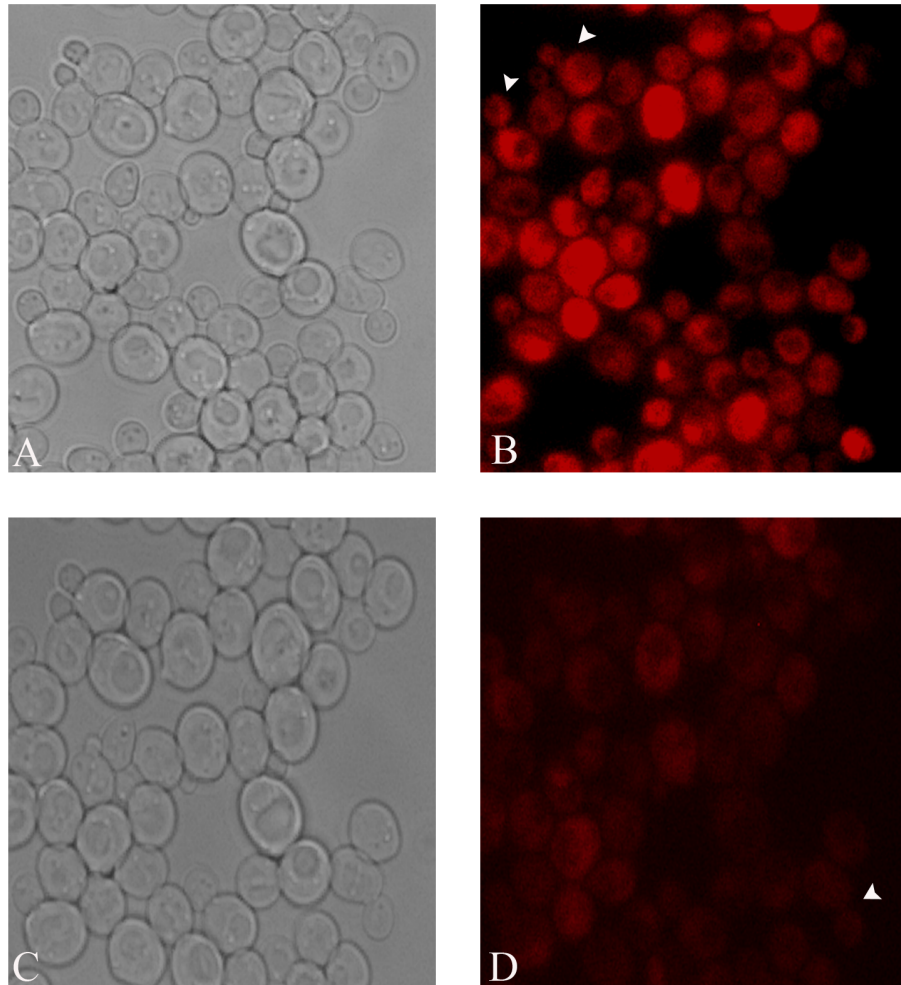
Η Hsp26p όπως συζητήθηκε διεξοδικά στο θεωρητικό μέρος αποτελεί μια πρωτεΐνη της οποίας η έλλειψη δεν έχει συνδεθεί με κάποιο φαινότυπο ή με κάποια διαφορά στη βιωσιμότητα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό την αναζήτηση κάποιου ιδιαίτερου φαινοτύπου ή μειωμένης βιωσιμότητας των μεταλλαγμάτων που δεν έφεραν την Hsp26p, έναντι κυττάρων αγρίου τύπου. Κανένα όμως από τα πειράματα αυτά δεν αποκάλυψε κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο ή διαφορά επιβίωσης. Συνοπτικά επιχειρήθηκαν τα εξής:

1. Εμπλουτισμός του πληθυσμού σε γηρασμένα κύτταρα κάνοντας διαδοχικά streakings (serial streakings) και σύγκριση επιβίωσης κυττάρων που φέρουν Hsp26p έναντι μεταλλαγμένων που δεν έχουν.
4. Έλεγχος επιβίωσης των κυττάρων αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων σε θερμικό στρες σε ποικίλες θερμοκρασίες. Έγινε και έλεγχος σε ένα δεύτερο θερμικό στρες μετά το πρώτο. Καμιά απολύτως διαφορά σε επιβίωση ή θερμοανθεκτικότητα (thermotolerance).
5. Με βάση την πιθανή αλληλεπίδραση της Hsp26p με το βιοσυνθετικό ένζυμο στερολών Urc2p (www.yeastgenome.org), ελέγχθηκε η διαφορά επιβίωσης των στελεχών W303 (αγρίου τύπου), W303/*urc2Δ*, W303/*tup1Δ*, W303/*tup1Δ*, *urc2Δ*, που είτε είχαν λειτουργική Hsp26p είτε όχι, παρουσία κετοκοναζόλης. Η κετοκοναζόλη παρεμποδίζει τη σύνθεση των στερολών. Αν η αλληλεπίδραση Hsp26p και Urc2p ήταν απαραίτητη για τη βιοσύνθεση στερολών, τα κύτταρα με

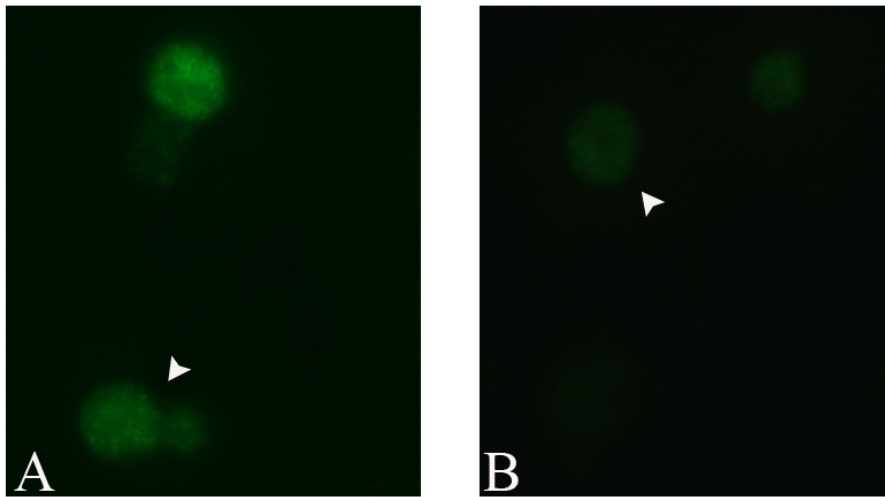
λειτουργική Hsp26 και λειτουργική Urc9p θα εμφάνιζαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις κετοκοναζόλης, έναντι των W303/*urc2Δ*. Επίσης το ίδιο θα συνέβαινε και με τα κύτταρα W303/*hsp26Δ* με φυσιολογική Urc2p. Ωστόσο κάτι τέτοιο δε συνέβη. Τη μόνη μειωμένη βιωσιμότητα εμφάνισαν τα W303/*tup1Δ*, *urc2Δ* κύτταρα.

3.7 Η άνιση κατανομή παρατηρείται μόνο στην περίπτωση της υβριδικής Hsp26GFPp και όχι της Hsp26.

Επαναλαμβάνοντας τα πειράματα που έγιναν με χρήση του στελέχους FT5/*HSP26::HSP26pr-GFP*, με στελέχη ίδιου γενετικού υποβάθρου στα οποία όμως η Hsp26p ήταν υβριδική είτε με mCherry (Shaner et al., 2004) (βλ. υλικά και μέθοδοι για τρόπο δημιουργίας) είτε έφερε HA επίτοπο (3HA) (Janke et al., 2004) και ανιχνεύοντας τον υποκυτταρικό εντοπισμό στις διάφορες συνθήκες, είτε με μικροσκοπία φθορισμού, είτε με ανοσοϊστοχημεία αντίστοιχα (βλ. υλικά-μέθοδοι), διαπιστώσαμε πως η ιδιαίτερη συμπεριφορά και η άνιση κατανομή που παρατηρούνταν στην περίπτωση της Hsp26GFPp, δεν παρατηρούνταν σε καμιά από τις περιπτώσεις αυτές (βλ. εικόνες 13 και 14)



Εικόνα 13. (A,B) Φάση σοκ: κληρονόμηση της Hsp26mCherry και σε θυγατρικό (C,D) Φάση “ανάρρωσης” σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης που εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα



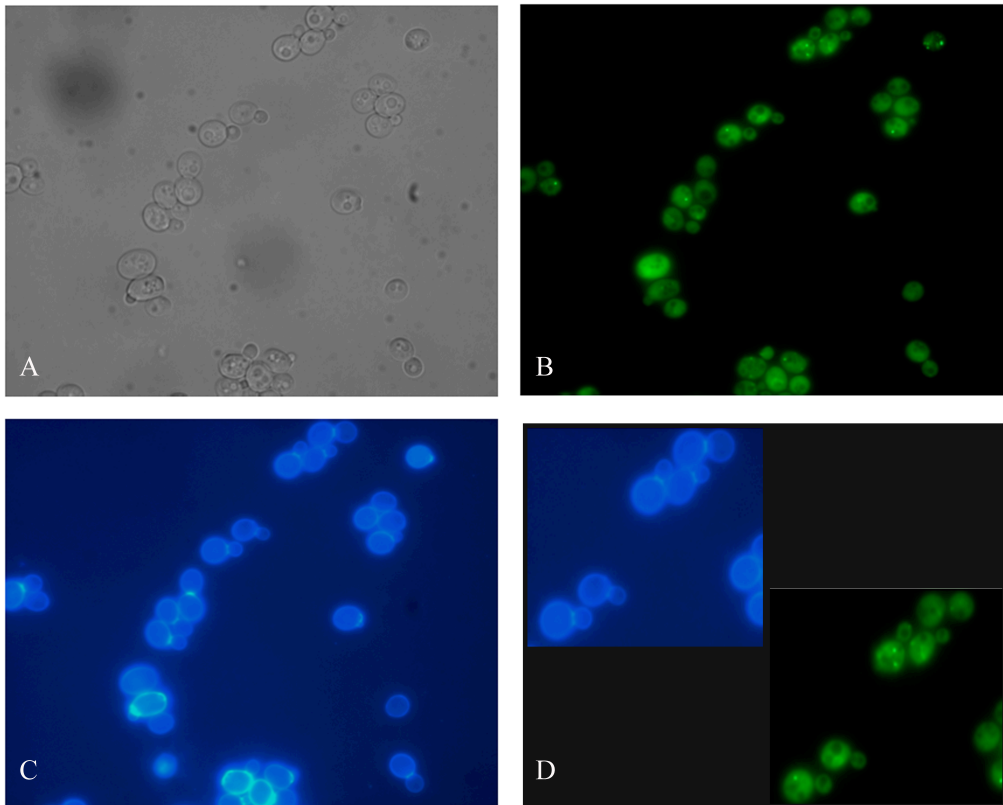
Εικόνα 14. Ανίχνευση της Hsp26HA ανοσοϊστοχημεία:

A) Φάση θερμικού σοκ. Η πρωτεΐνη κληρονομείται και στο θυγατρικό κύτταρο

B) Φάση “ανάρρωσης” Τα επίπεδα Hsp26p μειώνονται σημαντικά

3.8 Έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός της Hsp104p σε συνθήκες στρες

Παράλληλα με την ανάλυση της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού της Hsp26GFPp, που μας οδήγησε όπως είδαμε στο παραπλανητικό συμπέρασμα ότι η Hsp26p κατανέμεται ασύμμετρα μεταξύ μητρικών και θυγατρικών κυττάρων, εξετάσαμε την έκφραση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πολύ σημαντικής σε ρόλο (βλ.θεωρητικό μέρος) πρωτεΐνης θερμικού σοκ Hsp104p. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα με Hsp104GFPp και αυτά με Hsp104mCherry, έδωσαν ακριβώς την ίδια εικόνα κάτι που σημαίνει πως η δημιουργία υβριδικής GFP πρωτεΐνης δεν προκάλεσε καμιά απολύτως αλλοίωση στον υποκυτταρικό εντοπισμό της Hsp104p, όπως συνέβη με την Hsp26p. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικόνα 15. Η Hsp104p εκφράζεται ομοιογενώς απλά εμφανίζονται κάποιες περιοχές και πάλι στα μητρικά κύτταρα με έντονη τοπική παρουσία Hsp104p (μικρές πράσινες κηλίδες)

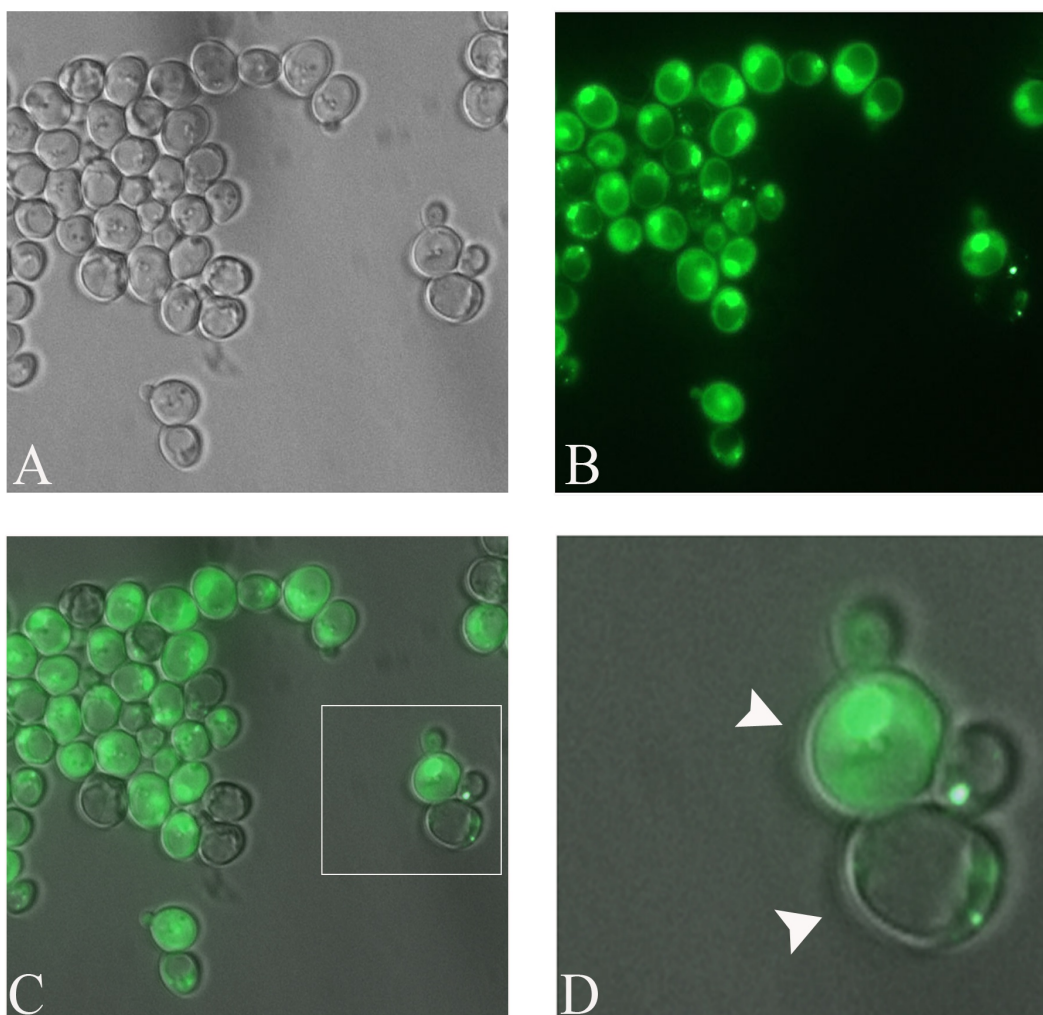
Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι πριν αποκαλυφθεί ότι η συσσώρευση Hsp26p σε μορφή κηλίδας στο μητρικό κύτταρο, δεν ήταν παρά μια ιδιότητα του υβριδίου Hsp26GFPp και όχι της πραγματικής Hsp26p, επιχειρήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία για πιθανό συνεντοπισμό των κηλίδων (spots) Hsp26GFPp και των αντίστοιχων Hsp104mCherry. Ωστόσο αυτό ποτέ δεν κατέστη δυνατό λόγω τεχνικών δυσκολιών (κανένα από τα συνεστιακά μικροσκόπια που ήταν διαθέσιμα, με τα υπάρχοντα φίλτρα τους, δεν ήταν κατάλληλο).

3.9 Η Hsp104p εκφράζεται ετερογενώς σε κύτταρα ζύμης που υπόκεινται σε ακραία μορφή στρες (μακροήμερη παραμονή σε νερό)

Αφού είδαμε την κατανομή της Hsp104p σε επίπεδο πληθυσμού, σε συνθήκες στρες όπως θερμικό σοκ και απώλεια ή χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, αναρωτηθήκαμε μήπως εμφανιζόταν κάποια ετερογένεια αν υποβάλαμε τα κύτταρα σε κάποια πραγματικά ακραία μορφή στρες όπως θα ήταν για παράδειγμα η μακρόχρονη παραμονή στο νερό. Η λογική βάση του ερωτήματος που θέσαμε είναι η εξής: η μακρόχρονη παραμονή στο νερό θα έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση φαινομένων όπως οξειδωτικό στρες και παράλληλα τη γήρανση των κυττάρων καθώς αυτά παραμένουν αδιαίρετα στο νερό και ο πληθυσμός δεν αποκτά νέα κύτταρα αλλά παραμένει με τα ίδια από τη στιγμή της μεταφοράς από το πλούσιο θρεπτικό μέσο στο νερό. Αν λοιπόν εμφανίζεται κάποια ετερογένεια ως προς την παρουσία της Hsp104p και πιθανά των πρωτεϊνών που μπορεί να βρίσκονται δεσμευμένες με αυτή (όπως οξειδωμένες πρωτεΐνες ή νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες που θα πρέπει να μη σχηματίσουν συσσωματώματα, ώστε να γίνουν και πάλι ενεργές αν οι συνθήκες το επιτρέψουν), μεταξύ των κυττάρων του πληθυσμού, το φαινόμενο θα είναι πιο έντονο εφόσον τα κύτταρα υποβληθούν στην ακραία αυτή μορφή στρες και έτσι πιθανά να γίνει αντιληπτό.

Έτσι μια καλλιέργεια FT5/*Hsp104GFP* με OD~0.8 η οποία αναπτύχθηκε σε πλούσιο θρεπτικό μέσο και 30°C, μεταφέρθηκε αρχικά στους 39°C για 1.5h και υπό κατάλληλες συνθήκες ανάδευσης, έτσι ώστε να εκφραστεί η Hsp104p και στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε καθαρό νερό από το οποίο απουσίαζαν παντελώς κάθε είδους θρεπτικά συστατικά. Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης της Hsp104p ανά ημέρα, τόσο με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού (βλ.εικόνα 18), όσο και με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) (βλ. ανάλυση και των δύο τεχνικών στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι). Στην περίπτωση της ανάλυσης με χρήση μικροσκοπίας, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν πριν την παρατήρηση σε YPD για 2 περίπου ώρες, για να εξακριβωθεί αν παρέμεναν ζωντανά (δημιουργία buds) και να δειχτεί αν υπήρχε κάποια συσχέτιση της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας (βλ. μικροσκοπία και FACS), με ασύμμετρη κατανομή της Hsp104p.

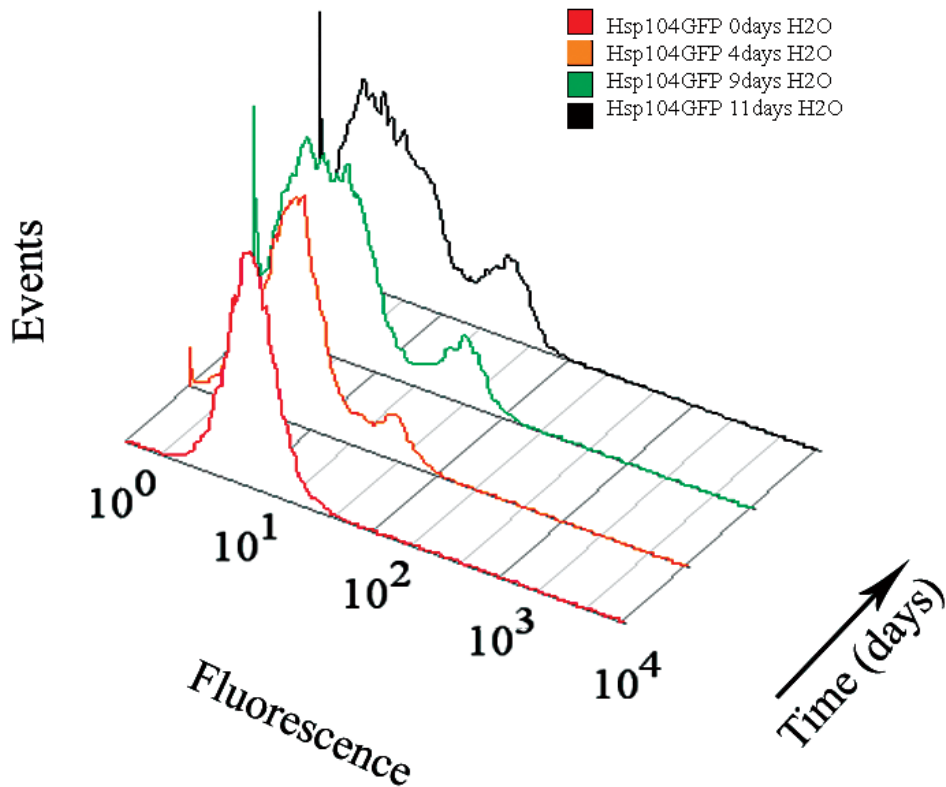
Το βασικό συμπέρασμα στο ποίο καταλήξαμε είναι το γεγονός ότι η Hsp104p εκφράζεται ετερογενώς στα κύτταρα του πληθυσμού, στο νερό, και μάλιστα υπάρχουν δύο και μόνο διακριτές καταστάσεις: έκφρασης “on” και μη έκφρασης “off”. Δηλαδή όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 που ακολουθεί, άλλα κύτταρα του πληθυσμού εκφράζουν Hsp104p και άλλα όχι. Σε αντίθεση με την Hsp104-GFP δεν παρατηρείται ασύμμετρη κατανομή Hsp104-GFPp μεταξύ μητρικού-θυγατρικού κυττάρου (βλ. επόμενη σελίδα).



Εικόνα 16. Η Hsp104p εκφράζεται ετερογενώς σε κύτταρα ζύμης, τα οποία έχουν παραμείνει για μέρες σε νερό και στερούνται θρεπτικών συστατικών. Μάλιστα η κατάσταση έκφρασης είναι “on and off” καθώς άλλα κύτταρα εκφράζουν Hsp104p, όπως φαίνεται από τα επίπεδα της Hsp104p, και άλλα όχι (εικόνα 16C και 16D)

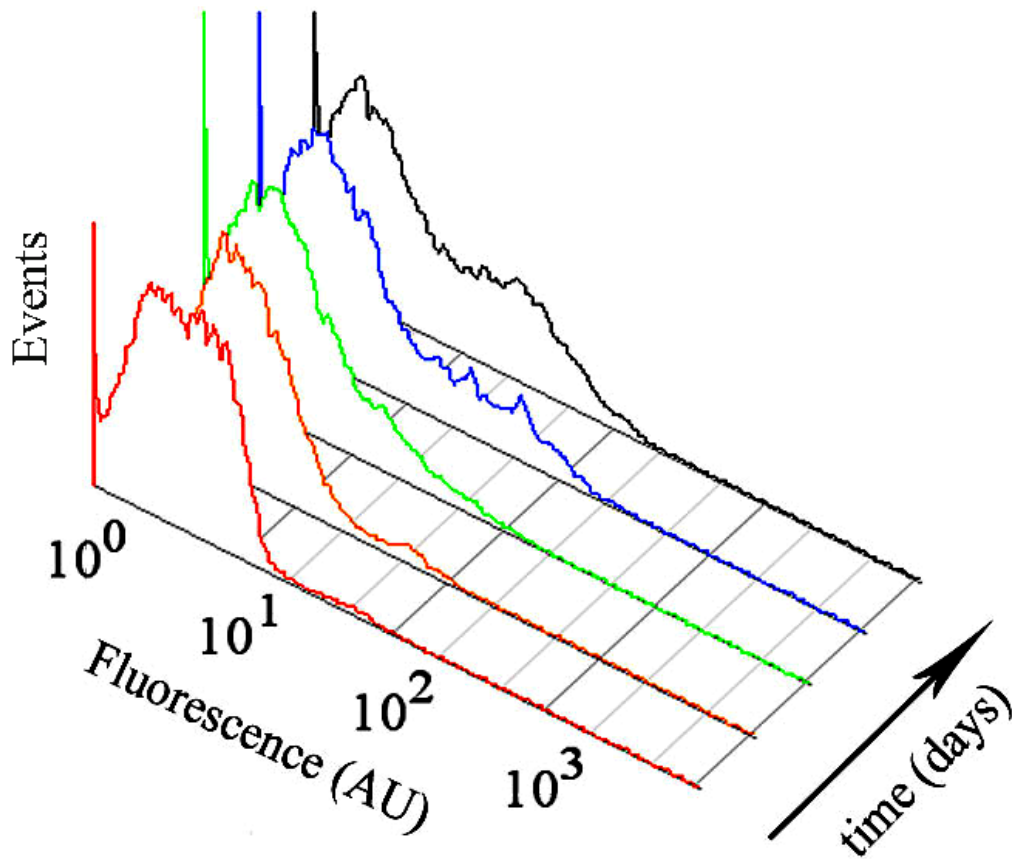
Τα κύτταρα παραμένουν αναμφισβήτητα ζωντανά στο νερό καθώς αν βρεθούν και πάλι σε πλούσιο μέσο διαιρούνται (όπως φαίνεται από τη δημιουργία buds στα κύτταρα της εικόνας 16A). Με μια πρώτη ματιά μάλιστα το αν ένα κύτταρο εκφράζει Hsp104p δε φαίνεται να σχετίζεται με το αν βρίσκεται στη φάση διαίρεσης ή όχι, καθώς κύτταρα που βρίσκονται σε ανάλογη φάση του κυτταρικού κύκλου, μπορεί να εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά ως προς την έκφραση της Hsp104p (εικόνα 16D)

Επιπλέον, παρόλο που γενικά αναφέρεται ότι στο νερό η σύνθεση νέων πρωτεϊνικών μορίων είναι μηδενική, στην περίπτωση της Hsp104p αυτό δεν ισχύει. Αυτό αποδείχτηκε παρακολουθώντας καθημερινά με κυτταρομετρία ροής την FT5/*HSP104GFP* καλλιέργεια στο νερό. Η διαδοχή των FACS καμπυλών για μηδέν (κόκκινη), τέσσερις (πορτοκαλί), εννιά (πράσινη) και έντεκα μέρες (μαύρη) στο νερό, παρουσιάζεται στην εικόνα 17. Χωρίς καμιά αμφιβολία φαίνεται να συντίθεται νέα Hsp104p, με το πέρασμα του χρόνου, η οποία όμως συντίθεται μόνο από έναν υποπληθυσμό και τα υπόλοιπα κύτταρα εμφανίζονται μηδενικά ως προς την έκφραση της Hsp104p. Την 11η μέρα στο νερό, ο υποπληθυσμός συνιστά το 10-15% του συνολικού πληθυσμού (μαύρη καμπύλη, εικόνα 17).



Εικόνα 17. FACS ανάλυση της έκφρασης της Hsp104GFPp στο νερό (0 μέρες: κόκκινη καμπύλη, 4 μέρες: πορτοκαλί καμπύλη, 9 μέρες: πράσινη καμπύλη, 11 μέρες: μαύρη καμπύλη).

Μετά μάλιστα από την απομόνωση του μηδενικού υποπληθυσμού της 11ης ημέρας με χρήση sorter (βλ. σχετική παράγραφο στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι) και της μεταφοράς του σε καθαρό νερό για τέσσερις ακόμα ημέρες, είναι φανερό πως ο εκφράζων υποπληθυσμός, τροφοδοτείται από τον μη εκφράζοντα, καθώς μέσα σε τέσσερις και μόνο ημέρες είναι υπολογίσιμο το κλάσμα του μη εκφράζοντος πληθυσμού που πλέον εκφράζει Hsp104p (εικ.18). Άρα είναι βέβαιο πως υπάρχει νέα σύνθεση Hsp104p, που οφείλεται είτε σε μεταγραφή και σύνθεση νέων mRNA μορίων, είτε μετάφραση προϋπαρχόντων mRNA μορίων, είτε και στα δύο.



Εικόνα 18. FACS ανάλυση για τον αρχικά μηδενικό υποπληθυσμό της 11μέρας σε νερό. Μέρα 0 (κόκκινη καμπύλη), Μέρα 1 (πορτοκαλί), Μέρα 2 (πράσινη), Μέρα 3 (μπλε), Μέρα 4 (μαύρη)

Έγινε προσπάθεια τα παραπάνω αποτελέσματα να επιβεβαιωθούν χρησιμοποιώντας Hsp104mCherryr έναντι της Hsp104GFPp αλλά δεν παρατηρείται στην περίπτωση αυτή η ετερογένεια στην έκφραση εντός του πληθυσμού, κάτι που ίσως να οφείλεται σε αυξημένη σταθερότητα της Hsp104mCherryr. Επίσης δημιουργήθηκε στέλεχος FT5/HSP104HA (βλ. στελέχη) και επιχειρήθηκε επιβεβαίωση του φαινομένου με ανοσοϊστοχημεία. Ωστόσο ο αριθμός των σφαιροπλαστών που μελετήθηκαν δεν ήταν επαρκής για να αποφανθεί κανείς αν υπάρχει πραγματικά εκφράζων πληθυσμός μετά την παραμονή όλων αυτών των ημερών (11 ημερών) στο νερό.

Μια ακόμα παρατήρηση κατά τη διάρκεια αυτής της σειράς πειραμάτων που αξίζει να αναφερθεί αν και δεν εμφάνισε επαναληψιμότητα, είναι ότι πιθανά το ποσοστό του εκφράζοντος πληθυσμού να εξαρτάται από την προϋστορία της καλλιέργειας όταν αυτή βρισκόταν στο πλούσιο μέσο. Αν η καλλιέργεια ήταν

εκθετική εμφάνιζε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό μη εκφραζόντων κυττάρων στο νερό, σε σχέση με μια καλλιέργεια που ήταν στη στατική φάση όταν μεταφέρθηκε στο νερό, ή είχε υποστεί ήδη θερμικό σοκ, πριν μεταφερθεί στο νερό.

3.10 Συζήτηση

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής έγινε μια προσπάθεια να μελετηθεί *in vivo* και σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου η έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός βασικών πρωτεϊνών του συστήματος “ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών” (protein quality control) στο ζυμομήκυτα *Saccharomyces cerevisiae*.

Ένα βασικό συμπέρασμα που μπορεί κανείς να αποκομίσει από αυτή την εργασία, είναι, όσο και αν φαίνεται παράξενο, το γεγονός ότι ένα φαινόμενο θα είναι καλό να επιβεβαιώνεται με δύο ή περισσότερους ανεξάρτητους μεταξύ τους τρόπους για να χαρακτηριστεί ως αληθινό. Όπως πιθανά να έγινε αντιληπτό, πολύς κόπος και σκέψη θυσιάστηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της δουλειάς, για την εξήγηση και το φυσιολογικό ή εξελικτικό ρόλο ενός φαινομένου που αποδείχτηκε ότι είναι ψευδές. Αναφέρομαι ασφαλώς στην ασύμμετρη κατανομή μεταξύ μητρικού και θυγατρικού κυττάρου, της Hsp26p, η οποία όπως αποδείχτηκε είναι χαρακτηριστική για την υβριδική Hsp26GFPp αλλά όχι και για την Hsp26p.

Είναι αποδεκτό και αποδεδειγμένο επί σειρά ετών πως η GFP (green fluorescent protein) αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την κυτταρική και μοριακή βιολογία καθώς επιτρέπει τον υποκυτταρικό εντοπισμό μορίων, τον έλεγχο έκφρασης κά, χωρίς να προκαλεί κάποια αλλαγή στη λειτουργία και τη φυσιολογική δράση των μορίων. Η μεγάλη σημασία του εν λόγω μορίου και της χρήσης του αποδεικνύεται και από το γεγονός της απονομής του φετινού βραβείου Νομπέλ Χημείας, σε τρεις από τους πρωτεργάτες της προσπάθειας για την επιτυχή χρήση της GFP στην κυτταρική και μοριακή βιολογία (Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien). Παρόλα αυτά αποδεικνύεται στην εργασία αυτή ότι ακόμα και ένα “μόριο που αξίζει Νομπέλ” (Nobel winning molecule) όπως χαρακτηρίστηκε μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικά και ψευδή αποτελέσματα. Η διαπίστωση αυτή είναι πιθανό να ακουστεί ακόμα περισσότερο τρομακτική αν αναλογιστεί κανείς ότι πολλά δεδομένα για υποκυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών, επίπεδα έκφρασης κτλ στηρίζονται κατά κύριο λόγο ή αποκλειστικά στη χρήση υβριδικών με GFP πρωτεϊνών. Ως χαρακτηριστικό παράδειγμα αναφέρω την ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών του *Saccharomyces cerevisiae* {Ghaemmaghani 2003} στην όποια

στηρίχθηκε και μια ολόκληρη βάση δεδομένων για τα επίπεδα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών στο *Saccharomyces cerevisiae* (<http://yeastgfp.ucsf.edu>).

Παρά την ατυχή αυτή συγκυρία, κάποια άλλα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Η “φαινοτυπική ποικιλομορφία” (phenotypic variation) που παρουσιάζει η έκφραση της Hsp104p για παράδειγμα, σε ακραίες συνθήκες στρες (μακρόχρονη παραμονή στο νερό), παρουσιάζεται εδώ πρώτη φορά και μπορεί να έχει ιδιαίτερο εξελικτικό ενδιαφέρον αν αναλογιστεί κανείς τις συνθήκες στις οποίες ζει ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae*. Είναι φανερό πως στη φύση τα κύτταρα της ζύμης μπορούν να υποστούν κάποια ακραία μορφή στρες όπως η απόλυτη έλλειψη θρεπτικών συστατικών, όπως πχ μετά από μια βροχή που θα συμπαρασύρει τα κύτταρα ζύμης από τα πλούσια σε σάκχαρα αμπέλια, στο φτωχό έδαφος. Δεδομένης της ύψιστης σημασίας της Hsp104p για την επιβίωση σε συνθήκες σοκ, αν ο εκφράζων υποπληθυσμός εκφράζει αρκετή Hsp104p, για να ανταπεξέλθει στο σοκ τότε σίγουρα εμφανίζει αυξημένες πιθανότητες επιβίωσης έναντι του μηδενικού σε έκφραση Hsp104p υποπληθυσμού. Νέα δεδομένα δείχνουν πως μια τυχαία αλλαγή στο φαινότυπο (phenotypic switching) μπορεί να λειτουργήσει επιτυχώς σαν στρατηγική επιβίωσης σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα {Acar 2008} {Raj 2008}. Θα μπορούσε λοιπόν και στην περίπτωση της Hsp104p, μιας πρωτεΐνης τόσο σημαντικής για την απόκριση σε συνθήκες σοκ, να έχει υιοθετηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης μια τέτοια στρατηγική επιβίωσης.

4. Υλικά-Μέθοδοι

4.1.1 Χημικά: τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρίες Sigma-Aldrich και τη Merck και FMC Bioproducts.

4.1.2 Ένζυμα: οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες Minotech και New England Biolabs. Για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα από τις εταιρίες Minotech, Promega (GoTaq pol sample), Finnzymes (EXT Taq polymerase free sample), Roche (FastStart PCR, free sample) και KapaBiosystems Kapa HiFi Taq (free sample)

4.1.3 Αντισώματα και υλικά ανοσοεντοπισμού: Το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA προήλθε από τη Santa Cruz Biotechnology (HA-probe (Y-11): sc805). Το ίδιο ισχύει και για το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του myc επιτόπου (sc789). Τα δευτερογενή αντισώματα anti-rabbit HRP που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση προήλθαν επίσης από τη Santa Cruz Biotechnology. Τα δευτερογενή αντισώματα Alexa488 goat anti-rabbit (A11008) και Alexa488 goat anti-mouse (A11001) προήλθαν από την εταιρία Molecular Probes (Invitrogen) και ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Δρ. Χρήστου Δελιδάκη (IMBB-FORTH). Το αντίσωμα έναντι της GFP (anti-GFP), ήταν ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Δρ.Τ.Οικονόμου (IMBB-FORTH).

4.1.5 Μεμβράνες: Η μεταφορά των πρωτεϊνών κατά την ανοσοαποτύπωση, έγινε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Protran (Schleicher and Schuell).

4.1.6 Ολιγονουκλεοτίδια: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή προήλθαν από τη Metabion International AG, Germany καθώς και από το εργαστήριο Μικροχημείας του ITE (IMBB-FORTH).

4.1.7 Χρωστικές: Χρησιμοποιήθηκαν χρωστικές βαφής DNA και βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται από Sambrook and Russell στο εγχειρίδιο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Third Edition, 2001).

4.2 Στελέχη ζυμομύκητα και βακτηρίων

Στελέχη

A. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherchia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

• **DH5α** (GibcoBRL) (*F'**endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 D(laclZYA-argF)UI69 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*)

B. Στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*

Τα στελέχη ζυμομύκητα που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες εργασίες (Tzamarias and Struhl, 1994) (Zacharioudakis et al. 2007) ,έχουν ως γενετικό υπόβαθρο το στέλεχος S288C και αποτελούν απογόνους του FT5 (MAT α ; *leu2-3*; *ura3-52*; *trp1-1*; *his3Δ200*). Το στέλεχος όπου η πρωτεΐνη Ubc9p είναι μεταλλαγμένη και εμφανίζει θερμοευαισθησία (Ubc9^{ts}) ήταν ευγενική προσφορά του Δρ. Stefan Jentsch (Max-Planck Institute for Biochemistry) (Ubc9^{ts} strain genotype: DF5 (MAT α), *his3-Δ200*, *leu2-3,2-112*, *lys2-801*,*trp1-1(am)*,*ura3-52*, *Ubc9Δ::TRP1*, *leu2::Ubc9Pro-Ser::LEU2*). Το στέλεχος δημιουργήθηκε από την ομάδα του W.Seufert, του Παν/μίου του Μονάχου {Betting 1996}.Επίσης σε κάποια από τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν και τα αγρίου τύπου στελέχη FT4 (Tzamarias and Struhl, 1994) και W303 (Rodney Rothstein). Όλα τα στελέχη ζυμομύκητα που δημιουργήθηκαν ή

χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Στέλεχος	Γονότυπος	Σύντομη Περιγραφή
FT5	MATα, <i>ura3-52, trp1Δ-63, leu2::pet56, his3-Δ200</i>	Αγρίου τύπου στέλεχος (βλ. αναφορά Tzamarias et al, 1994)
W303-1B	MATα { <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i> }	Αγρίου τύπου στέλεχος (δημιουργήθηκε από τον Rodney Rothstein)
w303/ <i>tup1Δ</i> & w303/ <i>tup1Δ, hsp26Δ</i>	Βλ. γονότυπο w303 και w303/ <i>tup1Δ, HSP26Δ(G418)</i>	Περιγράφεται στο κυρίως κείμενο
w303/ <i>upc2Δ</i> & w303/ <i>upc2Δ, hsp26Δ</i>	Βλ. γονότυπο w303 και w303/ <i>upc2Δ, HSP26Δ(G418)</i>	Περιγράφεται στο κυρίως κείμενο
w303/ <i>tup1Δ, upc2Δ</i> & w303/ <i>tup1Δ, upc2Δ, hsp26Δ</i>	Βλ. γονότυπο w303 και w303/ <i>tup1Δ, w303/upc2Δ, HSP26Δ(G418)</i>	Περιγράφεται στο κυρίως κείμενο
FT4	MATα, <i>ura3-52, trp1Δ-63, leu2::pet56, his3-Δ200</i>	Αγρίου τύπου στέλεχος συζευκτικού τύπου MATα (βλ. αναφορά)
FT5/ <i>hsp26Δ</i>	FT5/ <i>hsp26Δ:HIS3</i>	Στο στέλεχος αυτό απουσιάζει η κωδική περιοχή της Hsp26p
FT5/ <i>hsp104Δ, hsp26GFP</i>	FT5/ <i>hsp104Δ:HIS3:hsp26GFP:KanMX2</i>	Στο στέλεχος αυτό απουσιάζει η κωδική περιοχή της Hsp104p, ενώ η Hsp26p είναι υβριδική με GFP
FT5/ <i>Hsp26GFPp</i>	FT5/ <i>hsp26:GFP:HIS3</i>	Στο στέλεχος αυτό η Hsp26p είναι υβριδική με GFP (green fluorescent protein)

Στέλεχος	Γονότυπος	Σύντομη Περιγραφή
FT5/Hsp26GFPp	FT5/ <i>hsp26:GFP:KanMX2</i>	Ίδιο με το προηγούμενο στέλεχος απλά εμφανίζει ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη
FT5/Hsp104GFPp	FT5/ <i>hsp104:GFP:HIS3</i>	Η πρωτεΐνη Hsp104p είναι υβριδική με GFP
FT5/Hsp42GFPp	FT5/ <i>hsp42:GFP:HIS3</i>	Η πρωτεΐνη Hsp42p είναι υβριδική με GFP
FT5/HSP26pr:GFP	FT5/ <i>HSP26pr:GFP:KanMX2</i>	Στο στέλεχος αυτό εκφράζεται η GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του <i>HSP26</i> γονιδίου
FT5/Hsp26mCherry	FT5/ <i>hsp26:mCherry:KanMX2</i>	Η πρωτεΐνη Hsp26p είναι υβριδική με mCherry
FT5/Hsp104mCherry	FT5/ <i>hsp104:mCherry:KanMX2</i>	Η πρωτεΐνη Hsp104p είναι υβριδική με mCherry
FT5/Hsp104GFPp Hsp26mCherry	FT5/ <i>hsp104:GFP:HIS3:</i> <i>hsp26:mCherry:KanMX2</i>	Η πρωτεΐνη Hsp104p είναι υβριδική με GFP ενώ η Hsp26p υβριδική με mCherry
FT5/Hsp26GFPp Hsp104mCherry	FT5/ <i>hsp26:GFP:HIS3:</i> <i>hsp104:mCherry:KanMX2</i>	Η πρωτεΐνη Hsp26p είναι υβριδική με GFP ενώ η Hsp104p υβριδική με mCherry
FT5/Hsp104HAp	FT5/ <i>hsp104:3HA:KanMX2</i>	Η πρωτεΐνη Hsp104p φέρει HA (hemagglutinin) επίτοπο
FT5/Hsp26HAp	FT5/ <i>hsp26:3HA:KanMX2</i>	Η πρωτεΐνη Hsp26p φέρει HA (hemagglutinin) επίτοπο

Πίνακας 1. Στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν ή/και κατασκευάστηκαν στη διάρκεια της εργασίας αυτής

4.3 Θρεπτικά μέσα και συνθήκες ανάπτυξης

Τα θρεπτικά μέσα, υγρά και στερεά, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών (LB, LB*) αλλά και των στελεχών ζύμης (MIN, YPD, YP-galactose 2%, YP-raffinose 2%) καθώς και τα διαλύματα αντιβιοτικών (αμπικιλίνη, καναμυκίνη, νουρσεοθρισίνη) και χημικών όπως κετοκοναζόλη κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.M et al.) και Molecular Cloning (Sambrook & Russell). Οι οδηγίες για την παρασκευή των διαλυμάτων αμινοξέων αναφέρονται στο Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Guthrie C. and Fink G.) Για τα πειράματα που σχετίζονταν με απώλεια γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο, χρησιμοποιήθηκε YP με 0,05% γλυκόζη. Στην περίπτωση των βακτηριακών τρυβλίων με Amp όπου έγινε η επιλογή των θετικών κλώνων του pGEM TA cloning (λευκές αποικίες), στο πιάτο απλώθηκε και X-gal. Οι συνθήκες ανάπτυξης για τα βακτηριακά στελέχη ήταν 37°C ενώ για το ζυμομύκητα 30°C. Το θερμικό σοκ γινόταν στους 39°C. Στην περίπτωση των πειραμάτων που τα κύτταρα αρχικά καλλιεργήθηκαν ο/η στο απαιτούμενο μέσο και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε nanopure νερό, το αρχικό μέσο απομακρύνθηκε προσεκτικά με 3 πλύσεις με νερό, για να μην επηρεάσει τη μετέπειτα ανάπτυξη. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε η ανάδευση των υγρών καλλιεργειών και η οξυγόνωσή τους να είναι επαρκής (ανάδευση στις 200rpm). Οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε OD≈0.3-0.5. Τα κύτταρα ζύμης που προετοιμάζονταν για μετασχηματισμό με PCR προϊόντα καλλιεργούνταν σε YP-γλυκόζη 4%.

4.4. Γενικές τεχνικές

4.4.1 Ανάλυση και απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο Molecular Cloning (Sambrook & Russell) και με σκοπό την ποσοτική εκτίμηση ή την εκτίμηση του μεγέθους της/των αναλυμένων ζωνών. Όπου ήταν απαραίτητος ο ακριβέστερος προσδιορισμός της ποσότητας του DNA μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 260nm (OD260nm). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγεθών DNA (DNA marker) το προϊόν της πέψης του γενωμικού DNA του φάγου λ με το περιοριστικό ένζυμο *SylI*. Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (low-melting agarose), θέρμανση για 10 λεπτά στους 65°C, εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο παρουσία οξικού νατρίου και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

4.4.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή ή μεσαία κλίμακα

Για την απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (Sambrook, J., Russel D)

4.4.3 Παρασκευή ηλεκτροεπιδεκτικών κυττάρων (electrocompetent cells)

Υγρή καλλιέργεια στελεχών βακτηρίων επωάζεται σε θρεπτικό μέσο LB*, στους 30°C και στις 230 rpm μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων (OD600nm) να γίνει 0.6-0.8. Στην συνέχεια, συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4°C και στις 3000 στροφές. Το ίζημα των κύτταρων επαναδιαλύεται με ήπιο τρόπο σε H₂O αντίστασης 18MΩ, ίσου όγκου με την αρχική καλλιέργεια και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Τα κύτταρα ξεπλένονται ακόμα μια φορά με H₂O και συμπύσσονται

σε όγκο ίσο με το μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για ακόμα δύο φορές. Τελικά επαναδιαλύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10%, όγκου ίσου με το 1/500 έως 1/300 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα μοιράζονται σε μικρές ποσότητες των 60μl (aliquots) και φυλάσσονται στους -80°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Όλα τα υλικά και τα μέσα, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί έγιναν στους 4°C.

4.4.4 Μετασχηματισμός ηλεκτροεπιδεκτικών κυττάρων (electroporation).

Τοποθετούμε, για κάθε μετασχηματισμό, 60μl δεκτικών κυττάρων στον πάγο για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 2μl από την αντίδραση σύνδεσης και επωάζουμε στον πάγο για 1 λεπτό. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε ειδική κυψελίδα, την οποία τοποθετούμε στην κατάλληλη θέση του ειδικού μηχανήματος (electroporator) και διοχετεύουμε ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 1.65kV. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 1 ml θρεπτικού μέσου SOC και επωάζουμε για 1,5 ώρα στους 30°C υπό ανάδευση. Τελικά συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 5 λεπτά και τα επιστρώνουμε υπό στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιέχει κατάλληλη ποσότητα του αντιβιοτικού με το οποίο κάνουμε την επιλογή (π.χ αμπικιλίνη). Το πιάτο τοποθετείται στους 30°C ή 37°C για 16 ώρες τουλάχιστον, έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

4.4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού ήταν 5-50 ng όταν το DNA ήταν πλασμιδιακό, ενώ 50-100ng όταν επρόκειτο για γενωμικό DNA. Οι αντιδράσεις ως επί το πλείστον γίνονταν στα 25μl και είχαν την παρακάτω σύσταση: 10mM Tris- HCl, pH.9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM από κάθε dNTP, 25-50 pmoles από κάθε εκκινητή και 0.1-0.5u Taq πολυμεράση. Το πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν ειδικό για κάθε περίπτωση, ανάλογα με το T_m του κάθε ανιχνευτή αλλά και το μέγεθος του προϊόντος. Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού που εφαρμόστηκαν φαίνεται στη συνέχεια:

Αρχή: 5 λεπτά στους 94⁰C για αρχική αποδιάταξη
35 κύκλοι: 30 δευτερόλεπτα στους 94⁰C για αποδιάταξη
30 δευτερόλεπτα στην επιλεγμένη θερμοκρασία
(T_m- 4⁰C) για υβριδοποίηση των εκκινητών
επιλεγμένο χρόνο στους 72⁰C για επιμήκυνση της αλυσίδας
Τέλος: επιλεγμένο χρόνο στους 72⁰C για συμπλήρωση των άκρων

Σε περιπτώσεις όπου δε χρησιμοποιήθηκε η Minotech Taq αλλά κάποια από τις άλλες πολυμεράσες ((Promega (GoTaq pol sample), Finnzymes (EXT Taq polymerase free sample), Roche (FastStart PCR, free sample) ή KapaBiosystems Kapa HiFi Taq (free sample)), το παραπάνω πρόγραμμα τροποποιήθηκε με βάση τις οδηγίες χρήσης που συνοδεύουν τα εν λόγω αντιδραστήρια. Στην περίπτωση δε της ενίσχυσης της κασέτας RedStar2-NatNT2, ακολουθήθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται από (Knop et al., 1999)

4.4.6 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοεντοπισμός ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη (SDS-PAGE και Western blot analysis)

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Molecular Cloning, Sambrook et al.). Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά αυτών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά και η διαδικασία εφαρμογής των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων έγιναν όπως αναφέρονται στο Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. 1999) ενώ για τις ιδανικές αραιώσεις των αντισωμάτων λήφθηκαν υπόψιν οι οδηγίες των κατασκευαστών. Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των επιτόπων HA και Myc της Santa Cruz Biotechnology. Ο ανοσοεντοπισμός έγινε ενζυματικά με τη δράση της υπεροξειδάσης

(HRP), η οποία ήταν συζευγμένη με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-rabbit ή anti-mouse-HRP conjugated), σε κατάλληλα υποστρώματα. (Για λεπτομερή αναφορά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν βλέπε 4.1.3)

4.5 Μοριακές τεχνικές ειδικές για το *Saccharomyces cerevisiae*

4.5.1 Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα ζύμης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του οξικού λιθίου (LiAc TRAF0). Πρόκειται για μια μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας η οποία βασίζεται στη δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης λόγω αλκαλικών κατιόντων και περιγράφεται στο εγχειρίδιο *Methods in Yeast Genetics* καθώς και από τους Gietz *et al.*

4.5.2 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

Για την εισαγωγή πλασμιδίου ή κασέτας DNA σε κύτταρα ζύμης εφαρμόστηκε η μέθοδος δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων ζύμης με χρησιμοποίηση χλωριούχου λιθίου (LiAc TRAF0) όπως ακριβώς περιγράφεται από τους Gietz *et al.* 1995.

4.5.3 Έλεγχος μετασχηματισμένων στελεχών *S. cerevisiae* με τη μέθοδο της PCR (single colony PCR)

Αποικία του υπό έλεγχο στελέχους του *S. cerevisiae* λύεται σε 15 μl 0,02 N NaOH. Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 95°C, σύντομο vortex, φυγοκέντρηση για 2 min στις 4000 rpm και άμεση μεταφορά στους 4°C. 2 μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για αντίδραση PCR με κατάλληλους εκκινητές.

4.5.4 Αποσιώπηση (gene disruption) και αντικατάσταση (gene replacement) γονιδίων στη ζύμη

Στην αποσιώπηση και στην αντικατάσταση γονιδίων της ζύμης εκμεταλλευόμαστε το φαινόμενο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Σε όλες τις περιπτώσεις απαλοιφής γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος «αποσιώπησης σε ένα βήμα» με χρήση ειδικής κασέττας- αποσιώπησης και ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τμήμα της κασέττας και τμήμα του προς διαγραφή γονιδίου (Methods in Yeast Genetics και επίσης (Knop et al., 1999) (Sheff and Thorn, 2004)). Τα πλασμίδια εκμαγεία καθώς και η κατάλληλοι εκκινητές είτε για την απαλοιφή του γονιδίου-στόχου, είτε για την αντικατάσταση της κωδικής του περιοχής από GFP, είτε ακόμα για τη δημιουργία της υβριδικής πρωτεΐνης με GFP (green fluorescent protein) μπορούν να αναζητηθούν στους σχετικούς πίνακες.

4.5.5 Ταχεία εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης

Καλλιέργειες των 2ml αναπτύσσονται μέχρι $OD_{550}=0.8-1$ και συλλέγονται με φυγοκέντρηση. Επαναδιαλύονται σε 50μl διαλύματος 1X SDS loading buffer (50mM Tris-HCl, pH=6.8, 2%SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol, 7mM β-ME, 1mM PMSF) και προστίθεται ίσος όγκος γυάλινων σφαιριδίων (glass beads). Η λύση των κυττάρων γίνεται με ισχυρή ανάδευση (vortex), για 4 φορές από 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες επώσεις στον πάγο. Ακολουθεί βρασμός στους 100°C, φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

4.5.6 Ανίχνευση κυτταρικού εντοπισμού με ανοσοφθορισμό

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των επιτόπων, των πρωτεϊνών στόχων, έγινε με ανοσοϊστοχημεία και με χρήση πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που περιγράφονται στην παράγραφο 4.1.3. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτό που περιγράφεται στο Manual for Methods in Yeast Genetics, CSHLP, 2005.

(Αναλυτικές πληροφορίες για την όλη διαδικασία και για τις συγκεντρώσεις των αντισωμάτων μπορεί κανείς να βρει στον αναλυτικό οδηγό *A guide to microscopy*, που έχω ετοιμάσει για το εργαστήριο καθώς επίσης και στα συνοδευτικά φυλλάδια των εταιριών αντισωμάτων).

4.5.7 Μικροσκοπία Φθορισμού

Κύτταρα καλλιιεργειών συγκεντρώθηκαν αρχικά μονιμοποιήθηκαν με 2% τελική συγκέντρωση φορμαλδεΰδης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ξεπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια 5 μ l κυττάρων απλώθηκαν σε επιστρωμένες με 1% αγαρόζη αντικειμενοφόρους πλάκες (agarose pads). Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των καλλιιεργειών ήταν συνεστιακό μικροσκόπιο laser BIO-RAD Axioskop Plus 2 MRC 1024 CONFOCAL SYSTEM (Biorad LaserSharp Software V3.2). Ως πηγή UV χρησιμοποιήθηκε απλή λάμπα UV στο 50% της μέγιστης ισχύος. Για τις εικόνες με DAPI staining, GFP και τις εικόνες όπου ανιχνεύεται Alexa488 ή mCherry χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα φίλτρα (no. 1 για DAPI, no 3 για GFP και no 4 για mCherry). Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με τη χρήση φακού 65X και κατάλληλης κάμερας CCD και με τη χρήση του προγράμματος AxioVision.

Χρώση με Calcofluor (Fluorescent brightener 28; Sigma, F3543)

Σε περίπου 10^7 κύτταρα τα οποία είχαν ξεπλυθεί με PBS 1x ή H₂O, προστέθηκε Calcofluor (Fluorescent Brightener 28), σε τελική συγκέντρωση 100 μ g/ μ l (1/10 αραίωση του stock 1mg/ml). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, 3 πλύσεις με H₂O ή PBS τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο με αγαρόζη και παρατήρηση χρησιμοποιώντας το φίλτρο που είναι κατάλληλο για την παρατήρηση DAPI (φίλτρο no 1 στην περίπτωση του Biorad Axioskop 2 plus μικροσκοπίου) (Methods in Yeast Genetics, Pringle *et al.* 1991).

Χρώση με DAPI

Για τη χρώση πυρήνων κυττάρων *S.cerevisiae* με DAPI περίπου 1ml μιας εκθετικής καλλιέργειας (OD 0.2-0.3), φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 1ml αποτελούμενο από 90% αιθανόλη, 10% φορμαλδεΰδη 37% και προαιρετικά 1% TritonX. Μετά την μονιμοποίηση, ακολούθησε γρήγορη φυγοκέντρωση και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 50μl H₂O. Αφού προστέθηκε 1μl DAPI (1mg/ml), τα κύτταρα επώαστηκαν για 10min στους 37°C. Μετά από τρεις διαδοχικές πλύσεις με 1X PBS και φυγοκεντρήσεις, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε μικρό όγκο PBS και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους με αγαρόζη. Αφού αφαιρέθηκε το πλεονάζων υγρό τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού και φίλτρο που είναι κατάλληλο για την παρατήρηση DAPI (φίλτρο νο 1 στην περίπτωση του Biorad Axioskop 2 plus μικροσκοπίου).

4.5.8 *In vivo* συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-Immunoprecipitation)

Αφού εξακριβώθηκε η επιτυχής δημιουργία του στελέχους Ubc9ts HA (G418), Hsp26 GFPp (HIS3) εφαρμόστηκε επακριβώς η μέθοδος που περιγράφεται από τους (Fragiadakis et al., 2004), κατακρημνίζοντας σε πρώτη φάση με anti-GFP (1:250) και ιχνηθετώντας στη συνέχεια στο Western με anti-HA.

4.5.9 Κυτταρομετρία ροής και διαχωρισμός υποπληθυσμών με χρήση κατάλληλου μηχανήματος (sorter)

Κατά την ανάλυση με χρήση κυτταρομετρίας ροής, 200μl καλλιέργειας αναπτυγμένης σε κατάλληλες συνθήκες και με OD≈0.2-0.5, φυγοκεντρήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο όγκο νερού ή 1X PBS (500μl). Μετά από τοποθέτηση των επαναδιαλυμένων κυττάρων σε κατάλληλα σωληνάρια, ακολούθησε κυτταρομετρία ροής, με χρήση του BD FACSCalibur System (Becton Dickinson,NJ,USA) (βλ. επίσης ()), εξοπλισμένου με το πρόγραμμα CellQuest της BD. Στην περίπτωση διαχωρισμού υποκυτταρικών πληθυσμών με τη χρήση sorter, η

διαδικασία προετοιμασίας των κυττάρων ήταν ανάλογη, απλά ο προς διαχωρισμόν όγκος καλλιέργειας ήταν 5ml και η οπτική πυκνότητα $OD \approx 1.0$. Ο διαχωρισμός των υποκυτταρικών πληθυσμών (sorting) έγινε με χρήση του MoFLo XPD cell sorter (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA) εξοπλισμένου με Summit Software V5.0 (Dako).

4.6 Λογισμικό και προγράμματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση και μορφοποίηση των αποτελεσμάτων.

Η παρούσα διατριβή γράφτηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Pages (iWork '08), ως επεξεργαστή κειμένου, το OpenOffice Calc (Sun Microsystems) για τη δημιουργία γραφημάτων, το Papers 1.8 (Mekentosj) και την εφαρμογή Sente 5.6.16 για τη διαχείριση της βιβλιογραφίας. Για τη διαμόρφωση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε Adobe Photoshop CS2, ενώ η απόδοση των γραφημάτων που προέκυψαν από τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής έγινε με χρήση του προγράμματος FlowJo 8.7 (TreeStar Software). Για τη δημιουργία και τελική απόδοση των πλασμιδιακών χαρτών χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, CA, USA), ApE (A plasmid Editor, M. Wayne Davis, Dept. of Biology, University of Utah) και η δοκιμαστική έκδοση του προγράμματος Geneious 4.0.3 (Biomatters Ltd). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης πηγές και εργαλεία που βρίσκονται διαθέσιμα στο διαδίκτυο και αναφέρονται στη σχετική λίστα.

4.7 Κατάλογοι εκκινητών και πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2. Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή αυτή

Αύξων Αριθμός	Ονομασία πλασμιδιακού φορέα	Μέγεθος (bp)	Ολιγονουκλεοτίδια για την ενίσχυση της κασέτας με PCR	Περιγραφή	Δημιουργήθηκε/Παραγγέλθηκε από
1	pKT127	4894	F5/R3	Χρησιμοποιείται για προσθήκη της GFP στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, προσδίδει ανθεκτικότητα σε G418	EUROSCARF/I.Βαγγελάτος
2	pKT128	4738	F5/R3	Χρησιμοποιείται για προσθήκη της GFP στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, περιέχει γονίδιο παραγωγής ιστιδίνης	EUROSCARF/I.Βαγγελάτος
3	pYM1	4265	S3/S2-R3, S1/S2-R3 για αφαίρεση της κωδικής περιοχής γονιδίου	Χρησιμοποιείται για προσθήκη του επιτόπου HA στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, προσδίδει ανθεκτικότητα σε G418	EUROSCARF/I.Βαγγελάτος
4	pYM6	3915	S3/S2-R3	Χρησιμοποιείται για προσθήκη του επιτόπου pmyc στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, περιέχει γονίδιο παραγωγής τρυπτοφάνης	EUROSCARF/I.Βαγγελάτος
5	pBS34	4879	S3 (τροποποιημένο για pTY24)/S2-R3	Χρησιμοποιείται για προσθήκη της DsRed T1.N1 στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, προσδίδει ανθεκτικότητα σε G418	Roger Tsien , YRC/X.Λάζαρης
6	pBS35	4872	S3 (τροποποιημένο για pTY24)/S2-R3	Χρησιμοποιείται για προσθήκη της DsRed T1.N1 στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, προσδίδει ανθεκτικότητα σε hygromycin	Roger Tsien , YRC/X.Λάζαρης
7	pSR8	N/A	S3/S2-R3	Χρησιμοποιείται για προσθήκη της RedStar2 στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, προσδίδει ανθεκτικότητα σε NatNT2	M.Knop / Προσφορά K.Nasmyth

Αύξων αριθμός	Αύξων αριθμός στη λίστα εργαστηρίου	Όνομα ώργανισμού/κωστίδιου	Μέγεθος (nt)	Αλληλουχία (5'-3')
1	60	NIC96 S3	64nt	CCAAGGGAAACGTACAGCACTTTAATTAATATAGACGTCTCTACCGTACGCTGCAGGTCGAC
2	61	NIC96 S2	64nt	TACTGATATATAGATATAAAACAAAAATATACAATATTTAAAAAAAATCGATGAATTCGAGCTCG
3	78	CYC8 S3	63nt	GAAAATGTAGTAAGGCAAGTGGAAAGAAGATGAAAACCTACGACGACCGGTACGCTGCAGGTCGAC
4	79	CYC8 S2	64nt	TCGTTGATTTATAAATAGTAGATTAATTTTTTGAATGCAAACTTTATCGATGAATTCGAGCTCG
5	104	SIR4S3	63nt	TTGATGGAAAAAGATTTTCAAGTGAATAAGGAGATAAAAACCGTATCGTACGCTGCAGGTCGAC
6	103	SIR4S2	64nt	AACAGGGTACACTTCGTTACTGGTCTTTTGTAGAATGATAAAAAGATCGATGAATTCGAGCTCG
7	162	KAN&HIS REV	19nt	TGGGCCTCCATGTCGCTGG
8	237	Sir2-S3	63nt	AAGGGCGTGTATGTCGTTACATCAGATGAACATCCCAAAACCCCTCGTACGCTGCAGGTCGAC
9	236	Sir2-S2	64nt	ATTGATATTAATTTGGCACTTTTAAATTAATAAATTCGCTTCTACATCGATGAATTCGAGCTCG
10	294	Sir2 S1	63nt	AGACACATTCAAACCAATTTTCCCTCATCGGCACATTAAGACTGGCGTACGCTGCAGGTCGAC
11	299	Sir2 Fw Del	17nt	GGACAGCCAGGACCTTT
12	325	HSP26F5	63nt	CACGTCAGAAGATTGAGGTTTCTTCTCAAGAATCGTGGGGTAACGGTGACGGTCTGGTTTA
13	343	HSP26R3	63nt	ACAATGGTCTCGCGAGAGGEGACAACACTATAGAGCCAGGTCACTCGATGAATTCGAGCTCG
14	344	Pir1-F5	65nt	CTCAATGTAATGCAGTCCACCTACAAGCTATCGATTTGCTCAACTGTGGTGACGGTGTGGTTTA
15	345	Pir1-R3	65nt	TACGATGACTTTATGTTTTTCATGCGACTATGAGAGGTAACCTATGATCGATGAATTCGAGCTCG
16	354	Hsp26 F5 (disruption)	65nt	CCAAAAAGCAAAACAAACAACTAAACAAATTAACATGTCATTTAACGGTGACGGTGTGGTTTA
17	360	Hsp104 F5	65nt	GTGATGACGATAATGAGGACAGTATGGAAATGATGATGACCTAGATGGTGACGGTGTGGTTTA
18	361	Hsp104 R3	65nt	ATTACTGATTTCTTGTTCGAAAATTTTAAAAATCACACTATAATTAATTCGATGAATTCGAGCTCG
19	362	Hsp70 F5	65nt	ACAACAACAACAACGGCAACAATGCCAATCTGGTGAACCTAAGCAGGGTGACGGTGTGGTTTA
20	363	Hsp70 R3	65nt	TTCTAGTTTAAACATTGTGGTAGTAATTTATTAACAGGAATTTGCTTTTCGATGAATTCGAGCTCG
21	364	Hsp40 F5	65nt	CCGATGAAGAAGAACAAGGTGGCGAAGGTGTTCAATGTGCATCTCAAGGTGACGGTGTGGTTTA
22	365	Hsp40 R3	65nt	ATGAATAAATGAATCGTGAATAAGTTGATCTTTTTTTATCAAGAAAATCGATGAATTCGAGCTCG
23	366	Hsp42 F5	65nt	ACGAAGAATTGGAGTTTGAAGAAAATCCCAACCTACGGTAGAAAATGGTGACGGTGTGGTTTA
24	367	Hsp42R3	65nt	TATTATAAATATAAATGTATGTATGTGTATAAACAGATACGATATTCGATGAATTCGAGCTCG
25	382	Gall S3 (pTY24)	64nt	TATCATCGTCTCTAAACCAGCATTGGGCAGCTGTCTATATGAATTAACGTACGCTGCAGGTCGA
26	384	Hsp26 S3 (pTY24)	65nt	ACCACGTCAAGAAGATTGAGGTTTCTTCTCAAGAATCGTGGGGTAACCGTACGCTGCAGGTCGA
27	385	Hsp26 S1	65nt	CCAAAAAGCAAAACAAACAACTAAACAAATTAACATGTCATTTAACCGTACGCTGCAGGTCGAC
28	386	Hsp104 S3 (pTY24)	65nt	GTGATGACGATAATGAGGACAGTATGGAAATGATGATGACCTAGATTCGTACGCTGCAGGTCGA
29	387	Hsp26 S3	65nt	ACCACGTCAAGAAGATTGAGGTTTCTTCTCAAGAATCGTGGGGTAACCGTACGCTGCAGGTCGAC
30	388	Hsp104 S3	65nt	GTGATGACGATAATGAGGACAGTATGGAAATGATGATGACCTAGATTCGTACGCTGCAGGTCGAC
31	391	Uhp9 S3	65nt	AACGCAATAAGCAAAAAAGAAAATCGAGAATATTGAGCTTCATCAAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
32	392	Uhp9 S2	65nt	AGAACAGATGGGTCTCAACTATATGATGTATCGAAAACAATCCCGATATCGATGAATTCGAGCTCG
Linkers	(5'-3')			
S3 linker	CGTACGCTGCAGGTCGAC			
S2 linker	ATCGATGAATTCGAGCTCG			
F5 linker	GGTGACGGTGTGGTTTA			
R3 linker	TCGATGAATTCGAGCTCG			
S3 modified (pTY24)	TCGTACGCTGCAGGTCGA			
S1 linker	CGTACGCTGCAGGTCGAC			

5. Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Νίκη Γουναλάκη για την πολύτιμη βοήθειά της και τις εύστοχες συμβουλές τις σε ποικίλα τεχνικά ζητήματα καθώς και το Δ.Τζαμαρία για τις νοητικές προκλήσεις. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Χρ.Δελιδάκη και Τ.Οικονόμου για τα αντισώματα Alexa488 conjugated και aGFP αντίστοιχα, τη Μαρία Μοναστηριώτη και την Αγγέλα Πασπαράκη για τη βοήθειά τους με τα πειράματα μικροσκοπίας, το Θωμά Γληγόρη για τις συμβουλές στην πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας καθώς και τους:

α) T.Davis (Yeast Research Center) για την παροχή των πλασμιδιακών φορέων pTY24, pBS34, pBS35

β) Roger Y Tsien (University of California, San Diego) για την άδεια παροχής και χρήσης των φορέων pBS34, pBS35

γ) Stefan Jentsch (Max-Planck Institute for Biochemistry, München, Germany) για το στέλεχος Y0174 (Ubc9^{ts})

δ) τη Susan Gasser (FMI, Basel, Switzerland) για την παροχή των φορέων pSR7, pSR10, pSR13 που αν και δε χρησιμοποιήθηκαν τελικά στην εν λόγω διατριβή, αποτελούν πολύτιμο υλικό για την πραγματοποίηση μελλοντικών πειραμάτων

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Α. Ωνάση που με στήριξε σημαντικά παρέχοντάς μου οικονομική βοήθεια για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής. Ειλικρινά αισθάνομαι ευτυχής που είχα την τιμή να υπάρξω υπότροφος του εν λόγω Ιδρύματος.

‘Αφησα για το τέλος τους ανθρώπους στους οποίους οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ απ’ όλα για τη στήριξή τους στη δύσκολη αυτή πορεία. Την οικογένειά μου και τη Μαριλένα μου.

6. Βιβλιογραφία

Βιβλία

Amberg C.D, Burke J.D, Strathern N.J, **Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Course Manual**, CSHLP, (2005).

Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.G, Smith J.A, Struhl K, **Current Protocols In Molecular Biology**, John. Wiley and Sons, Inc., New York, (1999)

Guthrie, C., Fink, G.R. **Methods in Enzymology-Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology**, Academic press (1991).

Sambrook, J., Russel D , **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (2001).

Πρωτότυπες δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

Aguilaniu, H. 2003. Asymmetric Inheritance of Oxidatively Damaged Proteins During Cytokinesis. *Science* **299**:1751-1753.

Bentley, N.J., Fitch, I.T., and Tuite, M.F. 1992. The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**:95-106.

Biggar, S.R., and Crabtree, G.R. 2001. Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *EMBO J* **20**:3167-3176.

Bossier, P., Fitch, I.T., Boucherie, H., and Tuite, M.F. 1989. Structure and expression of a yeast gene encoding the small heat-shock protein Hsp26. *Gene* **78**:323-330.

Cashikar, A.G., Duennwald, M., and Lindquist, S. 2005. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem* **280**:23869-23875.

Doyle, S., Shorter, J., Zolkiewski, M., Hoskins, J., Lindquist, S., and Wickner, S. 2007. Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. *Nat Struct Mol Biol* **14**:114-122.

Doyle, S.M., and Wickner, S. 2008. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci (In Press)*:9.

Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nyström, T. 2007. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes & Development* **21**:2410-2421.

Fragiadakis, G., Tzamaras, D., and Alexandraki, D. 2004. Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for FRE2 transcriptional activation. *EMBO J* **23**:333-342.

Franzmann, T. 2008. Activation of the Chaperone Hsp26 Is Controlled by the Rearrangement of Its Thermosensor Domain. *Mol Cell* **29**:207-216.

Franzmann, T.M., Wühr, M., Richter, K., Walter, S., and Buchner, J. 2005. The activation mechanism of Hsp26 does not require dissociation of the oligomer. *J Mol Biol* **350**:1083-1093.

Giese, K.C., Basha, E., Catague, B.Y., and Vierling, E. 2005. Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, independent of *in vitro* chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:18896-18901.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H. Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**: 255-269 (1995).

Glover, J.R., and Lindquist, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**:73-82.

Haslbeck, M. 2005. Disassembling Protein Aggregates in the Yeast Cytosol: THE COOPERATION OF HSP26 WITH SSA1 AND HSP104. *Journal of Biological Chemistry* **280**:23861-23868.

Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S., and Buchner, J. 2004. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **23**:638-649.

Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., and Buchner, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J* **18**:6744-6751.

Janke, C., Magiera, M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**:947-962.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**:963-972.

Liberek, K., Lewandowska, A., and Zietkiewicz, S.Z. 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* **27**:328-335.

Lindquist, S. 1992. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev* **2**:748-755.

- Lindquist, S., and Kim, G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:5301-5306.
- Nyström, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* **24**:1311-1317.
- Parsell, D., Kowal, A., and Lindquist, S. 1994. Saccharomyces cerevisiae Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *Journal of Biological Chemistry* **269**:4480.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. 1994. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**:475-478.
- Petko, L., and Lindquist, S. 1986. Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* **45**:885-894.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K., and Jones, E.W. 1989. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* **31**:357-435.
- Rossi, J.M., and Lindquist, S. 1989. The intracellular location of yeast heat-shock protein 26 varies with metabolism. *J Cell Biol* **108**:425-439.
- Sanchez, Y., and Lindquist, S.L. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**:1112-1115.
- Sanchez, Y., Parsell, D.A., Taulien, J., Vogel, J.L., Craig, E.A., and Lindquist, S. 1993. Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol* **175**:6484-6491.

- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A., and Lindquist, S. 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* **11**:2357-2364.
- Schaupp, A., Marcinowski, M., Grimminger, V., Bösl, B., and Walter, S. 2007. Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. *J Mol Biol* **370**:674-686.
- Shaner, N., Campbell, R.E., Steinbach, P., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**:1567-1572.
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S.B., Gonnet, G., and Barral, Y. 2008. A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* **454**:728-734.
- Sheff, M., and Thorn, K. 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**:661-670.
- Shorter, J., and Lindquist, S. 2005. Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat Rev Genet* **6**:435-450.
- Shorter, J., and Lindquist, S. 2008. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J* **27**:2712-2724.
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M., and Buchner, J. 2003. Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J Biol Chem* **278**:18015-18021.
- Stromer, T., Fischer, E., Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. 2004. Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation: the N-terminal domain is important for oligomer assembly and the binding of unfolding proteins. *J Biol Chem* **279**:11222-11228.

Susek, R.E., and Lindquist, S.L. 1989. hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the superfamily of small heat shock proteins but is without a demonstrable function. *Mol Cell Biol* **9**:5265-5271.

True, H.L., and Lindquist, S.L. 2000. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**:477-483.

Tzamarias, D., and Struhl, K. 1994. Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369**:758-761.

White, H.E., Orlova, E.V., Chen, S., Wang, L., Ignatiou, A., Gowen, B., Stromer, T., Franzmann, T.M., Haslbeck, M., Buchner, J., and Saibil, H.R. 2006. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure* **14**:1197-1204.

Wotton, D., Freeman, K., and Shore, D. 1996. Multimerization of Hsp42p, a novel heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is dependent on a conserved carboxyl-terminal sequence. *J Biol Chem* **271**:2717-2723.

Zacharioudakis, I., Gligoris, T., and Tzamarias, D. 2007. A Yeast Catabolic Enzyme Controls Transcriptional Memory. *Current Biology* **17**:2041-2046.

Διαδικτυακές Πηγές

NNRR Yeast Resource Center, University of Washington: <http://depts.washington.edu/yeastrc/>

European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis: <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

Saccharomyces Genome Database: <http://www.yeastgenome.org/>

Reverse Complement page: http://www.bioinformatics.org/SMS/rev_comp.html

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Ένα εξαιρετικό εργαλείο αναπτυγμένο στο Σικάγο και συγκεκριμένα στο Παν/μιο Northwestern, για την εύρεση του T_m (melting point) ολιγονουκλεοτιδίων καθώς και τις δομικές τους ιδιότητες. Αποτελεί πολύτιμο βοηθό για το σχεδιασμό και την πραγματοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης.

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Primer 3 (plus): Ένα πολύτιμο εργαλείο για την επιλογή ολιγονουκλεοτιδίων για την πραγματοποίηση αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης. Υπάρχουν πολλαπλές εκδόσεις. Αναπτύχθηκε από επιστήμονες του Whitehead Institute στο MIT. Η τρέχουσα έκδοση είναι η Primer 3 v 0.4.0 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm> Επίσης διαθέσιμη είναι και η Primer 3 plus έκδοση, στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

IDT OligoAnalyzer 3.1: Ένα χρήσιμο εργαλείο από την IDT Technologies, για την ανάλυση ιδιοτήτων ολιγονουκλεοτιδίων (μέγεθος, δημιουργία ομοδιμερών και ετεροδιμερών, T_m, BLAST...). Είναι διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx?c=EU>

Παράρτημα

Λίστα πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν και αναλυτική περιγραφή χαρακτηριστικών τους

Για τη χρήση των πλασμιδίων βλ. το σχετικό πίνακα. Εδώ παρέχονται όλες οι πληροφορίες για τα επιμέρους χαρακτηριστικά των πλασμιδίων αυτών και τις θέσεις τους

1. pKT127 (EUROSCARF)

LOCUS pKT127 4894 bp DNA circular

```

FEATURES                     Location/Qualifiers
   ORF                        5..721
                               /label="yEGFP1"
                               /modified_by="User"
                               /note="Geneious name: yEGFP1"
   ORF                        1348..2157
                               /label="Kan"
                               /modified_by="User"
                               /note="Geneious name: G418"
   ORF                        complement(3503..4360)
                               /label="Amp"
                               /modified_by="User"
                               /note="Geneious name: AmpR"
   primer_bind                4875..4892
                               /created_by="User"
                               /note="Geneious name: F5"
   primer_bind                complement(2398..2415)
                               /created_by="User"
                               /note="Geneious name: R3"

```

2.pKT128 (EUROSCARF)

LOCUS pKT128 4738 bp DNA circular

```

FEATURES                     Location/Qualifiers
   CDS                        1348..1998
                               /label="HIS5 \(S.\pombe)"
                               /modified_by="User"
                               /note="Geneious name: HIS5 (S.pombe)"
   CDS                        5..721
                               /label="yEGFP1"
                               /modified_by="User"
                               /note="Geneious name: yEGFP1"
   CDS                        complement(3347..4204)
                               /label="Amp"
                               /modified_by="User"
                               /note="Geneious name: AmpR"

```



```

primer_bind      4719..4736
                  /created_by="User"
                  /note="Geneious name: F5"
primer_bind      complement(2242..2259)
                  /created_by="User"
                  /modified_by="User"
                  /note="Geneious name: R3"

```

3. pYM1 (EUROSCARF)

```

LOCUS           pYM1                               4265 bp    DNA     circular

FEATURES             Location/Qualifiers
     primer_bind     25..42
                     /note="Geneious name: S3 linker binding site"
     primer_bind     25..42
                     /note="Geneious name: S1 linker binding site
for
misc_feature        complement(1836..1854)
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: S2 linker binding site
(for tagging
misc_feature        complement(1786..1805)
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: eGFP and HA IPTR Rev pr
binding
primer_bind         41..61
                     /note="Geneious type: primer_bind_reverse"
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: HA IPTR Fw primer
binding site"
     ORF             58..84
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: HA1"
     ORF             88..114
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: HA2"
     ORF             121..147
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: HA3"
     ORF             786..1595
                     /modified_by="User"
                     /note="Geneious name: G418 resistance gene"

```

4.pYM6 (EUROSCARF)

LOCUS pYM6 3915 bp DNA circular

5.pBS34 (YRC, with permission of Roger Y. Tsien)

LOCUS pBS34 4879 bp ds-DNA circular

FEATURES Location/Qualifiers
ORF 63..773
/label="mCherry"
modified_by="User"
/note="Geneious name: mCherry"
CDS 1400..2209
/label="G418"
/note="Geneious name: G418"
CDS 3555..4412
/label="AmpR"
/note="Geneious name: AmpR"
primer_bind 25..42
/created_by="User"
/note="Geneious name: S3"
primer_bind complement(2450..2468)
/created_by="User"
/note="Geneious name: S2"

5.pBS35 (YRC, with permission of Roger Y. Tsien)

LOCUS pBS35 4872 bp DNA circular