

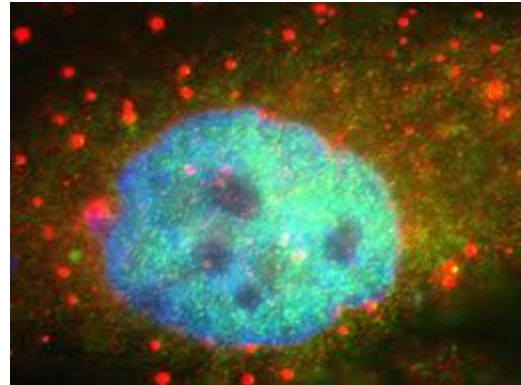
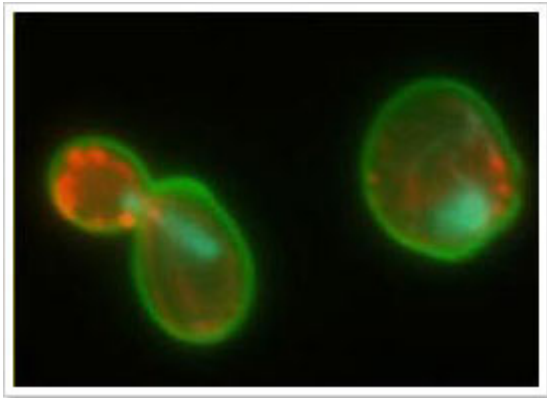
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

~ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ~

Διπλωματική Εργασία

Γενετική και φυσική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης θερμοπληξίας
HSP26 με τα p-bodies στο *Saccharomyces cerevisiae*: ρόλος στη
γήρανση του ζυμομύκητα



Πλουμή Χριστίνα

A.M: 1639

Υπεύθυνος εργαστηρίου: Τζαμαρίας
Δημήτριος

-ΗΡΑΚΛΕΙΟ-

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	3
1.1. <u>Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNAs.....</u>	3
❖ Απαδενυλίωση mRNAs.....	5
❖ Αφαίρεση της 5' καλύπτρας των mRNAs (Decapping) και 5'→3' αποικοδόμηση.....	6
❖ Ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης.....	8
1.2. <u>Σωματίδια p (p-bodies).....</u>	8
❖ Η ανακάλυψη των p-bodies.....	8
❖ Συστατικά των p-bodies-Ρόλος.....	9
❖ P-bodies και Stress granules: κύκλος των mRNAs.....	11
❖ P-bodies και πρωτεΐνες θερμοπληξίας.....	13
1.3. <u>Πρωτεΐνες θερμοπληξίας.....</u>	14
❖ Μικρές Πρωτεΐνες θερμοπληξίας (small Hsps).....	15
❖ Πρωτεΐνη θερμοπληξίας 26 - Γενικά χαρακτηριστικά.....	16
1.4. <u>Σκοπός.....</u>	17
2. Υλικά και μέθοδοι.....	18
2.1. <u>Υλικά.....</u>	18
2.2. <u>Στελέχη.....</u>	19
2.3. <u>Πλασμιδιακοί φορείς.....</u>	20
2.4. <u>Μέθοδοι.....</u>	20
❖ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	20
❖ Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	21
❖ Μετασχηματισμός κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	21
❖ Solubility Assay.....	22
❖ SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση και Western blot ανάλυση..	23

❖ Stripping της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης	24
❖ Πειράματα γήρανσης.....	24
3. Αποτελέσματα.....	26
3.1. <u>Μελέτη επιβίωσης των στελεχών: BΥ4742(wt), dhh1Δ και dhh1Δ/26prGFP στους 30°C.....</u>	26
3.2. <u>Μελέτη επιβίωσης των στελεχών: BΥ4742(wt), dhh1Δ και dhh1Δ/26prGFP στους 38°C.....</u>	27
3.3. <u>Μελέτη επιβίωσης των στελεχών BΥ4742(wt), dhh1Δ και dhh1Δ/26prGFP έπειτα από ακραίο θερμικό σοκ (extreme heatshock).....</u>	30
3.4. <u>Μελέτη συμπεριφοράς p-body μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο με ελάχιστη ποσότητα γλυκόζης (YP).....</u>	31
3.5. <u>Δοκιμασία διαλυτότητας των πρωτεϊνών Arg4-Myc και Htz1-Myc (Solubility Assays).....</u>	34
3.6. <u>Μικροσκοπική παρατήρηση Hsp26GFP in vivo</u>	36
4. Συζήτηση.....	38
5. Βιβλιογραφία.....	41
6. Παράρτημα.....	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το φαινόμενο της γήρανσης έχει απασχολήσει και συνεχίζει να απασχολεί σε μεγάλο βαθμό την επιστημονική κοινότητα. Με τον όρο «γήρανση» στο σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*), όπως και σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, εννοούμε περιορισμένη διάρκεια ζωής, η οποία καθορίζεται από τον αριθμό διαιρέσεων που έχει υποστεί το κύτταρο. Η γήρανση στο επίπεδο του κυττάρου συνδέεται τόσο με μορφολογικές όσο και με αλλαγές στη γονιδιακή του έκφραση. Η γονιδιακή έκφραση αποτελεί ένα συνδυασμό ποικίλων διαδικασιών: μεταγραφή, μετάφραση, αποικοδόμηση mRNA καθώς και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, καθεμία από τις οποίες ελέγχεται σε πολλά επίπεδα. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μελέτη της αποικοδόμησης του RNA και πιο συγκεκριμένα, του μονοπατιού εκείνου που επιτελείται από τα processing ή αλλιώς p-bodies. Ο λόγος για τον οποίο έγινε η υπόθεση ότι τα p-bodies πιθανόν να αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τη γήρανση του σακχαρομύκητα είναι το γεγονός ότι σχηματίζονται ως απόκριση μετά από συνθήκες stress.

1.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ mRNAs

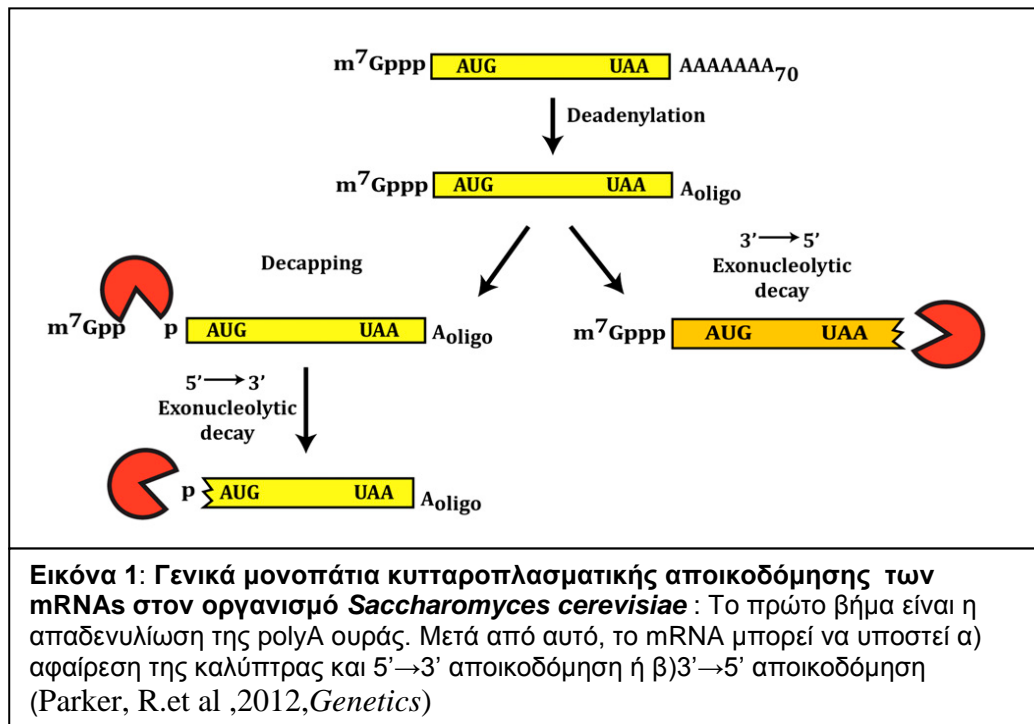
Παρά την αφθονία και την πολυπλοκότητα των μονοπατιών, υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες όσον αφορά τον γενικό μηχανισμό αποικοδόμησης RNAs σε όλους τους οργανισμούς: Αρχαία, βακτήρια, ευκαρυώτες [1]. Γενικά, υπάρχουν 3 κύριες κατηγορίες ενδοκυτταρικών RNAσών: ενδονουκλεάσες οι οποίες κόβουν το RNA εσωτερικά, 5'→3' εξωνουκλεάσες που κόβουν το RNA από το 5' άκρο και 3'→5' εξωνουκλεάσες που κόβουν το RNA από το 3' άκρο. Το γονιδίωμα κάθε οργανισμού κωδικοποιεί μεγάλη ποικιλία RNAσών και έτσι, απώλεια ενός γονιδίου RNAάσης, δεν οδηγεί σε κατάρρευση του συστήματος αποικοδόμησης, λόγω συμπληρωματικής δράσης διαφορετικών ενζύμων. Είναι σημαντικό ακόμα να αναφερθεί ότι πολλά από αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν και σε άλλες διαδικασίες εκτός της αποικοδόμησης, όπως είναι αυτή της επεξεργασίας των RNAs στον πυρήνα.

Προτού γίνει αναφορά των βασικών μηχανισμών αποικοδόμησης, θα ήταν καλό να περιγραφεί εν συντομία η δομή των αγγελιαφόρων RNAs. Γενικά, τα πρόδρομα ευκαρυωτικά mRNAs τροποποιούνται μέσα στον πυρήνα κατά τη διάρκεια ή λίγο μετά το πέρας της μεταγραφής. Το 5' άκρο του mRNA τροποποιείται αμέσως μετά την εμφάνισή του εξαιτίας της προσθήκης μίας «καλύπτρας». Η

καλύπτρα αυτή ασφαρίζει το 5' άκρο και σχηματίζεται με την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου γουανοσίνης (G) στην ακραία βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού. Στη συνέχεια, 1-3 μεθυλομάδες προστίθενται στη βάση ή στη ριβόζη της καινούργιας ακραίας γουανοσίνης. Το 3' άκρο, τροποποιείται εξαιτίας της προσθήκης μίας σειράς νουκλεοτιδίων αδενυλικού οξέος [πολυαδενυλικό οξύ ή poly(A)]. Αν και μόνο αν έχουν πραγματοποιηθεί οι προαναφερθείσες τροποποιήσεις, το mRNA μπορεί να εξέλθει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί [4].

Υπάρχουν 2 βασικά μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNAs του *S.cerevisiae* στο κυτταρόπλασμα [Εικόνα 1].

Πρώτο στάδιο και των δύο είναι η απαδενυλίωση της poly(A) ουράς. Μετά την δράση των απαδενυλασών η αποικοδόμηση μπορεί να ακολουθήσει ένα από τα δύο εξής μονοπάτια. Το πρώτο αφορά απευθείας αποικοδόμηση του mRNA μέσω 3'→5' εξωνουκλεασών ενώ το δεύτερο ξεκινά με την ενεργοποίηση της αφαίρεσης της 5' καλύπτρας, και συνεχίζει με την αποικοδόμηση του mRNA μέσω 5'→3' εξωνουκλεασών. Τα δύο μονοπάτια που αναφέρθηκαν παρουσιάζονται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα και αμέσως μετά ακολουθεί εκτενέστερη ανάλυσή τους.



❖ Απαδενυλίωση mRNAs

Η απαδενυλίωση πραγματοποιείται από δύο πρωτεϊνικά σύμπλοκα: το Ccr4/Pop2/Not σύμπλοκο και το Pan2/Pan3 σύμπλοκο [2,3].

Το κύριο σύμπλοκο απαδενυλίωσης είναι το Ccr4/Pop2/Not, με καταλυτικές υπομονάδες τις 3'→5' εξωνουκλεάσες Ccr4 (μέλος της οικογένειας των ExoIII εξωνουκλεασών) και Pop2 (μέλος της οικογένειας RNaseD). Οι Ccr4 και Pop2 αλληλεπιδρούν μέσω μιας πλούσιας σε λυσίνη (leucine) περιοχής [7], αλλά έχει βρεθεί ότι η κύρια καταλυτική μονάδα είναι η Ccr4. Μεταλλαγές στην καταλυτική περιοχή της Pop2 δεν επηρεάζουν την απαδενυλίωση μεταγράφων-μαρτύρων (reporter transcripts) [6], μία παρατήρηση που υποδεικνύει ότι πιθανόν η Pop2 να λειτουργεί σαν απαδενυλάση υπό συγκεκριμένες συνθήκες ή σε συγκεκριμένα mRNAs. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του συμπλόκου Ccr4/Pop2/Not (Not1, Not2, Not3, Not4, Not5, Caf40 και Caf130) λειτουργούν βοηθητικά ώστε το σύμπλοκο να λάβει την κατάλληλη διαμόρφωση και να δράσουν οι απαδενυλάσες [5,6]. Είναι ακόμα πιθανό ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες «προσαρμόζουν» τις καταλυτικές υπομονάδες στα διάφορα mRNAs με τη βοήθεια πρωτεϊνών - προσαρμοστών (adaptor proteins)[6].

Το άλλο σύμπλοκο απαδενυλίωσης που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα είναι το Pan2/Pan3, με καταλυτική μονάδα την Pan2 (μέλος της οικογένειας RNase D). Η δράση της Pan2 ενεργοποιείται από μία άλλη πρωτεΐνη την Pab1, η οποία συνδέεται στην poly(A) ουρά των mRNAs και εμπλέκεται στον έλεγχο του μήκους της[7].

Ένα πιθανό μοντέλο είναι ότι αρχικά, η Pab1 προσδένεται στα 65 πρώτα κατάλοιπα της poly(A) ουράς, ενώ το 3' άκρο παραμένει εκτεθειμένο και αποικοδομείται από το Pan2/Pan3 σύμπλοκο. Το Pan2 σταματάει την αποικοδόμηση της poly(A) ουράς όταν αυτή έχει φτάσει περίπου σε μήκος 25 καταλοίπων (A). Αυτό είναι πιθανότατα και το ελάχιστο μήκος στο οποίο η Pab1 δεν μπορεί να συνδεθεί στην poly(A) ουρά και επομένως η δράση της Pan2 είναι περιορισμένη[5,8]. Σε αυτό το σημείο το σύμπλοκο Ccr4/Pop2/Not οδηγεί σε γρήγορη απαδενυλίωση (με πιο αυξημένο ρυθμό σε σχέση με την απαδενυλίωση της Pan2) της poly(A) ουράς, μέχρι να φτάσει στο ελάχιστο μήκος των 10-12 καταλοίπων. Στη συνέχεια, η Ccr4 αποδεσμεύεται και στο 3' άκρο μπορεί να προσδεθεί το Pat1/Lsm1-

7 σύμπλοκο, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την αφαίρεση της καλύπτρας[9].

Μετά την απαδενυλίωση, το 3' άκρο του mRNA είναι εκτεθειμένο και μπορεί να υποστεί 3'→5' αποικοδόμηση μέσω του συμπλόκου: εξώσωμα (exosome). Το exosome αποτελείται από 10 πρωτεΐνες: 6 της οικογένειας RNase PH[14], 3 μικρές πρωτεΐνες πρόσδεσης σε RNA οι οποίες σχηματίζουν μία δομή δακτυλίου ανάλογη με τη βακτηριακή PNPase[15], και την Rrp44/Dis3, η οποία δρα και σαν ενδονουκλεάση και σαν εξωνουκλεάση[16]. Για την αποικοδόμηση των κυτταροπλασματικών mRNAs, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση του exosome με τις πρωτεΐνες Ski, οι οποίες χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να ξετυλίξουν το mRNA από πιθανά άλλα σύμπλοκα που είναι δεσμευμένα σε αυτό και να το παραδώσουν με εκτεθειμένο το 3' άκρο στο exosome.

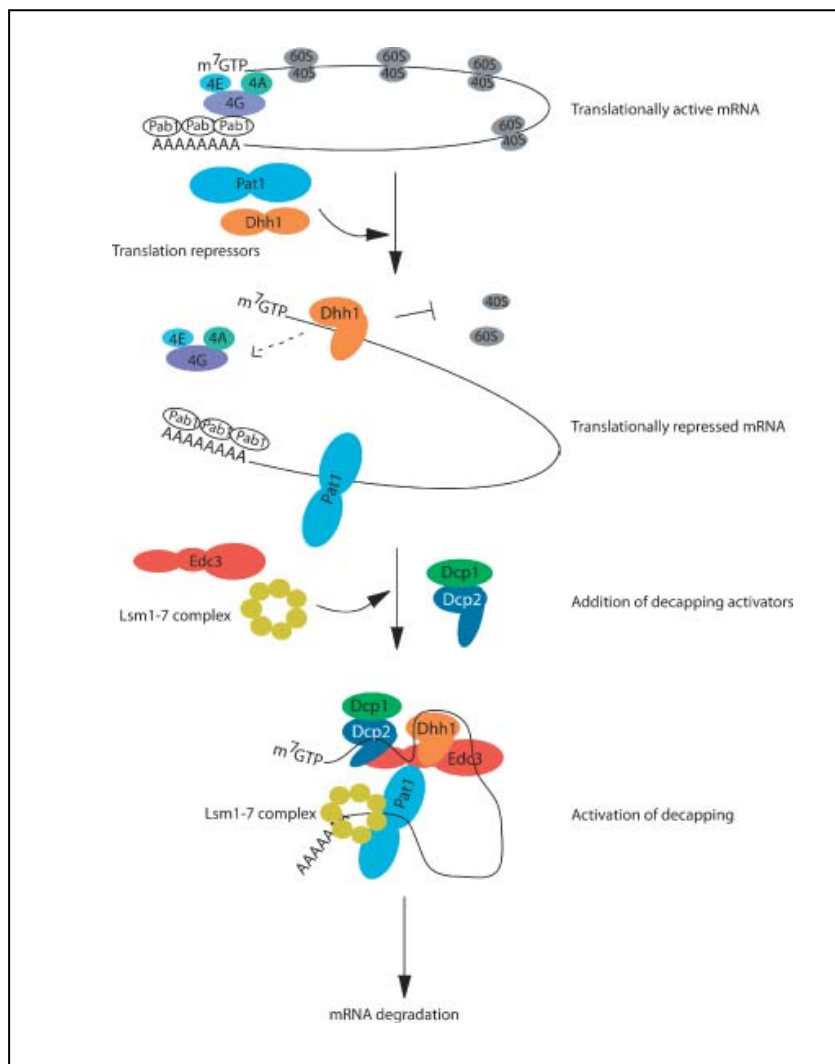
❖ Αφαίρεση της 5' καλύπτρας των mRNAs (Decapping) και 5'→3' αποικοδόμηση

Το κύριο σύμπλοκο αφαίρεσης της καλύπτρας είναι το Dcp1/Dcp2, με καταλυτική υπομονάδα τη Dcp2 (μέλος της οικογένειας πυροφωσφατασών Nudix). Η Dcp2 κόβει τη δομή της καλύπτρας απελευθερώνοντας την ακραία βάση γουανοσίνης (m7GDP) και το 5' μονοφωσφορικό mRNA. Η Dcp1 (μέλος της οικογένειας Ena/Vasp Homology πρωτεϊνών) αλληλεπιδρά με τη Dcp2 και προάγει την καταλυτική της δράση. Το ολοένζυμο "Dcp1/Dcp2" έχει μεγαλύτερη συγγένεια για μεγάλου μήκους mRNAs in vitro, πράγμα το οποίο είναι σύμφωνο με το ότι η Dcp2 φέρει θέση πρόσδεσης σε RNA, προσδέεται σε αυτό και ολισθαίνει έως ότου φτάσει στη θέση της καλύπτρας[10]. Τα κύτταρα του σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae*) εκφράζουν και κάποια άλλα ένζυμα αφαίρεσης της καλύπτρας, τα Dcs1 και Dcs2 (μέλη της οικογένειας πυροφωσφατασών HIT), τα οποία έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για μικρά RNA υποστρώματα. Επίσης, τα κύτταρα ζύμης εκφράζουν και μία πυρηνική ενδονουκλεάση, τη Rai1, η οποία κόβει κοντά στην 5' καλύπτρα, λειτουργώντας σαν ποιοτικός μηχανισμός ελέγχου κατά τη διάρκεια προσθήκης της καλύπτρας στα πρόδρομα mRNAs [11].

Η αφαίρεση της καλύπτρας διεγείρεται από πολλούς παράγοντες. Η Dhh1 (μέλος της οικογένειας ATPασών DEAD) είναι μία RNA ελικάση, η οποία αναστέλλει την μετάφραση in vitro και in vivo, και η υπερέκφρασή της σε κύτταρα οδηγεί στη συγκρότηση κυτταροπλασματικών συμπλόκων mRNA-πρωτεϊνών (mRNP granules)[12,13]. Τα mRNP granules, όπως θα αναλυθεί παρακάτω μπορεί να είναι p-bodies ή stress granules. Η Pat1 λειτουργεί ως

πρωτεΐνη-ικρίωμα για την προσέλκυση πρωτεϊνικών συμπλόκων αφαίρεσης της καλύπτρας. Η Pat1 αλληλεπιδρά με τον επταμερή δακτύλιο που σχηματίζει το σύμπλοκο Lsm1-7 δεσμεύοντας το 3' άκρο απαδενυλιωμένων mRNAs. Το Lsm1-7 σύμπλοκο οδηγεί σε αλλαγή διαμόρφωσης της Pat1 έτσι ώστε αυτή να μπορεί να προσδέσει και να ενεργοποιήσει άμεσα τη Dcp2. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το decapping είναι η Edc3, η οποία προσδένεται και διεγείρει άμεσα την Dcp2.

Λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία επηρεάζουν την αφαίρεση της καλύπτρας, είναι δύσκολο να καθοριστεί η σειρά των βημάτων που οδηγούν στο decapping. Ένα πιθανό μοντέλο μπορεί να είναι το εξής: Αρχικά, δεδομένου ότι έχει προηγηθεί απαδενυλίωση του mRNA, αποδεσμεύονται από την καλύπτρα οι κυτταροπλασματικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης: eIF4E και eIF4G. Το επόμενο βήμα είναι η συναρμολόγηση των decapping παραγόντων μαζί με τους ενεργοποιητές του. Μετά την ενεργοποίηση της Dcp2 αφαιρείται η καλύπτρα και το 5' άκρο είναι εκτεθειμένο, με αποτέλεσμα να αποικοδομείται από την κυτταροπλασματική 5'→3' εξωνουκλεάση Xrn1 (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Πιθανό μοντέλο καταστολής της μετάφρασης και ενεργοποίησης αφαίρεσης της καλύπτρας των mRNAs. Οι

❖ Ειδ
Στα
αποικο
παρεκκ

πρωτεΐνες Dhh1 και Pat1 οδηγούν στην καταστολή της μετάφρασης. Ακολουθεί στρατολόγηση των συμπλόκων που ενεργοποιούν την αφαίρεση της καλύπτρας (Ling SH, 2010, *Wiley Interdiscip Rev RNA*)

οπάτια
τώσεις

Χωρίς νόημα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (Nonsense-mediated decay)

Ο μηχανισμός “Nonsense mediated decay” αφορά mRNAs τα οποία παρουσιάζουν πρόβλημα στον τερματισμό της μετάφρασης. Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν οι πρωτεΐνες Upf1, Upf2, Upf3, οι οποίες αναγνωρίζουν mRNAs με πρόωρα κωδικόνια λήξης και οδηγούν στη στρατολόγηση των decapping συμπλόκων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ανεξάρτητη από απαδενυλίωση αφαίρεση της καλύπτρας, η οποία ακολουθείται από 5’→3’ αποικοδόμηση[17].

No-go decay

Ο μηχανισμός “No-go decay”, αφορά mRNAs στα οποία έχει γίνει αναστολή της μετάφρασης (εμποδίζεται η επιμήκυνση) λόγω

δευτεροταγών δομών στα mRNAs. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι ενεργοποιούνται όταν έχει εμποδιστεί η μεταφραστική επιμήκυνση και κόβουν το mRNA εσωτερικά (συμμετοχή ενδονουκλεασών). Το 3'mRNA τμήμα που προκύπτει υφίσταται 5'→3' αποικοδόμηση από την Xrn1, ενώ το 5'mRNA τμήμα που προκύπτει υφίσταται 3'→5' αποικοδόμηση από το exosome[18].

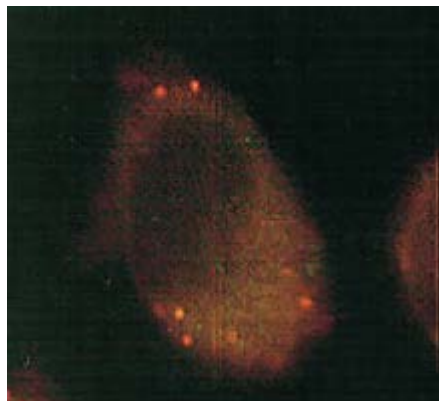
Non-stop decay

Ο μηχανισμός “Non-stop decay” οδηγεί σε γρήγορη αποικοδόμηση mRNAs που δεν έχουν κωδικόνια λήξης της μετάφρασης. Αυτό γίνεται με τη συμμετοχή του exosome και των βοηθητικών πρωτεϊνών Ski7, Ski2, Ski3 και Ski8. Διαφέρει από τον κλασικό μηχανισμό 3'→5' αποικοδόμησης, διότι στο non-stop decay η υπομονάδα Rrp44 του exosome δρα και ως ενδονουκλεάση και ως 3'→5' εξωνουκλεάση, ενώ στο κλασικό μονοπάτι δρα μόνο ως εξωνουκλεάση[19].

1.2 ΣΩΜΑΤΙΑ P (processing bodies ή p-bodies)

❖ Η ανακάλυψη των p-bodies

Τα σωμάτια p ή αλλιώς p-bodies αποτελούν συσσωματώματα mRNAs σταματημένων στη μετάφραση, μαζί με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναστολή της μετάφρασης και στην αποικοδόμηση των RNAs. Στο οπτικό μικροσκόπιο γίνονται διακριτά ως μικρές κυτταροπλασματικές εστίες. Τα p-bodies ανακαλύφθηκαν πριν από περίπου μία δεκαετία (1997) από τον Bashkirov[20], ο οποίος παρατήρησε ότι η εξωριβονουκλεάση Xrn1 των θηλαστικών εντοπίζεται σε διακριτά σημεία στο κυτταρόπλασμα ινοβλαστών από κυτταρικές σειρές ποντικού[Εικόνα 3].



Εικόνα 3: Εντοπισμός της εξωριβονουκλεάσης Xrn1 σε κύτταρα ποντικού μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού (Bashkirov. V. et al, 1997, The Journal of cell biology)

Η σημασία αυτών των κυτταροπλασματικών κοκκίων έγινε αντιληπτή όταν βρέθηκε ότι πολλά ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των mRNAs συνεντοπίζονται στα ίδια σημεία του κυτταροπλάσματος.

❖ Συστατικά των p-bodies-Ρόλος

Τα συστατικά των p-bodies στον σακχαρομύκητα μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε 3 τάξεις: 1) πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αφαίρεση της καλύπτρας των mRNAs (Dcp1/Dcp2 σύμπλοκο), 2) πρωτεΐνες που διεγείρουν την αφαίρεση της καλύπτρας (Dhh1, Pat1, Scd, Edc3, Lsm1-7, και 3) η 5'→3' εξωνουκλεάση Xrn1. Επίσης, το σύμπλοκο Ccr4/Pop2/Not συγκεντρώνεται στα p-bodies των θηλαστικών [21] αλλά και σε μεταλλάγματα ζύμης, στα οποία οι δομές των p-bodies εμφανίζονται μεγαλύτερες [22]. Τα p-bodies περιέχουν επίσης πρωτεΐνες που περιορίζονται σε συγκεκριμένους οργανισμούς ή επηρεάζουν συγκεκριμένα είδη mRNAs. Για παράδειγμα, τα p-bodies των μεταζώων περιλαμβάνουν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στο μηχανισμό RNA σίγησης των miRNAs, ένας μηχανισμός ο οποίος απουσιάζει από τα κύτταρα ζύμης. Εκτός από αυτό, κάποιες πρωτεΐνες, όπως αυτές που συμμετέχουν στο μηχανισμό “Nonsense-mediated decay” παρατηρούνται μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις στα p-bodies: σε συγκεκριμένα μεταλλαγμένα στελέχη ή σε συνθήκες stress.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το κύριο συστατικό των p-bodies είναι τα mRNAs, τα οποία είναι απαραίτητα για τη συγκρότησή τους. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι επεξεργασία ημικαθαρισμένων p-bodies με RNase A, οδηγεί σε διάσπαση των p-bodies [23]. Επομένως, το μέγεθος και ο αριθμός των p-bodies είναι ανάλογος με την κυτταροπλασματική δεξαμενή των μη μεταφραζόμενων mRNAs συνδεδεμένων με συστατικά των p-bodies. Αυτή την άποψη επιβεβαιώνουν μελέτες που έδειξαν ότι υπερέκφραση κάποιων mRNA-μαρτύρων (markers) οδηγεί σε αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των p-bodies [23].

Ο κύριος ρόλος των p-bodies είναι η αφαίρεση της καλύπτρας και η αποικοδόμηση των mRNAs που έχουν ενσωματώσει. Αυτό έχει αποδειχθεί από διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, όπως θα αναφερθούν παρακάτω. Καταρχάς, το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνικών συστατικών των p-bodies αφορούν παράγοντες που συμμετέχουν στα γενικά μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNAs. Επιπλέον, όταν ένα mRNA «παγιδευτεί» στη διαδικασία της

αποικοδόμησης, είτε λόγω προσθήκης (εξωγενούς) δευτεροταγούς δομής (polyG) στη 3' αμετάφραστη περιοχή(UTR), είτε λόγω απενεργοποίησης της Xrn1, το ενδιάμεσο σύμπλοκο αποικοδόμησης εντοπίζεται στα p-bodies[24]. Ένα τρίτο στοιχείο είναι πως οποιαδήποτε διαταραχή στη διαδικασία αποικοδόμησης των mRNAs επηρεάζει άμεσα το μέγεθος, καθώς και τον αριθμό των p-bodies. Για παράδειγμα, όταν τα mRNAs παγιδεύονται στη μορφή πολυσωμάτων (δομή που προκύπτει όταν πολλά ριβοσώματα είναι συνδεδεμένα σε ένα μόριο mRNA και το μεταφράζουν), τα p-bodies μειώνονται σε μέγεθος, εφόσον τα mRNAs είναι κατειλημμένα από τα ριβοσώματα, δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με παράγοντες αποικοδόμησης και επομένως δεν μπορούν να συγκροτηθούν εκ νέου p-bodies. [24,25,26]. Αντίθετα, όταν αναστέλλονται τα καταλυτικά βήματα αφαίρεσης της καλύπτρας ή 5'→3' εξωνουκλεολυτικής πέψης, τότε τα p-bodies σε κύτταρα ζύμης και θηλαστικών αυξάνονται σε μέγεθος[24,27]. Παρόλα αυτά, τα mRNAs που ενσωματώνονται στα p-bodies, υπάρχει πιθανότητα να μην αποικοδομηθούν αλλά να επιστρέψουν στα ριβοσώματα για μετάφραση.

Σε κύτταρα ζύμης που βρίσκονται σε στατική φάση(stationary phase), περίοδος η οποία θεωρητικά χαρακτηρίζεται από την απουσία γλυκόζης, παρατηρούνται μεγάλα p-bodies. Στη περίπτωση αυτή, τα mRNAs που έχουν ενσωματωθεί στα p-bodies, απελευθερώνονται από αυτά και υπόκεινται μετάφραση όταν προστεθεί θρεπτικό υλικό στην καλλιέργεια.

❖ P-bodies και Stress granules: κύκλος των mRNAs

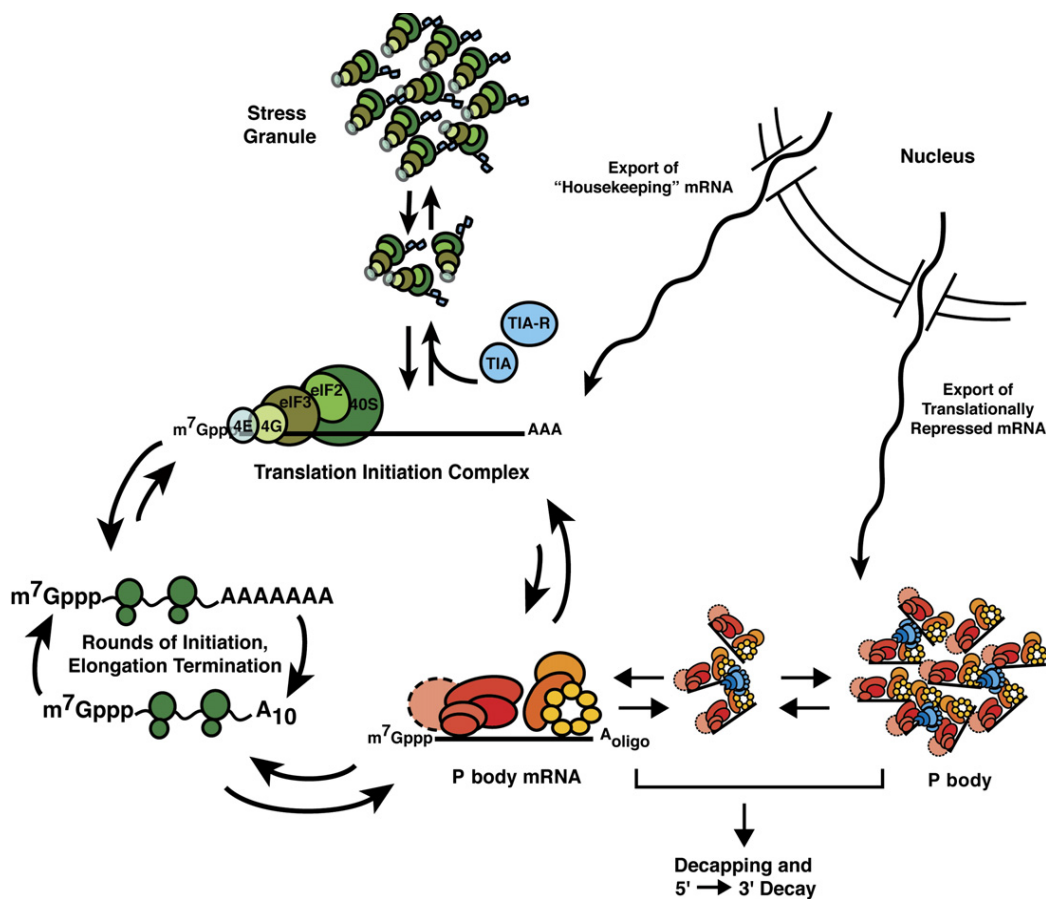
Εκτός από τα p-bodies, τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν και κάποια άλλα κοκκία RNAs, τα στρες-κοκκία ή αλλιώς stress granules. Τα stress granules είναι συσσωματώματα μη μεταφραζόμενων mRNAs, σε σύμπλοκα με πρωτεϊνικούς παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, και eIF2), τη 40s ριβοσωμική υπομονάδα καθώς και την πρωτεΐνη Pab1 (polyA binding protein)[28]. Τα stress granules σχηματίζονται ως απόκριση σε περίπτωση διαταραχών κατά την έναρξη της μετάφρασης, όπως για παράδειγμα μειωμένη λειτουργία των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης eIF2, eIF4A, ή eIF4G[29]. Μέσω τεχνικών αποκατάστασης φθορισμού έπειτα από φωτολευκάνση (Fluorescence Recovery After Photobleaching-FRAP), έχει βρεθεί ότι τα συστατικά των stress granules είναι δυναμικά και εξαφανίζονται αν τα κύτταρα επεξεργαστούν με παράγοντες που αναστέλλουν την επιμήκυνση της μετάφρασης[30]. Το γεγονός ότι τα stress granules σχηματίζονται ακόμα και όταν ο παράγοντας eIF4G (δρα πολύ νωρίς κατά την

έναρξη της μετάφρασης) είναι περιορισμένος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι απαραίτητο να έχει σχηματιστεί σταθερό σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης για να ενσωματωθεί το mRNA σε stress granules[31]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα stress granules και τα p-bodies αλληλεπιδρούν φυσικά και ότι τα mRNAs μπορεί να κινούνται μεταξύ των 2 συσσωματωμάτων[30]. Είναι σημαντικό ωστόσο να αναφερθεί ότι κάποιες πρωτεΐνες εντοπίζονται και στα δύο συσσωματώματα (p-bodies και stress granules): FAST, XRN1, eIF4E, CPEB, και TTP.

Αυτό που συμβαίνει στην πραγματικότητα είναι ότι επειδή τα mRNAs είναι γενικά ασταθή μόρια, από τη στιγμή που θα βγουν από τον πυρήνα «παραλαμβάνονται» από τα ριβοσώματα και εισέρχονται σε ένα νοητό κύκλο όπου από τα ριβοσώματα μπορούν να πηγαίνουν στα p-bodies ή στα stress granules, να επιστρέφουν στα ριβοσώματα, κ.ο.κ..

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4, όταν τα mRNAs βρίσκονται στη μορφή των πολυσωμάτων, υπόκεινται σε διαδοχικούς κύκλους «έναρξης→επιμήκυνσης→τερματισμού» της μετάφρασης, παράγοντας πολυπεπίδια. Διαταραχές στην έναρξη της μετάφρασης και/ή στον τερματισμό, οδηγούν σε αλληλεπίδραση των mRNAs με συστατικά που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η διαδικασία της μετάφρασης. Μ' αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται τα mRNPs (mRNAs σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες) τα οποία μπορούν στη συνέχεια να οδηγήσουν στη συγκρότηση των p-bodies. Τα mRNAs που αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα καταστολής/αποικοδόμησης είναι πιθανό να υποστούν αφαίρεση της καλύπτρας και 5' →3' αποικοδόμηση, να παραμείνουν στο p-body(αποθήκευση) ή να εξέλθουν από αυτό και να εισέλθουν εκ νέου στον κύκλο της μετάφρασης. Τα stress granules πιθανόν να αποτελούν σημεία έναρξης της μετάφρασης, τα οποία αυξάνονται όταν τα mRNAs «παγιδεύονται» κατά τη διάρκεια της έναρξης. Μετά από αναστολή της μετάφρασης, κάποια mRNAs πιθανόν να συνδέονται με παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν την συγκέντρωση σε stress granules, προάγοντας έτσι την επιστροφή στα πολυσώματα. Είναι αξιοσημείωτο ακόμα το γεγονός ότι υπάρχει κατά κάποιο τρόπο συγκεκριμένη κατεύθυνση των mRNAs κατά την έξοδό τους από τον πυρήνα, ανάλογα αν αυτά εκφράζονται ιδιοσυστατικά ή όχι.





Εικόνα 4: Ένα μοντέλο για τον κύκλο των mRNAs σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Τα ιδιοσυστατικά mRNAs, μετά την έξοδό τους από τον πυρήνα, παραλαμβάνονται από τα ριβοσώματα και υφίστανται διαδοχικούς κύκλους μετάφρασης, ενώ τα mRNAs που υπόκεινται σε έλεγχο της μετάφρασης παραλαμβάνονται από τα p-bodies και μπορούν να αποδεσμευτούν από αυτά και να συνδεθούν σε πολυσώματα. Σε περίπτωση αναστολής της έναρξης της μετάφρασης, τα mRNAs τα οποία είναι συνδεδεμένα με μεταφραστικούς παράγοντες, συγκεντρώνονται στα p-bodies μέχρι οι συνθήκες να ξαναγίνουν ευνοϊκές. (Parker, R. et al, 2012, *Genetics*)

Τα ιδιοσυστατικά mRNAs (housekeeping mRNAs) είναι πιο πιθανό να συνδέονται απευθείας με πολυσώματα και να μεταφράζονται. Αντίθετα, mRNAs που υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο έκφρασης, τείνουν να συνδέονται με κάποιους συγκεκριμένους παράγοντες στον πυρήνα, οι οποίοι τα οδηγούν στα p-bodies, εξασφαλίζοντας έτσι ακόμα πιο ισχυρό έλεγχο έκφρασης. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες Dhh1 και Pat1 σε κύτταρα ζύμης αλληλεπιδρούν με παράγοντες υπεύθυνους για την έξοδο mRNA από τον πυρήνα [32,33].

Ο κύκλος αυτός των mRNAs σε ξεχωριστά διαμερίσματα στο κυτταρόπλασμα επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την «τύχη» των mRNAs και τη λειτουργικότητά τους. Αρχικά, το γεγονός ότι το σύμπλοκο

αφαίρεσης της καλύπτρας (Dcp1/Dcp2) είναι ενεργό μόνο όταν ενωθεί με άλλα όμοια σύμπλοκα σε ένα μεγάλο mRNP (p-body), δείχνει ότι στο κύτταρο υπάρχει διαμερισματοποίηση με αποτέλεσμα η μηχανή αποικοδόμησης να βρίσκεται σε διαφορετικό σημείο από τα λειτουργικά mRNAs και να αποτρέπεται η τυχόν αποικοδόμηση των τελευταίων. Επιπροσθέτως, η μετάβαση των mRNAs από τα p-bodies στα πολυσώματα, πιθανότατα να εξυπηρετεί και αποκατάσταση της μετάφρασης σε mRNAs που είχαν συνδεθεί με κατεστραμμένα μεταφραστικά σύμπλοκα. Πιο συγκεκριμένα, αν οι παράγοντες μετάφρασης γίνουν μη λειτουργικοί για κάποιο λόγο, το mRNA θα μεταβεί σε ένα p-body, θα αφαιρεθεί το κατεστραμμένο σύμπλοκο μετάφρασης, θα εξέλθει από το p-body και θα συνδεθεί με ένα λειτουργικό σύμπλοκο μεταφραστικών παραγόντων. Έτσι λοιπόν, ο κύκλος των mRNAs μέσω των p-bodies, θυμίζει σε μεγάλο βαθμό την πορεία μιας μη σωστά διπλωμένης πρωτεΐνης από τις πρωτεΐνες συνοδούς-σαπερόνες: είτε η πρωτεΐνη θα διπλωθεί σωστά και θα εξέλθει λειτουργική, είτε θα σημειωθεί για αποικοδόμηση[34].

❖ P-bodies και πρωτεΐνες θερμοπληξίας

Όταν το κύτταρο υποστεί κάποιο περιβαλλοντικό stress (όπως θερμικό σοκ/46°C), ανταποκρίνεται άμεσα διακόπτοντας τις διαδικασίες της μετάφρασης, εξοικονομώντας κατ' αυτό τον τρόπο ενέργεια. Με τη διακοπή της μετάφρασης, αυξάνεται η συγκέντρωση μη μεταφρασμένων mRNAs στο κυτταρόπλασμα, τα οποία συνδέονται με σύμπλοκα παραγόντων αποικοδόμησης και οδηγούν σε σχηματισμό p-bodies. Οι μηχανισμοί για το πώς τα συστατικά των p-bodies συγκεντρώνονται και για το πώς διασπώνται παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι. Το γεγονός ότι σε κύτταρα ζύμης τα p-bodies σχηματίζονται και διασπώνται μέσα σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα, οδηγεί στη διαπίστωση ότι πιθανόν συμμετέχουν κάποιοι επιπρόσθετοι παράγοντες, όπως οι μοριακοί συνοδοί (chaperones), οι οποίοι βοηθούν στη συσσωμάτωση καθώς επίσης και στη διάλυση των παραγόντων αποικοδόμησης. Η αλληλεπίδραση των p-bodies με chaperones θα μπορούσε να εξακριβωθεί εξετάζοντας αν η υπερέκφραση ή η απώλεια κάποιων chaperones επηρεάζει τη δυναμική των p-bodies. Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει για παράδειγμα, ότι η πρωτεΐνη θερμοπληξίας hsp90 εμπλέκεται στο σχηματισμό των p-bodies και stress granules[35].

1.3 Πρωτεΐνες θερμοπληξίας (Heatshock proteins)

Η έκθεση των κυττάρων σε στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι οι ακραίες θερμοκρασίες, η ακτινοβολία, η αυξημένη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων κλπ.(Πίνακας 1), οδηγεί σε μία ταχύτατη αλλαγή

της γονιδιακής έκφρασης. Αυτή η αλλαγή επιτυγχάνεται, εν μέρει, με μία γενική αναστολή των διαδικασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης, αλλά ταυτόχρονα όμως, παρατηρείται αύξηση στην έκφραση μίας μικρής ομάδας πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται πρωτεΐνες θερμοπληξίας (ή heat shock πρωτεΐνες) και είναι ευρύτερα γνωστές ως μοριακοί συνοδοί[36].

Πίνακας 1: Συνθήκες στις οποίες επάγεται η έκφραση των πρωτεϊνών θερμοπληξίας

- | | |
|-------------------------------------|---|
| • Υψηλή θερμοκρασία(heat shock) | • Εξάντληση γλυκόζης |
| • Χαμηλή θερμοκρασία(cold shock) | • Χαμηλά επίπεδα ATP |
| • Υπεριώδης ακτινοβολία (uv) | • Ωσμωτικό σοκ |
| • Νέφος ηλεκτρονίων | • Αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού Ca^{2+} |
| • Αιθυλική αλκοόλη | • Τοξίνες |
| • Υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων | • Ιική μόλυνση |
| • Υψηλή οξειδωση ή αναγωγή | |

Οι heatshock πρωτεΐνες ανακαλύφθηκαν μετά από μελέτες της επίδρασης θερμικού σοκ στη *Drosophila melanogaster*[37]. Πρέπει να τονιστεί ότι οι πρωτεΐνες θερμοπληξίας εκφράζονται και σε φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο, αλλά σε περιπτώσεις αντίξωων συνθηκών τα επίπεδα έκφρασης τους αυξάνονται σημαντικά. Η εναλλασσόμενη αυτή έκφραση οφείλεται στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των heat shock πρωτεϊνών από ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες, τους HSFs (Heat shock Factors). Οι heatshock πρωτεΐνες αποτελούν μία «υπεροικογένεια» πρωτεϊνών, υψηλά συντηρημένων κατά την εξέλιξη, που ταξινομούνται σε υποοικογένειες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, διακρίνονται σε οικογένειες των 100kDa, 90kDa, 70kDa, 60kDa, 40kDa και την οικογένεια των μικρών heat shock πρωτεϊνών (small Hsps). Οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν μέλη που λειτουργούν είτε ως μοριακοί συνοδοί, δηλαδή πρωτεϊνικά μόρια που συνεργάζονται και βοηθούν άλλες πρωτεΐνες στην αναδίπλωση, μεταφορά και σχηματισμό συμπλεγμάτων, είτε ως πρωτεάσες, όπως το εξαρτώμενο από την ουμπικουϊτίνη πρωτεάσωμα, εξασφαλίζοντας την αποτελεσματική αποικοδόμηση και την παρεμπόδιση του σχηματισμού συσσωματωμάτων βραχύβιων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

❖ Μικρές Πρωτεΐνες θερμοπληξίας (small Heat shock proteins)

Τα μέλη της οικογένειας μικρών πρωτεϊνών θερμοπληξίας (sHsps) θεωρούνται ανεξάρτητες από ATP chaperones, οι οποίες δεν εμπλέκονται οι ίδιες στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Η κύρια λειτουργία τους είναι να προλαμβάνουν τη συσσωμάτωση και την κατακρήμνιση αποδιατεταγμένων ή μη σωστά αναδιπλωμένων (misfolded) πρωτεϊνών υπό συνθήκες κυτταρικού στρες. Για αυτό τον λόγο θεωρείται ότι οι sHsps δημιουργούν ένα είδος «αποθέματος» μετουσιωμένων, αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, οι οποίες είναι δυνατόν να αναδιπλωθούν παρουσία εξαρτημένων από ATP chaperones [42,43]. Το γεγονός ότι για την λειτουργία τους δεν απαιτούν κατανάλωση ATP, καθιστά τις sHsps έναν αποτελεσματικό αμυντικό μηχανισμό των κυττάρων υπό συνθήκες stress, κάτω από τις οποίες η συμμετοχή ATP εξαρτώμενων πρωτεϊνών θα κόστιζε στο κύτταρο μεγάλα ποσά ενέργειας. Μελέτες έχουν δείξει ότι φυσιολογικές συγκεντρώσεις ATP οδηγούν σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των sHsps και σε περαιτέρω απελευθέρωση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών με τις οποίες βρίσκονται σε σύμπλοκο[44]. Όσο για τη διαμόρφωσή τους, οι περισσότερες από αυτές, σχηματίζουν δυναμικές ολιγομερείς δομές (κυμαίνονται από 9 έως και 50 υπομονάδες ανάλογα με την πρωτεΐνη) και έχουν μία συντηρημένη επικράτεια στο καρβοξυτελικό άκρο τους. Οι αμινοτελικές περιοχές των sHsps διαφέρουν σημαντικά τόσο στην αλληλουχία όσο και στο μέγεθος. Η συντηρημένη καρβοξυτελική επικράτεια 90 περίπου αμινοξέων, ονομάζεται «επικράτεια α-κρυσταλλίνη» (alpha crystalline domain) και είναι ομόλογη των α-κρυσταλλινών που συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος πρωτεϊνών του φακού του ματιού στον άνθρωπο. Το επιστημονικό ενδιαφέρον για τις sHsps αυξήθηκε ιδιαίτερα όταν βρέθηκε ότι εμπλέκονται στην πρόκληση σοβαρών ασθενειών του ανθρώπου, όπως είναι ο καταρράκτης του ματιού, καθώς και καρδιαγγειακές παθήσεις. Τέτοιου είδους ασθένειες χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων πρωτεϊνών λόγω της μειωμένης ή μηδενικής δράσης των sHsps[47]. Ο ρόλος των α-κρυσταλλινών είναι να εμποδίζουν τη συσσωμάτωση και την καθίζηση πρωτεϊνών του φακού, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε καταρράκτη. Ο μηχανισμός προστασίας περιλαμβάνει την απλή σύζευξη των ήδη μερικά εκφυλισμένων πολυπεπτιδίων στο υδρόφοβο τμήμα της α-κρυσταλλίνης, με μία στοιχειομετρία ενός πολυπεπτιδίου ανά υπομονάδα. Η επιφάνεια της α-κρυσταλλίνης είναι πιο υδρόφοβη από εκείνη των περισσότερων πρωτεϊνών. Η σύζευξη πιθανόν να περιλαμβάνει εκτεθειμένα τμήματα της περιοχής του αμινοτελικού άκρου.

❖ Πρωτεΐνη θερμοπληξίας 26 (Hsp26)-Γενικά χαρακτηριστικά

Στον σακχαρομύκητα εκφράζονται 7 sHsps, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι Hsp26 και Hsp42. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό όταν τα κύτταρα ζύμης υποστούν heat shock ή κατά τη διάρκεια μετάβασης από εκθετική σε στατική φάση καλλιέργειας. Εκτός από αυτό, μεταλλαγμένα κύτταρα ζύμης στα οποία έχει γίνει απαλοιφή των γονιδίων hsp26 και hsp42 δεν παρουσιάζουν συμπτώματα θερμοευαισθησίας, αλλά παρόλα αυτά χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Τα υποστρώματα-στόχοι των δύο πρωτεϊνών επικαλύπτονται κατά 90%. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ειδικά η Hsp26 κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης του ζυμομύκητα σε πλούσιο θρεπτικό μέσο, παρουσιάζει μηδενική έκφραση (μη ανιχνεύσιμα μετάγραφα) και αρχίζει να εκφράζεται μόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες: θερμικό σοκ, ωσμωτικό σοκ, σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, εξάντληση πηγής αζώτου, εξάντληση πηγής άνθρακα, οξειδωτικό στρες, χαμηλό pH[39]. Υπό αυτές τις συνθήκες, η έκφραση της hsp26 ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Hsf1 και Msn2p/Msn4p, οι οποίοι προσδένουν στοιχεία θερμικού σοκ και στοιχεία στρες, αντίστοιχα, στον υποκινητή του γονιδίου της hsp26[41]. Ένα προτεινόμενο μοντέλο για την δράση της Hsp26 είναι το εξής: Στην περίπτωση στην οποία έχει ήδη εκφραστεί, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η hsp26 συγκεντρώνεται σε μεγάλα 24-μερή σύμπλοκα, τα οποία αποτελούν την ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης. Κατά το heat shock, το 24-μερές σύμπλοκο διασπάται σε ενεργά διμερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα και «αναζητά» στο κυτταρόπλασμα αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέονται τα διμερή, είτε από αυτά αυθόρμητα, είτε με τη βοήθεια άλλων chaperones, όπως η Hsp70, οι οποίες βοηθάνε και στην περαιτέρω αναδίπλωσή τους. Όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές, τα διμερή συγκεντρώνονται σχηματίζοντας πάλι το 24-μερές σύμπλοκο[45]. Μία άλλη σημαντική παρατήρηση είναι ότι η Hsp26 είναι η μόνη μικρή πρωτεΐνη θερμοπληξίας που έχει επικράτεια πρόσδεσης σε mRNA.

1.4 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει κάποια φυσική ή γενετική αλληλεπίδραση των συστατικών των p-bodies με την πρωτεΐνη θερμοπληξίας hsp26. Η υπόθεσή μας ότι τα p-bodies αλληλεπιδρούν ειδικά με την hsp26 και όχι με κάποια άλλη

πρωτεΐνη θερμοπληξίας στηρίζεται στο γεγονός ότι η heatshock αυτή πρωτεΐνη εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις ίδιες συνθήκες στις οποίες σχηματίζονται τα p-bodies.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

1. Χημικές ουσίες: Χρησιμοποιήθηκαν χημικά των εταιριών SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Merck και FMC Bioproducts.
2. Ένζυμα: Χρησιμοποιήθηκαν θερμοανθεκτικά ένζυμα για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) από τις εταιρίες MINOTECH (Taq Polymerase)
3. Αντισώματα:

4. Μεμβράνες: Η μεταφορά των πρωτεϊνών για ανοσοαποτύπωση κατά Western, πραγματοποιήθηκε σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης Protran (Schleicher and Schuell).
5. Ολιγονουκλεοτίδια: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ (IMBB-FORTH) και από την εταιρία Metabion International AG
6. Χρωστικές: Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική χρώσης του DNA με Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr), σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται από τους Sambrook και Russell στο εργαστηριακό εγχειρίδιο (Sambrook 2001).
7. Θρεπτικά μέσα:
 - YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose): Πλούσιο θρεπτικό μέσο που περιέχει: 2% w/v γλυκόζη (glucose), 1% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 2% w/v πεπτόνης (bacto peptone). Για τις στερεές καλλιέργειες προστίθεται 1% άγαρ
 - YPG (Yeast Extract Peptone Glycerol): θρεπτικό μέσο που περιέχει: 1% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 2% w/v πεπτόνης (bacto peptone) και 3% γλυκερόλη (Glycerol). Για τις στερεές καλλιέργειες προστίθεται 1% άγαρ Το συγκεκριμένο θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε για στερεές καλλιέργειες και συγκεκριμένα για τον έλεγχο petites αποικιών. Κύτταρα που προέρχονται από petites αποικίες, όπως θα αναφερθεί παρακάτω δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε YPG μέσο.
 - YP Medium: φτωχό θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει 1%w/v yeast extract και 2%w/v bacto peptone)
 - DropOut Medium: φτωχό θρεπτικό μέσο το οποίο προκύπτει από minimal medium (2% w/v glucose, 6,7g/L Yeast Nitrogen base w/o amino acids) με την επιπλέον προσθήκη μίγματος αμινοξέων σε μικρές συγκεντρώσεις.
8. Μικροσκόπιο: Μικροσκόπιο: Για τη μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού της εταιρίας Nikon (Nikon Fluorescence Microscope)

2.2 ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα στελέχη *S.cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
BY4742	MATa his3-1 leu2-0 lys2-0 ura3-0	wild type
FT5	MATα, ura3-52, trp I-Δ63, his3-Δ200, leu2::PET56	wild type
Hsp26-GFP	FT5/hsp26:GFP:KanMX2	Προέρχεται από το στέλεχος FT5, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PKT127 (Library)
Hsp26-prGFP	FT5/ hsp26pr:GFP:KanMX2	Στο στέλεχος αυτό εκφράζεται GFP από τον υποκινητή του γονιδίου hsp26 (Library)
Hsp26Δ/BY4742	BY4742/ Hsp26Δ:KanMX	Το ORF του γονιδίου της hsp26 έχει αντικατασταθεί από γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Library)
Dhh1Δ	BY4742/ Dhh1Δ:KanMX	Το ORF του γονιδίου της hsp26 έχει αντικατασταθεί από γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Library)
Dhh1Δ/hsp26pr-GFP	BY4742/Dhh1Δ/hsp26prGFP:HIS5	Προέρχεται από το στέλεχος Dhh1Δ, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pKT128
Arg4-Myc/Hsp26-GFP	Hsp26GFP/Arg4:9Myc:TRP1	Προέρχεται από το στέλεχος Hsp26-GFP, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PYM6
Arg4-Myc/Hsp26pr-GFP	Hsp26prGFP/Arg4:9Myc:TRP1	Προέρχεται από το στέλεχος Hsp26pr-GFP, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PYM6
Htz1-Myc/Hsp26-GFP	Hsp26GFP/Htz1:9Myc:TRP1	Προέρχεται από το στέλεχος Hsp26-GFP, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PYM6

Htz1-Myc/Hsp26pr-GFP	Hsp26prGFP/Htz1:9Myc:TRP1	Προέρχεται από το στέλεχος Hsp26pr-GFP, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PYM6
----------------------	---------------------------	--

2.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- 1) **pKT127**: Optimized cassette for fluorescent protein- GFP tagging. Φέρει το γονίδιο KanMX4 που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (καναμυκίνη)
- 2) **pKT128**: Optimized cassette for fluorescent protein tagging- GFP tagging. Φέρει το γονίδιο βιοσύνθεσης ιστιδίνης His5.
- 3) **PYM6**: pYM6: χρησιμοποιείται για την προσθήκη επιτόπου 9-Myc (μεγέθους 10 kDa). Χρησιμοποιήθηκε επίσης για την απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου Fir1. Φέρει το γονίδιο K1TRP1 που προσδίδει στο στέλεχος την ιδιότητα να βιοσυνθέτει το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp).

Οι πλασμιδιακοί χάρτες βρίσκονται στο Παράρτημα.

2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της εταιρείας InVitroGen σε αντιδράσεις 20-50μl. Πιο συγκεκριμένα σε κάθε αντίδραση 50μl χρησιμοποιούνταν: 37,25μl ddH₂O, 5μl 10XPCR buffer, 1μl 10mM dNTP mixture, 1,5μl 50mM MgCl₂, 1,25μl Forward Primer, 1,25μl Reverse Primer, 2,5μl template DNA και 0,25μl Taq DNA πολυμεράση. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιούνταν ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού ήταν 5-50 ng για πλασμιδιακό DNA. Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού που εφαρμόστηκε σε όλες τις περιπτώσεις, καθώς τα T_m των ανιχνευτών και τα μεγέθη των προϊόντων ήταν παραπλήσια (περίπου 2,5kb), είναι το ακόλουθο:

- 3 98°C για 1 λεπτό για αρχική αποδιάταξη
- 4 98°C για 10 δευτερόλεπτα για αποδιάταξη
- 5 46°C για 30 δευτερόλεπτα για υβριδοποίηση των εκκινητών
- 6 72°C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα για επιμήκυνση της αλυσίδας
- 7 72°C για 10 δευτερόλεπτα
- 8 10°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα.

Τα βήματα 2~4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.

2) Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Σκοπός του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού μορίων DNA είναι η ποσοτική εκτίμηση ή η εκτίμηση του μεγέθους της/των αναλυμένων ζωνών. Όπου ήταν απαραίτητος ο ακριβέστερος ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 260nm (OD260) με τη χρήση NanoDrop. 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 PSTI.

3) Μετασχηματισμός κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα ζύμης εφαρμόστηκε η μέθοδος δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων ζύμης με οξικό λίθιο (LiAc TRAF0). Πρόκειται για μια μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας, η οποία βασίζεται στη δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης λόγω αλκαλικών κατιόντων (Gietz 1995). Το στέλεχος του σακχαρομύκητα, που πρόκειται να μετασχηματιστεί, μεγαλώνει σε 5 ml πλούσιου θρεπτικού (YPD) στους 30°C κατά τη διάρκεια της νύχτας (starting culture) και την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται σε 20 ml YPD και επωάζεται με ανάδευση στους 30°C μέχρι η οπτική απορρόφηση των κυττάρων να φτάσει OD₅₅₀=0,5. Ακολουθεί πεντάλεπτη φυγοκέντρηση στις 3000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με ίσο όγκο αποστειρωμένου ddH₂O. Κατόπιν η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται με αποστειρωμένο ddH₂O και LiAc (1/10 του όγκου) σε τελικό όγκο 1ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου. Στο κυτταρικό ίζημα προστίθεται το διάλυμα μετασχηματισμού, το οποίο αποτελείται από 240 μl PEG 3500 50%w/v, 36 μl 1M LiAc, 50 μl μονόκλωνου DNA ως carrier (2mg/ml), 34 μl DNA για GFP- tagging (1-2μg) και αποστειρωμένο ddH₂O. Σημειώνεται ότι τα συστατικά του διαλύματος μετασχηματισμού προστίθενται με τη σειρά που αναγράφονται. Το μίγμα των κυττάρων αναδεύεται έντονα με τη χρήση vortex και κατόπιν επωάζεται στους 30°C χωρίς ανάδευση για 30 λεπτά. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται για 20-25 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 42°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 15 sec και στη συνέχεια αφαιρείται το μείγμα μετασχηματισμού.

Στην πελέτα των κυττάρων είτε προστίθενται 100-200 μl αποστειρωμένου ddH₂O και κατόπιν απλώνεται σε κατάλληλο πιάτο επιλογής ή στην περίπτωση κατά την οποία γίνεται επιλογή με αντιβιοτικό, προστίθεται 1ml YPD και τα κύτταρα επωάζονται στους 30°C για τουλάχιστον 1 ώρα (recovery), προτού απλωθούν στο πιάτο που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τέλος τα πιάτα επωάζονται στους 30°C για 2-3 μέρες.

4) Δοκιμασία διαλυτότητας πρωτεϊνών

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε διαλυτές και αδιάλυτες πρωτεΐνες. Αρχικά, θα γίνει ανάλυση της προετοιμασίας των κυττάρων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη δειγμάτων και έπειτα θα αναλυθεί η πειραματική διαδικασία.

A) Προετοιμασία κυττάρων (cell treatment)

Από 5ml καλλιέργειας που αναδεύεται στους 30°C O/N (overnight), γίνεται 1:200 αραιώση σε 15ml DropOut medium και αφήνεται να επωαστεί O/N στους 30°C. Από τα 15ml καλλιέργειας λαμβάνεται 3ml δείγμα για stationary phase(δείγμα 1^ο:Stationary phase). Από την ίδια καλλιέργεια γίνεται αραιώση 1:5 σε 40ml Drop out medium και η καλλιέργεια που προκύπτει αφήνεται να επωαστεί για 1h30min στους 30°C. Αφού περάσει 1h30min τα 50ml μοιράζονται σε 2 φλάσκες: μία των 17ml η οποία αφήνεται να επωαστεί στους 30°C για 30min [λαμβάνεται δείγμα 15ml:Recovery 1(2^ο δείγμα)] και μία των 33ml, η οποία αφήνεται για 30min στους 46°C (extreme heatshock) [λαμβάνεται δείγμα 15ml:Heatshock(3^ο δείγμα)]. Η υπόλοιπη καλλιέργεια που υπέστη heatshock αφήνεται να επωαστεί για 1h30min~2h στους 30°C και έπειτα λαμβάνεται 15 ml δείγμα (4^ο δείγμα: Recovery 2)

B) Πειραματική διαδικασία επεξεργασίας των κυττάρων

Γίνεται μεταφορά των 3 ή 15ml δείγματος ανάλογα με τη φάση των κυττάρων όπως αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, σε falcons, και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται στις 3500rpm στους 4°C για 5min. Μετά από αφαίρεση του υπερκείμενου προστίθεται ένας όγκος διαλύματος TE, ακολουθεί vortex για επαναδιάλυση των κυττάρων και φυγοκέντρηση στις 3500rpm στους 4°C για 5min. Μετά από αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα προστίθενται 220μl από μείγμα που περιέχει 690μl Lysis Buffer και 10μl PIC 500 (διάλυμα αναστολέων πρωτεασών) για την επαναδιάλυση των κυττάρων και το περιεχόμενο μεταφέρεται σε eppendorf(1^ο) που περιέχει ήδη 150μl glass beads. Ακολουθεί vortex X8 φορές για κάθε δείγμα με ενδιάμεσα διαλείμματα 1min στον πάγο. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 1000rpm για 1min στους 4°C.

Αφαιρείται όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο erppendorf(2^ο). Έπεται φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5min στους 4°C (για απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erppendorf(3^ο).Λαμβάνονται 30μl δείγματος από το 3^ο erppendorf, και προστίθενται 30μl μίγματος SDS/β-MesH. Γίνεται vortex για 30s και φυλάσσεται στους -80°C (δείγμα: *total protein extract*). Το erppendorf 3 φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 5min στους 4°C. Η πελέτα περιέχει τις αδιάλυτες πρωτεΐνες που σχηματίζουν συσσωματώματα, ενώ το υπερκείμενο (μεταφορά σε νέο erppendorf-5) περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες. Γίνεται μέτρηση όγκου του υπερκειμένου (5) και προσθήκη ίσης ποσότητας διαλύματος SDS και β-MesH. Έπεται φυλάσσεται στους -80°C ως *δείγμα διαλυτών πρωτεϊνών*. Προστίθενται 150μl διαλύματος Lysis Buffer/Tween/PIC) στο erppendorf 3 και γίνονται 2Xvortex 1min με ενδιάμεσα διαλείμματα 1min σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3min στους 4°C. Μετά από αφαίρεση του υπερκειμένου και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται. Προστίθεται διάλυμα Lysis Buffer/PIC σε όγκο ίσο με το 1/5 του όγκου των διαλυτών πρωτεϊνών και επιπλέον 10μl διαλύματος SDS σε Tris pH 6,8. Ακολουθούν 2Xvortex με ενδιάμεσο διάλειμμα 1min σε πάγο. Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος SDS και β-MesH. Ακολουθούν 4X vortex με ενδιάμεσα διαλείμματα 1min στον πάγο. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C ως *δείγματα αδιάλυτων πρωτεϊνών*. Όλα τα δείγματα που έχουν τοποθετηθεί στους -80°C βράζονται για 8min και ακολουθούν 2Xvortex με ενδιάμεσα διαλείμματα 1min σε πάγο. Φορτώνονται 20-30μl από κάθε δείγμα σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

5) SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και Western blot ανάλυση

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Sambrook 2001). 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 CPMB (Ausubel F.M and K. 1999) ,ενώ για τις ιδανικές αραιώσεις των αντισωμάτων ελήφθησαν υπόψη οι οδηγίες των κατασκευαστών. Ο ανοσοεντοπισμός γίνεται ενζυματικά με τη δράση της υπεροξειδάσης (HRP), η οποία ήταν συζευγμένη με το δευτερογενές αντίσωμα, σε κατάλληλα υποστρώματα.Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγεθών ο Prestained Protein Molecular Weight Marker της Fermentas.

6) Stripping της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης

Για την αφαίρεση των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων από μεμβράνη που έχει ήδη ικνηθετηθεί ακολουθείται η διαδικασία του stripping. Η διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης, υπό ανάδευση, στους 50°C για χρονικό διάστημα 10min σε διάλυμα που περιέχει 2%w/v SDS, 62,5mM TrisCl pH 6.8 και 100mM β-MeSH. Μετά το πέρας της δεκάλεπτης επώασης η μεμβράνη ξεπλένεται με ddH₂O και κατόπιν με TBS και στη συνέχεια επανα-ικνηθεύεται.

7) Πειράματα γήρανσης (Ageing πειράματα)

Σκοπός των ageing πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν να ελεγχθεί εάν σε διαφορετικές συνθήκες stress υπάρχει κάποια διαφορά στην θνησιμότητα ή στο φαινότυπο σε p-body μεταλλαγμένα στελέχη. Πρέπει να αναφερθεί ότι δεν ήταν εφικτό να δημιουργήσουμε διπλά μεταλλάγματα της hsp26 με όλα τα συστατικά των p-bodies. Το μόνο διπλό μετάλλαγμα που κατασκευάστηκε ήταν το dhh1Δ/26prGFP σε BY4742 στέλεχος μέσω μετασχηματισμού. Γενικά, η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των διάφορων στελεχών είναι η ακόλουθη. Καλλιέργειες σε 5ml πλούσιου θρεπτικού μέσου (YPD) αφήνονται να επωαστούν O/N στους 30°C υπό ανάδευση(φυσιολογικές για τον σακχαρομύκητα συνθήκες). Μετά από 24h η καλλιέργεια των κυττάρων έχει φτάσει σε στατική φάση(stationary phase). Είναι γνωστό πως κύτταρα που προέρχονται από στατική φάση(stationary phase) είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε ακραία περιβάλλοντα [46]. Έτσι, οι O/N καλλιέργειες αραιώνονται σε πλούσιο θρεπτικό υλικό (YPD) έτσι ώστε να ανακάμψουν και να αρχίσουν να διαιρούνται (Recovery). Όταν η καλλιέργεια έχει φτάσει σε OD₅₅₀ περίπου ίση με 0,5, οποιαδήποτε ακραία περιβαλλοντική συνθήκη συνήθως επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, πράγμα το οποίο μετράται σε Colony Forming Units. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνονται καθημερινά δείγματα από τις «υπό διάφορες συνθήκες» καλλιέργειες και μετά από αραιώση 1:10000, στρώνονται 50~150μl σε YPD και σε YPG plates και αφήνονται να επωαστούν στους 30°C. Ακολουθεί καταμέτρηση των αποικιών μετά από περίπου 2 ημέρες. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν YPG plates ήταν για να ελεγχθεί το ποσοστό petites αποικιών. Έπειτα από συνεχείς μετρήσεις κατασκευάζεται η καμπύλη που παριστάνει το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων (ανάλογα με τη δυνατότητά τους να δίνουν αποικίες) σε συνάρτηση του χρόνου.

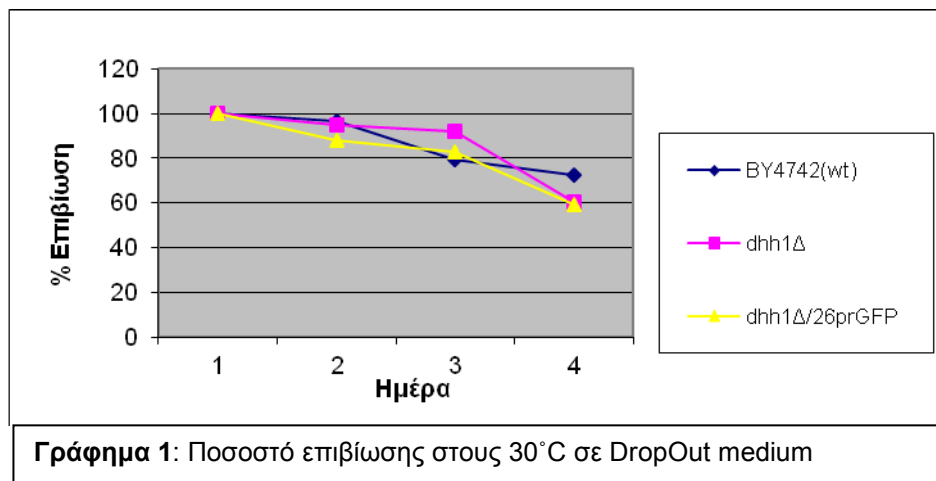
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη survival των στελεχών: BY4742(wt), dhh1Δ και dhh1Δ/26prGFP στους 30°C.

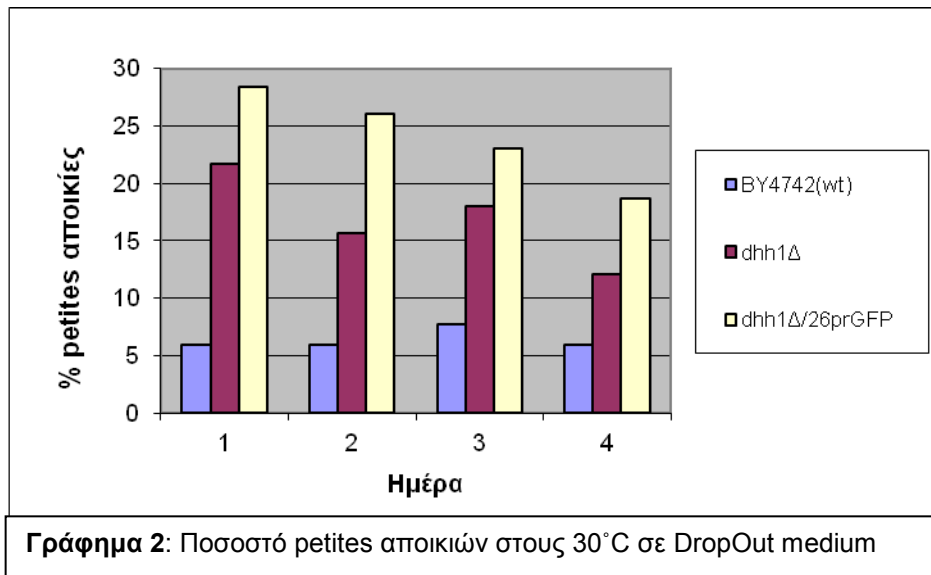
Πειραματική διαδικασία: Από 5ml καλλιέργειας 24 ωρών (overnight-O/N) των 3 στελεχών σε YPD medium έγινε αραιώση 1:200 σε 10ml Drop Out medium και οι καλλιέργειες παρέμειναν στους 30°C για 4 ημέρες. Μετά την αραιώση σε Drop out medium γίνονταν καθημερινά

μετρήσεις των αποικιών σε YPD και YPG(δεν συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα των αποτελεσμάτων) plates. Τα αποτελέσματα ακολουθούν στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ageing πειράματος στους 30°C				
	Ημέρα	Αποικίες	% Επιβίωση	% petites αποικιών
BY4742(wt)	1	572	100	5,9
	2	553	96,7	5,9
	3	453	79,2	7,7
	4	415	72,6	5,9
dhh1Δ	1	535	100	21,7
	2	509	95,1	15,7
	3	493	92,1	18
	4	322	60,2	12,1
dhh1Δ/26prGFP	1	560	100	28,4
	2	494	88,2	26,1
	3	463	82,7	23,1
	4	331	59,1	18,7



Γράφημα 1: Ποσοστό επιβίωσης στους 30°C



Από τον πίνακα 4, είναι αντιληπτό ότι στους 30°C δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά (τουλάχιστον μέσα στις 4 ημέρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε το πείραμα) στην επιβίωση των 3 στελεχών, καθώς το ποσοστό επιβίωσης τους μειώνεται ελάχιστα ανά ημέρα με την ίδια σχεδόν κινητική.

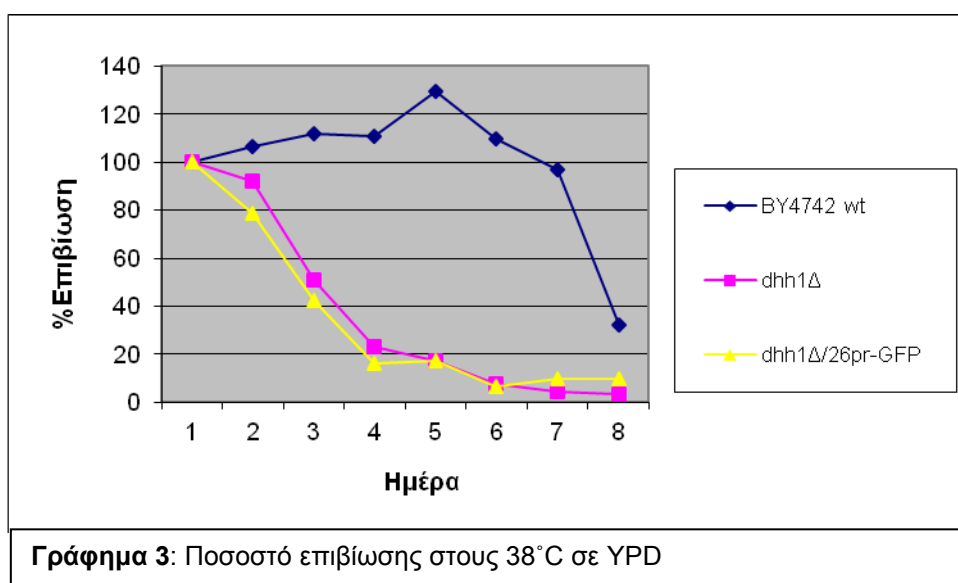
Μία αξιοσημείωτη παρατήρηση στο συγκεκριμένο πείραμα είναι ότι παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένος αριθμός μικρών (petites) αποικιών. Γενικά, αγρίου τύπου στελέχη ζυμομύκητα παράγουν σε ποσοστό περίπου 1-2% κύτταρα με πρόβλημα στη μιτοχονδριακή τους λειτουργία. Το πρόβλημα αυτό προκύπτει κυρίως λόγω απώλειας μιτοχονδριακού DNA. Οι petites αποικίες διακρίνονται από τις φυσιολογικές λόγω μεγέθους (είναι πολύ πιο μικρές) αλλά και για το γεγονός ότι κύτταρα που προέρχονται από petites αποικίες δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε πηγή άνθρακα που δεν μπορεί να υποστεί ζύμωση (όπως για παράδειγμα YPGlycerol medium). Όπως φαίνεται από το Γράφημα 2, ενώ το wild type στέλεχος (BY4742) παρουσιάζει ένα ποσοστό περίπου 5% petites αποικιών, τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν πολύ πιο μεγάλα ποσοστά, και ιδιαίτερα το διπλό μετάλλαγμα. Συνεπώς, πιθανόν η απαλοιφή των 2 γονιδίων: *dhh1* και *hsp26* να οδηγεί σε έναν συνθετικό φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλή πιθανότητα να δώσει petites αποικίες.

3.2 Μελέτη επιβίωσης των στελεχών: BY4742(wt), dhh1Δ και dhh1Δ/26prGFP στους 38°C.

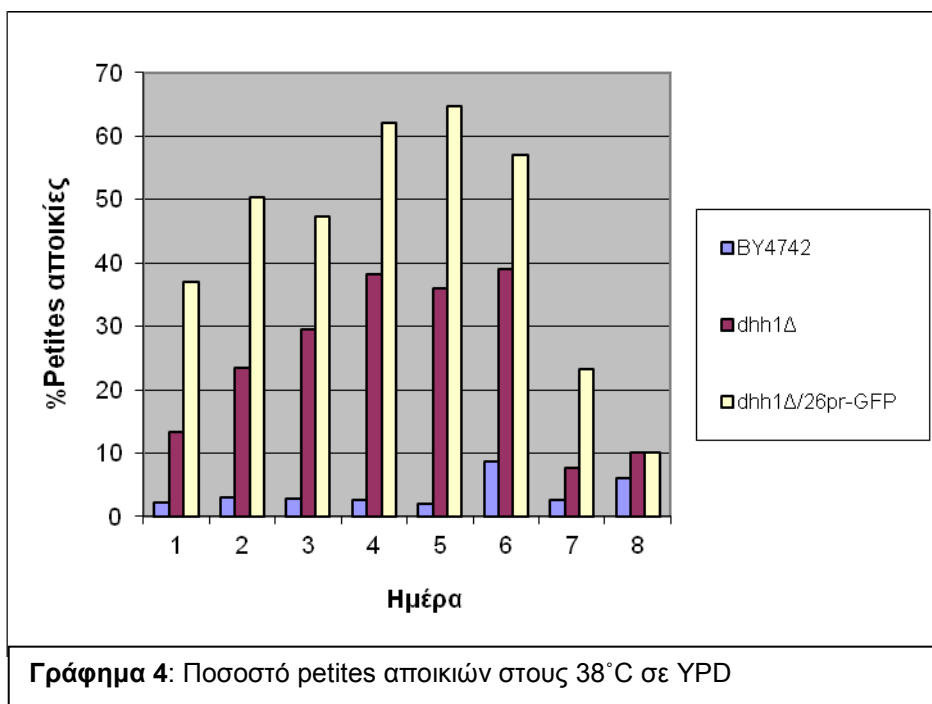
Επαναλήφθηκε το ίδιο πείραμα, με τη διαφορά ότι έγινε 1:200 αραιώση της O/N καλλιέργειας σε 25ml πλούσιου θρεπτικού μέσου (YPD) και οι αραιωμένες καλλιέργειες μεταφέρθηκαν στους 38°C.

Λήφθηκαν μετρήσεις για 8 συνεχόμενες μέρες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ageing πειράματος στους 38°C				
	Ημέρα	Αποικίες	% Επιβίωση	% Petites αποικιών
BY4742	1	272	100	2,2
	2	290	106,62	3,1
	3	305	112,13	2,9
	4	301	110,66	2,6
	5	352	129,41	2
	6	299	109,93	8,6
	7	263	96,69	2,6
	8	88	32,35	6
dhh1Δ	1	291	100	13,4
	2	268	92,10	23,5
	3	149	51,20	29,5
	4	68	23,37	38,2
	5	50	17,18	36
	6	23	7,90	39,1
	7	13	4,47	7,7
	8	10	3,44	10
dhh1Δ/26pr-GFP	1	313	100	37
	2	246	78,59	50,4
	3	133	42,49	47,4
	4	50	15,97	62
	5	54	17,25	64,8
	6	21	6,71	57,1
	7	30	9,58	23,3
	8	30	9,58	10



Γράφημα 3: Ποσοστό επιβίωσης στους 38°C σε YPD



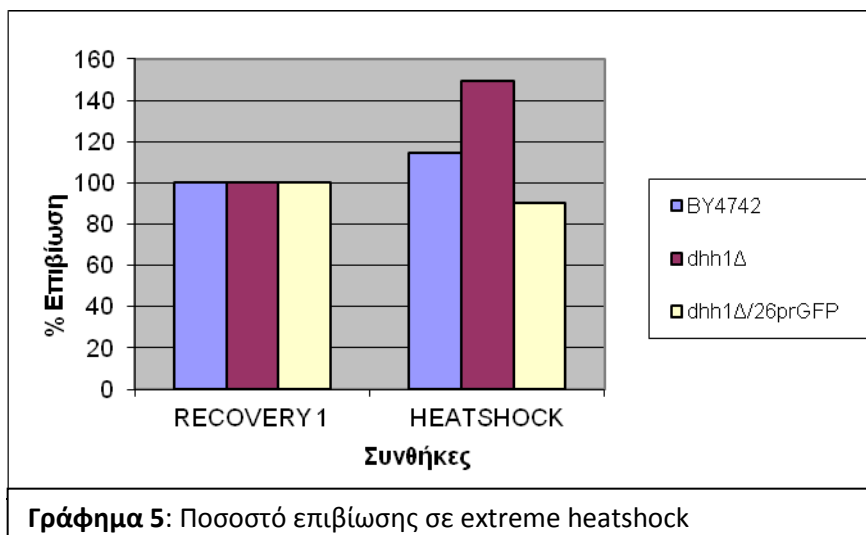
Από το γράφημα 3 γίνεται φανερό ότι από την 3^η κιόλας μέρα τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν αυξημένη θνησιμότητα (περίπου 50%), σε σχέση με το wild type στέλεχος, το οποίο αυξάνεται ελάχιστα και αρχίζει να εμφανίζει απότομη θνησιμότητα την 7^η μέρα. Τόσο το *dhh1Δ* όσο και το *dhh1Δ/hsp26prGFP* ακολουθούν περίπου την ίδια κινητική ως προς την επιβίωση.

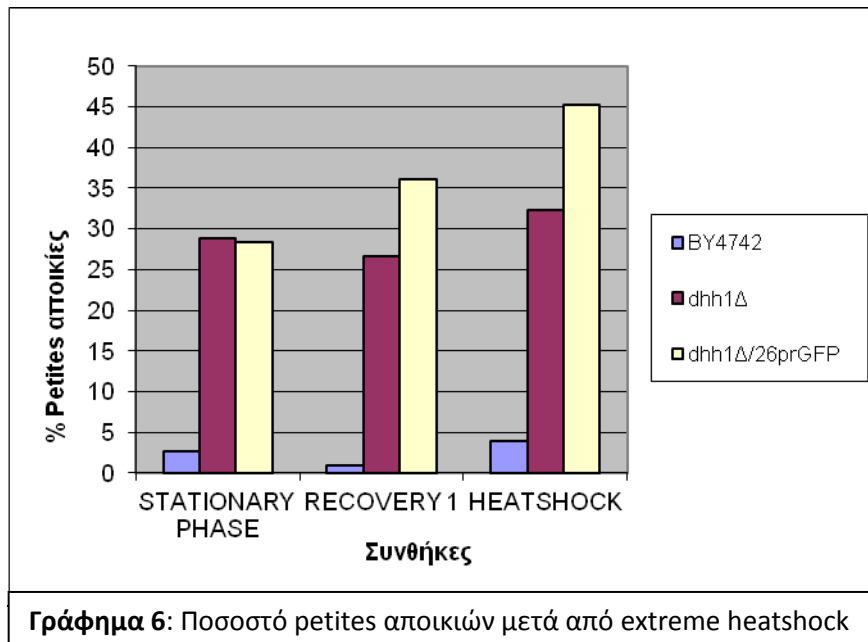
Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, έτσι και σε αυτό, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό petites αποικιών στα μεταλλαγμένα στελέχη. Πρέπει να τονιστεί ότι το διπλό μετάλλαγμα διέφερε περίπου 20-25% ως προς τις petites αποικίες σε σχέση με το p-body μετάλλαγμα. Εκτός από αυτό, ενώ το wild type στέλεχος, όπως ήταν αναμενόμενο παρουσίαζε σταθερά ένα ποσοστό περίπου 5%, τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίαζαν όλο και πιο μεγάλο αριθμό petites όσο περνούν οι μέρες. Αυτό συνέβαινε μέχρι και την 5^η μέρα στην οποία παρατηρείται από το γράφημα 3 ακόμα μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας. Έτσι λοιπόν, η επανάληψη του πειράματος 1 στους 38°C μεγιστοποίησε τη διαφορά του μονού από το διπλό μετάλλαγμα ως προς το σχηματισμό petites. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία επομένως που προκύπτει σε στελέχη στα οποία έχει γίνει απαλοιφή της *dhh1* αυξάνεται εάν γίνει απαλοιφή και στο γονίδιο της *hsp26*, φαινότυπος ο οποίος ισχυροποιείται ακόμα περισσότερο μετά από επώαση στους 38°C

3.3 Μελέτη της επιβίωσης των στελεχών BY4742(wt), dhh1Δ και dhh1Δ/26prGFP έπειτα από ακραίο θερμικό σοκ (extreme heatshock)

Από τις Ο/Ν καλλιέργειες των 3 στελεχών σε YPD στους 30°C έγινε 1:5 αραιώση σε YPD και οι καλλιέργειες αφέθηκαν για 1h30min στους 30°C υπό ανάδευση(Recovery I). Σκοπός του Recovery I είναι να ξαναμπούν τα κύτταρα σε διαδικασία πολλαπλασιασμού (proliferation) έτσι ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά τους σε διάφορες συνθήκες stress. Είναι γνωστό πως κύτταρα ζύμης που προέρχονται από στατική φάση(stationary phase) είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε ακραία περιβάλλοντα [49]. Μετά το Recovery I οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν στους 46°C για 30min. Σε κάθε φάση λαμβάνονταν δείγματα σε YPD plates. Τα αποτελέσματα διακρίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα aging πειράματος έπειτα από ακραίο θερμικό σοκ			
BY4742	Αποικίες	% Επιβίωση	% Petites
STATIONARY PHASE	801		2,7
RECOVERY 1	306	100	1
HEATSHOCK	351	114,7	4
dhh1Δ			
STATIONARY PHASE	758		28,9
RECOVERY 1	203	100	26,6
HEATSHOCK	303	149,3	32,3
dhh1Δ/h26prGFP			
STATIONARY PHASE	612		28,3
RECOVERY 1	249	100	36,1
HEATSHOCK	225	90,4	45,3





Τη θνησιμότητα των στελεχών μπορούμε να τη συγκρίνουμε μόνο μεταξύ των συνθηκών Recovery I και Heatshock, διότι οι καλλιέργειες από stationary phase αραιώθηκαν. Σύμφωνα με το γράφημα 5, ενώ το wild type στέλεχος και το μονό μετάλλαγμα (dhh1Δ) αυξάνονται σε αριθμό, το διπλό μετάλλαγμα (dhh1Δ/hsp26prGFP) είναι το μόνο που εμφανίζει θνησιμότητα. Έχει δειχθεί από προηγούμενες μελέτες μελών του εργαστηρίου ότι κύτταρα στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του hsp26 γονιδίου (hsp26Δ) δεν παρουσιάζουν θνησιμότητα σε συνθήκες extreme heatshock. Αυτό δείχνει ότι η απουσία της hsp26 καθώς και η εν μέρει δυσλειτουργία των p-bodies λόγω της έλλειψης της dhh1, επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά το extreme heatshock, υποδεικνύοντας έτσι έναν συνθετικό φαινότυπο για την hsp26.

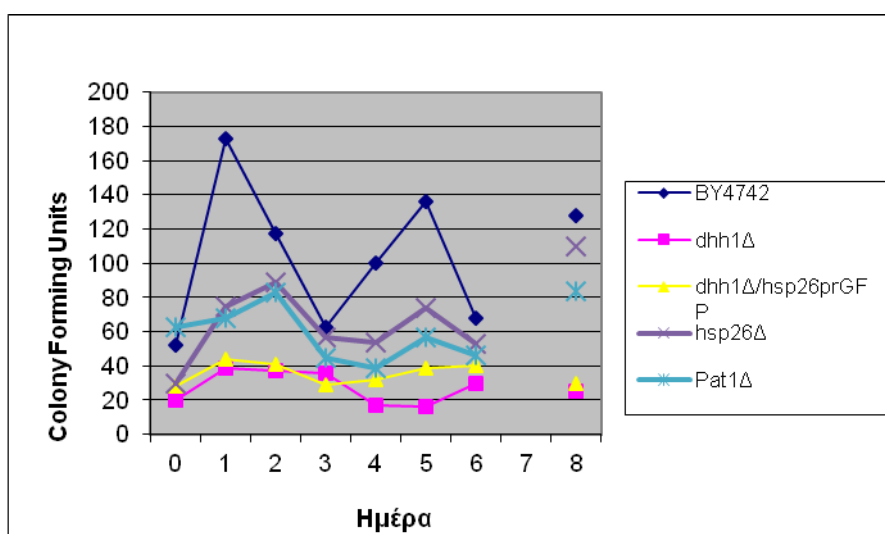
Σύμφωνα με το γράφημα 5, ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη ξεκινάνε με παρόμοιο ποσοστό petites αποικιών σε stationary phase, στο recovery I η συχνότητα petites αυξάνεται περισσότερο στο διπλό μετάλλαγμα, και μεγιστοποιείται μετά το extreme heatshock.

3.4 Μελέτη συμπεριφοράς p-body μεταλλαγμάτων σε θρεπτικό μέσο με ελάχιστη ποσότητα γλυκόζης (YP)

Στο συγκεκριμένο πείραμα σκοπός ήταν να εξετάσουμε την επίδραση της παρουσίας ελάχιστης ποσότητας γλυκόζης (ως ένα

είδος stress) σε ένα wild type στέλεχος (BY4742), σε 2 p-body μεταλλάγματα (dhh1Δ, Pat1Δ), σε ένα στέλεχος στο οποίο έχει γίνει απαλοιφή η hsp26 (hsp26Δ), και σε ένα p-body/hsp26 διπλό μεταλλάγμα (dhh1Δ/hsp26prGFP). Από O/N καλλιέργειες των 5 αυτών στελεχών έκανα μία αραιώση ώστε να φτάσουν OD=0,1 και περιμένα μέχρι να πλησιάσουν σε OD=0,5. Μετά την ανάκαμψη των κυττάρων, έγινε πλύση και αλλαγή θρεπτικού από YPD σε YP. Παρά την πλύση των κυττάρων με ddH₂O, θεωρούμε ότι δεν μηδενίζονται τα επίπεδα γλυκόζης, αλλά παραμένει ελάχιστη ποσότητά της. Η επιβίωση των συγκεκριμένων στελεχών σε YP διακρίνεται στον παρακάτω πίνακα.

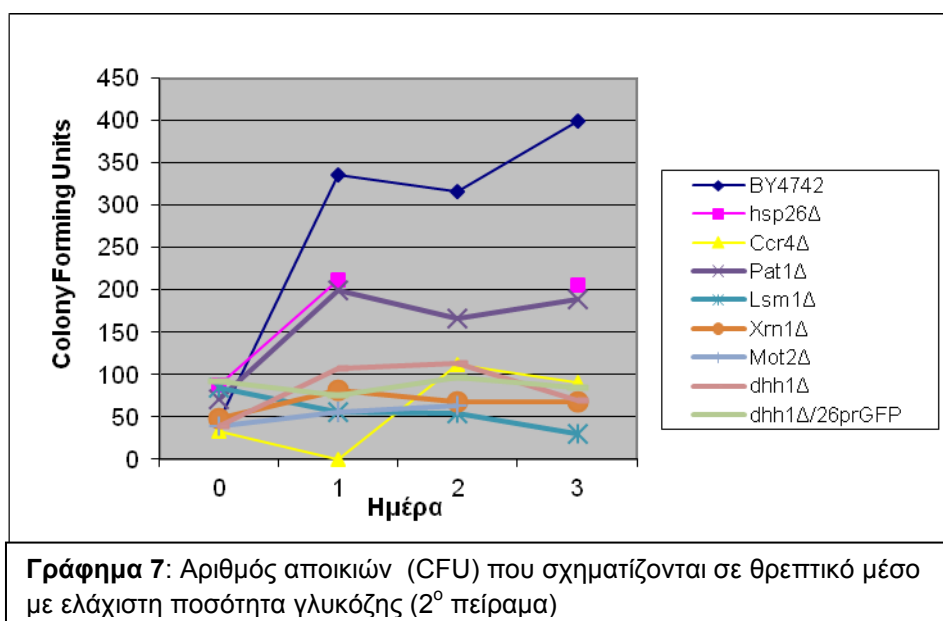
Πίνακας 7: Απόλυτος αριθμός αποικιών που σχηματίζονται σε θρεπτικό μέσο με ελάχιστη ποσότητα γλυκόζης					
Ημέρα	Αριθμός αποικιών				
	BY4742	dhh1Δ	dhh1Δ/hsp26prGFP	hsp26Δ	Pat1Δ
0	52	20	28	30	63
1	173	39	44	75	68
2	117	37	41	89	83
3	63	36	29	57	45
4	100	17	32	54	39
5	136	16	39	74	57
6	68	30	40	53	46
7					
8	128	25	30	110	84



Γράφημα 7: Αριθμός αποικιών (CFU) που σχηματίζονται σε θρεπτικό μέσο με ελάχιστη ποσότητα γλυκόζης

Πρέπει να σημειωθεί ότι την 7^η ημέρα δεν λήφθηκαν μετρήσεις και γι' αυτό υπάρχει το κενό στο γράφημα 7.

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες που υποδεικνύουν τον απόλυτο αριθμό αποικιών σε κάθε στέλεχος ανά ημέρα, παρατηρούμε ότι υπάρχει περιοδικότητα, τουλάχιστον μέχρι την 6^η μέρα. Ο αριθμός των αποικιών αυξομειώνεται με περίοδο περίπου 2 ημερών. Το στέλεχος που επιβιώνει καλύτερα όπως ήταν αναμενόμενο, είναι το wild type. Ακολουθεί το hsp26Δ στέλεχος και το Pat1Δ, τα οποία εμφανίζουν παρόμοιες τιμές. Τα στελέχη που παρουσιάζουν το μικρότερο CFU είναι το dhh1Δ και το dhh1Δ/26prGFP. Είχαν πραγματοποιηθεί κι άλλα όμοια πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν και άλλα p-body μεταλλάγματα, τα οποία όμως παρέμειναν σε YP για 3 ημέρες, όπως φαίνεται και στο γράφημα 8. Από το γράφημα 8 παρατηρούμε ότι επαναλαμβάνεται η ίδια συμπεριφορά των στελεχών pat1Δ και hsp26Δ. Επίσης, τα άλλα p-body μεταλλάγματα (ccr4Δ, lsm1Δ, xrn1Δ, mot2Δ) εμφανίζουν πολύ μικρότερο CFU, παρόμοιο με αυτό του dhh1Δ και dhh1Δ/hsp26prGFP που εμφανιζόταν στο πρώτο πείραμα. Αυτό πιθανό να υποδεικνύει ότι οι παράγοντες ccr4, lsm1, xrn1 και mot2 επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την λειτουργία των p-bodies, και κατ'επέκταση τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε περιβάλλον με ελάχιστη ποσότητα γλυκόζης.



3.5 Δοκιμασία διαλυτότητας πρωτεϊνών (Solubility Assays)

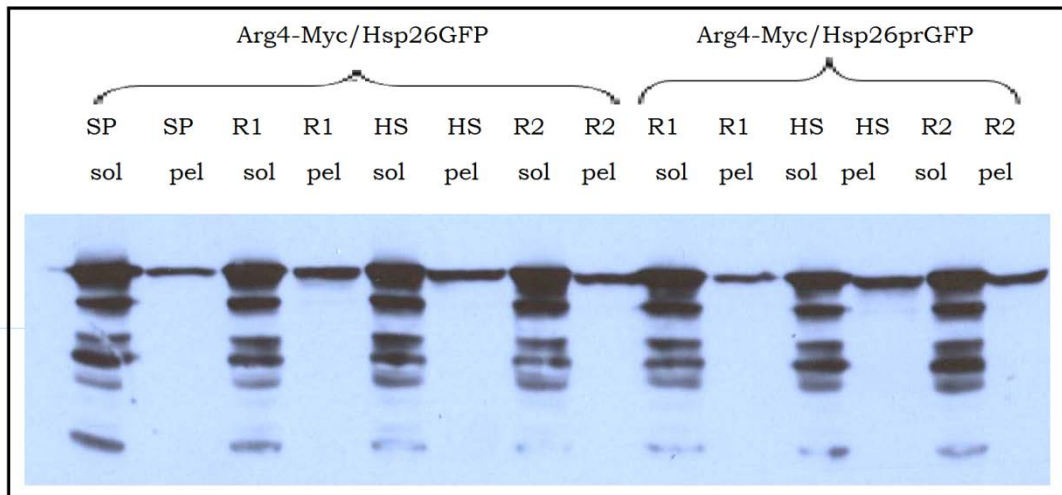
Πειραματικές μελέτες από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου έδειξαν ότι η hsp26 πιθανότατα συμβάλλει στην διαλυτοποίηση των Edc3 και Dcp2 (συστατικά των p-bodies) σε στελέχη στα οποία είχε γίνει σήμανση των Edc3 και Dcp2 με Myc επίτοπο.

Για να γίνει έλεγχος εάν η πρωτεΐνη hsp26 συμμετέχει στη διαλυτοποίηση άλλων πρωτεϊνών εκτός των p-body συστατικών Edc3 και Dcp2, επέλεξα δύο τυχαίες πρωτεΐνες μάρτυρες: μία κυτταροπλασματική (Arg4) και μία πυρηνική (Htz1). Η Arg4 είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο καταλύει το τελικό βήμα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αργινίνης. Η Htz1 αποτελεί ισομορφή της ιστόνης H2A και ως εκ τούτου συναντάται στον πυρήνα.

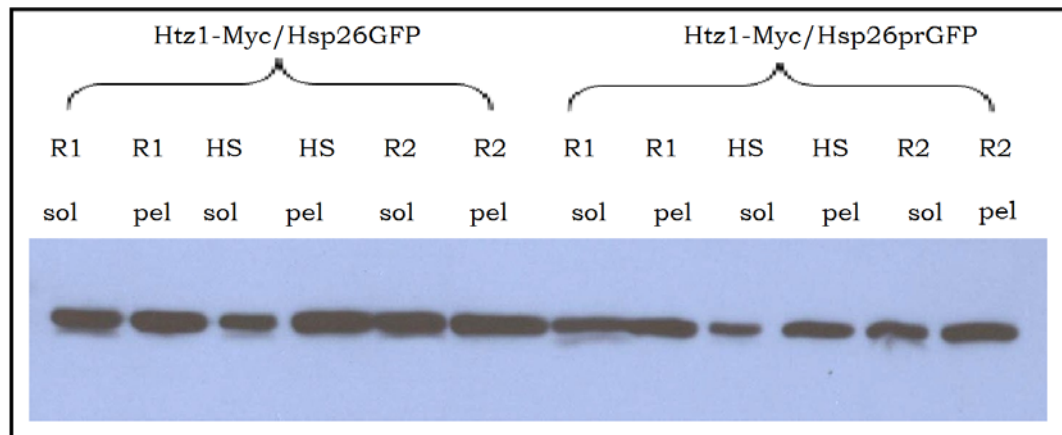
Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε σήμανση των Arg4 και Htz1 γονιδίων με Myc επίτοπο σε 2 τύπου στελέχη: σε στελέχη που εξέφραζαν την hsp26 σε σύντηξη με GFP και σε στελέχη στα οποία η κωδική περιοχή του γονιδίου της hsp26 είχε αντικατασταθεί με την κωδική περιοχή του GFP γονιδίου. Έτσι δημιουργήθηκαν 4 διαφορετικά στελέχη (μέσω μετασχηματισμού):

- 1)Arg4-Myc/Hsp26-GFP
- 2)Arg4-Myc/hsp26pr-GFP
- 3)Htz1-Myc/Hsp26-GFP
- 4)Htz1-Myc/hsp26pr-GFP

Καλλιέργειες των 4 αυτών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν για τεχνική δοκιμασίας διαλυτότητας (όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο: υλικά και μέθοδοι/solubility assay). Πιο συγκεκριμένα, καλλιέργειες που βρίσκονταν σε πρώιμη στατική φάση(*stationary phase*), αραιώθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο και αφέθηκαν να ανακάμψουν για 1h30min στους 30°C(*Recovery1*). Έπειτα υπέστησαν ακραίο θερμικό σοκ για 30min στους 46°C (*Heatshock*) και ακολούθησε εκ νέου ανάκαμψη τους για 1h30min στους 30°C(*Recovery 2*). Σε κάθε φάση του πειράματος γινόταν λήψη συγκεκριμένου όγκου καλλιέργειας, έτσι ώστε όλα τα δείγματα να περιέχουν περίπου ίσο αριθμό κυτάρων Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των δειγμάτων που προέκυψε από το solubility assay χρησιμοποιήθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS και έπειτα έγινε ανοσοεντοπισμός με αντίσωμα ειδικό για τον Myc επίτοπο. Τα αποτελέσματα του φιλμ φαίνονται στις εικόνες 5 και 6.



Εικόνα 5: Δείγματα από solubility assay των στελεχών Arg4-Myc/Hsp26GFP και Arg4-Myc/Hsp26prGFP σε συνθήκες πρώιμης στατικής φάσης(SP), πρώτης ανάκαμψης (R1), ακραίου θερμικού σοκ (HS) και δεύτερης ανάκαμψης(R2). Σε κάθε φάση παριστάνονται οι διαλυτές(sol) και οι αδιάλυτες(pel) πρωτεΐνες

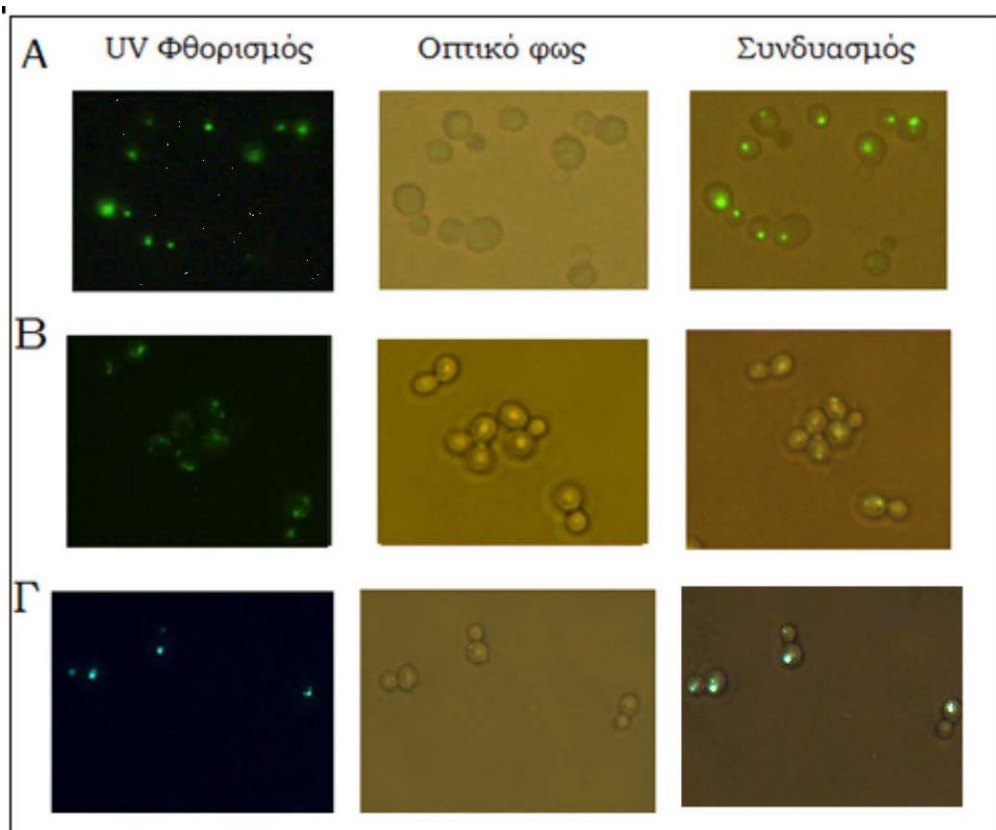


Εικόνα 6: Δείγματα από solubility assay των στελεχών Htz1-Myc/Hsp26GFP και Htz1-Myc/Hsp26prGFP σε συνθήκες ανάκαμψης (R1), ακραίου θερμικού σοκ (HS) και δεύτερης ανάκαμψης(R2). Σε κάθε φάση παριστάνονται οι διαλυτές(sol) και οι αδιάλυτες(pel) πρωτεΐνες

Όπως φαίνεται στις εικόνες 5 και 6, συγκρίνοντας σε κάθε φάση τα 2 διαφορετικά στελέχη (Hsp26GFP και Hsp26prGFP) παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει διαφορά στην ένταση των ζωνών. Αυτό υποδηλώνει ότι τόσο παρουσία όσο και απουσία της hsp26, δεν υπάρχει διαφορά στη διαλυτότητα των πρωτεϊνών Arg4 και Htz1, δεδομένου ότι έχει χρησιμοποιηθεί ίση ποσότητα κυττάρων σε όλες τις φάσεις.

3.6 Μικροσκοπική παρατήρηση Hsp26GFP in vivo

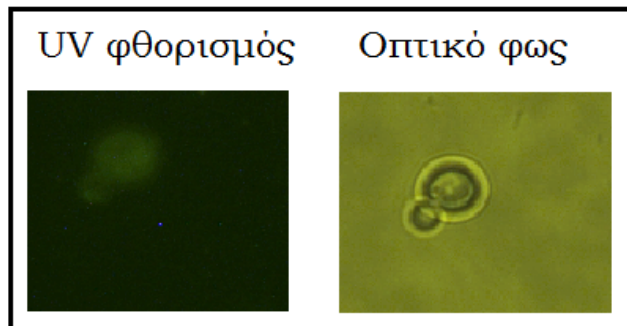
Για να μελετηθεί η συμπεριφορά της Hsp26 in vivo, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος hsp26GFP, και επιπλέον, το hsp26prGFP, σαν control στη μικροσκοπική παρατήρηση. Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, καλλιέργειες που είχαν επωαστεί O/N στους 30°C αραιώθηκαν (1:10) σε πλούσιο θρεπτικό μέσο και αφέθηκαν για 1h στους 30°C. Ακολούθησε χαμηλής έντασης heatshock (39°C) για 1h. Σε κάθε φάση γινόταν λήψη δειγμάτων, τα οποία εξετάζονταν σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Παρατήρηση του στελέχους Hsp26GFP σε μικροσκόπιο φθορισμού. Α) Πρώιμη στατική φάση (stationary phase), Β) Heatshock στους 39°C για 1h, Γ) Δεύτερη ανάκαμψη (Recovery 2)

Σε πρώιμη στατική φάση, όπως είχε διαπιστωθεί και από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου η hsp26 έχει εκφραστεί και είναι συγκεντρωμένη σε μία έντονη κηλίδα (spot). Την ίδια εμφάνιση παρουσιάζει και κατά την ανάκαμψη από στατική φάση (δεν παρουσιάζεται στις εικόνες). Μετά από το θερμικό σοκ 1h στους 39°C η hsp26 εμφανίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, ακόμα και στα εκβλαστήματα, αλλά εξακολουθούν να φαίνονται δύο έντονες

κηλίδες. Κατά την ανάκαμψη από το θερμικό σοκ (στους 30°C) η διάχυτη hsp26 εμφανίζεται συγκεντρωμένη σε μία κηλίδα κυρίως στο μητρικό κύτταρο. Παρατηρήθηκε ακόμα και μία μικρής έντασης κηλίδα σε μεγάλα εκβλαστήματα. Πρέπει να τονιστεί ότι επειδή κατά τη δεύτερη ανάκαμψη γινόταν λήψη δειγμάτων ανά δεκάλεπτο, η διάχυτη από το θερμικό σοκ hsp26 άρχισε να συγκεντρώνεται σε κηλίδα εξαιρετικά γρήγορα: από τα πρώτα κίολας 10min. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η εικόνα που εμφανίζει η hsp26GFP είναι η πραγματική και δεν είναι αποτέλεσμα της GFP, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος hsp26prGFP. Το στέλεχος αυτό εμφάνιζε τη GFP διάχυτη στο κυτταρόπλασμα σε όλες τις παρατηρούμενες συνθήκες, χωρίς να σχηματίζει κηλίδες. Έτσι υποθέτουμε ότι η συμπεριφορά της hsp26 in vivo δεν επηρεάζεται από την παρουσία GFP.



Εικόνα 8: Παρατήρηση του στελέχους hsp26GFP σε μικροσκόπιο φθορισμού σε συνθήκες πρώιμης στατικής φάσης. Και στις υπόλοιπες συνθήκες είχε ακριβώς την ίδια συμπεριφορά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη διπλωματική αυτή εργασία, έγινε η υπόθεση ότι τα p-bodies αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη θερμοπληξίας hsp26, λόγω του γεγονότος ότι σχηματίζονται στις ίδιες συνθήκες στις οποίες εκφράζεται η hsp26. Εκτός από αυτό όμως, δεδομένου ότι τα p-bodies διακρίνονται στο κυτταρόπλασμα ως μεγάλα σύμπλοκα, πιθανόν η hsp26 να παίζει κάποιο ρόλο στην προστασία των πρωτεϊνικών συστατικών τους, έτσι ώστε να μην δημιουργούνται συσσωματώματα σε στρεσογόνες συνθήκες. Παλαιότερες μελέτες από άλλα μέλη του εργαστηρίου είχαν δείξει μικροσκοπικά, συνεντοπισμό της hsp26-GFP (φθορίζει στο πράσινο) με μία πρωτεΐνη των p-bodies, την Edc3-mCherry (φθορίζει στο κόκκινο). Αυτή η παρατήρηση ήταν μία πρώτη ένδειξη ότι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση της hsp26 με συστατικά των p-bodies.

Μία δεύτερη ένδειξη αλληλεπίδρασης των p-body συστατικών με την hsp26 έγινε από προηγούμενα πειράματα δοκιμασίας διαλυτότητας (solubility assays) στα οποία μελετήθηκε η διαλυτότητα της σημασμένης με Myc επίτοπο πρωτεΐνης Dcp2. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η διαλυτότητα της Dcp2 πρωτεΐνης διέφερε ανάμεσα σε σελέχη που εξέφραζαν την hsp26 (Dcp2-Myc/Hsp26GFP) και σε σελέχη που δεν την εξέφραζαν (Dcp2-Myc/Hsp26prGFP). Στα Dcp2-Myc/Hsp26prGFP σελέχη το μεγαλύτερο μέρος της Dcp2 εμφανιζόταν στο δείγμα των αδιάλυτων πρωτεϊνών σε σχέση με τις διαλυτές, φαινόμενο το οποίο έγινε εντονότερο σε συνθήκες θερμικού σοκ. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 πρωτεΐνες μάρτυρες, μία κυτταροπλασματική (Arg4) και μία πυρηνική (Htz1) και βρέθηκε ότι η διαλυτότητά τους δεν επηρεάζεται από την απουσία της hsp26 σε διάφορες συνθήκες. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι υπάρχει κάποια εκλεκτικότητα της hsp26 ως προς την αναγνώριση των υποστρωμάτων της.

Μία άλλη προσέγγιση ήταν να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια επίπτωση στην επιβίωση p-body μεταλλαγμένων στελεχών τα οποία δεν εκφράζουν την hsp26. Πιο συγκεκριμένα, μέσω πειραμάτων θερμικού σοκ, βρέθηκε ότι το ποσοστό επιβίωσης των dhh1Δ και dhh1Δ/hsp26prGFP στελεχών ήταν πολύ χαμηλότερο σε σχέση με του αγρίου τύπου αλλά και του hsp26Δ στελέχους. Όμως, αν και δεν ήταν αναμενόμενο, βρέθηκε ότι τα p-body μεταλλαγμένα στελέχη όταν φτάσουν σε στατική φάση στους 38°C, εμφανίζουν σε μεγάλο ποσοστό μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, όπως γίνεται αντιληπτό από την εμφάνιση petites αποικιών. Πρέπει να τονιστεί ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εντείνεται στα διπλά μεταλλαγμένα

στελέχη (dhh1Δ/hsp26prGFP), υποδεικνύοντας έτσι έναν συνθετικό φαινότυπο για την hsp26 και τα p-bodies. Επίσης, μέσω πειραμάτων στέρησης γλυκόζης (σε YP medium), βρέθηκε ότι το hsp26Δ στέλεχος παρουσιάζει μειωμένη βιωσιμότητα σε σχέση με του αγριού τύπου.

Μικροσκοπικές παρατηρήσεις Hsp26GFP στελεχών συμφωνούν με το μοντέλο της *in vitro* συμπεριφοράς της hsp26 σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας[48]. Σύμφωνα με τα δεδομένα των μικροσκοπικών παρατηρήσεων ένα πιθανό μοντέλο είναι το εξής: Καλλιέργειες hsp26GFP που έχουν φτάσει σε πρώιμη στατική φάση εκφράζουν την hsp26, η οποία διακρίνεται στο μικροσκόπιο ως μία μεγάλη κηλίδα στο κυτταρόπλασμα. Η κηλίδα αυτή αποτελείται πιθανόν από 24μερή ανενεργά σύμπλοκα της hsp26 (σύμφωνα με την *in vitro* συμπεριφορά της). Κατά την ανάκαμψη της καλλιέργειας σε νέο θρεπτικό μέσο στους 30°C (Recovery 1) τα κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται αλλά η hsp26 παραμένει κατά κύριο λόγο στα μητρικά κύτταρα και όχι στο εκβλάστημα. Έτσι, μετά από 1h Recovery η hsp26GFP εντοπίζεται σε ελάχιστα κύτταρα σε σχέση με τη στατική φάση. Με αύξηση της θερμοκρασίας στους 39°C για 1h, η hsp26GFP εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα όλων των κυττάρων. Μία πιθανή εκδοχή είναι ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας η hsp26 διαχέεται στο κυτταρόπλασμα προς αναζήτηση υποστρωμάτων ώστε να εμποδίσει την συσσωμάτωσή τους. Όταν οι συνθήκες γίνουν πάλι ευνοϊκές (30°C), σε εξαιρετικά μικρό χρονικό διάστημα η hsp26 συγκεντρώνεται πάλι σε μία κηλίδα. Η κηλίδα εντοπίζεται κατά βάση στο μητρικό κύτταρο και μόνο σε μεγάλα εκβλαστήματα, τα οποία πιθανότατα είναι έτοιμα να αποσπαστούν. Αυτός ο άνισος διαχωρισμός της hsp26 πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στη γήρανση του *S.cerevisiae*: η hsp26 υποθέτουμε ότι συγκεντρώνει αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες από το εκβλάστημα απαλλάσσοντάς το από αυτές και οδηγώντας έτσι στη δημιουργία μίας νέας απαλλαγμένης από συσσωματώματα κυτταρικής γενιάς (daughter cells).

Συμπερασματικά λοιπόν, από τα προαναφερθέντα πειραματικά δεδομένα, υποστηρίζεται η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης θερμοπληξίας hsp26 με τα p-bodies. Ωστόσο, θα ήταν καλό να γίνουν επιπρόσθετες μελέτες, όπως:

- *in vivo* ανοσοκατακρήμνιση της hsp26 και ανάλυση των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά
- δημιουργία και άλλων p-body διπλά μεταλλαγμένων στελεχών και μελέτη τους μέσω ageing πειραμάτων
- μικροσκοπική παρατήρηση των p-body μεταλλαγμένων στελεχών χρησιμοποιώντας ροδαμίνη 123, η οποία βάφει

εκλεκτικά τα λειτουργικά μιτοχόνδρια για να εξετασθεί αν υπάρχει κάποια διαφορά στη μορφολογία και τον αριθμό τους σε σχέση με αγρίου τύπου στελέχη

- έλεγχος επιπέδων mRNA-μαρτύρων μετά από αναστολή της μετάφρασης, για να διευκρινιστεί εάν η απουσία της hsp26 επηρεάζει τη βασική λειτουργία των p-bodies: την αποικοδόμηση των mRNAs

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Houseley, J., & Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136(4), 763–76.
2. Tucker, M., R. R. Staples, M. A. Valencia-Sanchez, D. Muhlrاد, and R. Parker, 2002 Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21: 1427–1436.
3. Brown, C. E., and A. B. Sachs, 1998 Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6548–6559.
4. Benjamin, L.,(2004) Genes VIII. Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ ΟΕ, Αλεξανδρούπολη
5. Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis et al., 2001 The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104: 377–386.
6. Tucker, M., R. R. Staples, M. A. Valencia-Sanchez, D. Muhlrاد, and R. Parker, 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21: 1427–1436.
7. Amrani, N., Minet, M., Gouar, M. L., Lacroute, F., Wyers, F., Minet, L. E., Gouar, M. L. E., et al. (1997). Yeast Pab1 interacts with Rna15 and participates in the control of the poly (A) tail length in vitro. *Mol Cell Biol*, Jul;17(7):3694-701
8. Dageron, M. C., F. Mauxion, and B. Seraphin, 2001, The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29: 2448–2455.
9. Tharun, S., and R. Parker, 2001. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell* 8: 1075–1083.
10. Steiger, M., A. Carr-Schmid, D. C. Schwartz, M. Kiledjian, and R. Parker, 2003 Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA* 9: 231–238.
11. Jiao, X., S. Xiang, C. Oh, C. E. Martin, L. Tong et al., 2010, Identification of a quality-control mechanism for mRNA 5'-end capping. *Nature* 467: 608–611
12. Collier, J., and R. Parker, 2005, General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122: 875–886.

13. Swisher, K. D., and R. Parker, 2010, Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 5: e10006.
14. Allmang, C., E. Petfalski, A. Podtelejnikov, M. Mann, D. Tollervey et al., 1999, The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 39/59 exonucleases. *Genes Dev.* 13: 2148–2158.
15. Liu, Q., J. C. Greimann, and C. D. Lima, 2006 Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127: 1223–1237.
16. Lebreton, A., R. Tomecki, A. Dziembowski, and B. Seraphin, 2008 Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456: 993–996.
17. D. Muhrad, R. Parker, 1994, Premature translational termination triggers mRNA decapping, *Nature* 370:578–581.
18. Doma, M. K., and R. Parker, 2006, Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440: 561–564.
19. Van Hoof, A., P. A. Frischmeyer, H. C. Dietz, and R. Parker, 2002, Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295: 2262–2264.
20. Bashkirov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. a, Buerstedde, J. M., & Heyer, W. D. (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *The Journal of cell biology*, 136(4), 761–73.
21. Cougot, N., Babajko, S., and Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165, 31–40.
22. Muhrad, D., and Parker, R. (2005). The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *EMBO J.* 24, 1033–1045.
23. Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382.
24. Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.
25. Beelman, C.A., and Parker, R. (1994). Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. *J. Biol. Chem.* 269, 9687–9692.
26. Collier, J., and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875–886.

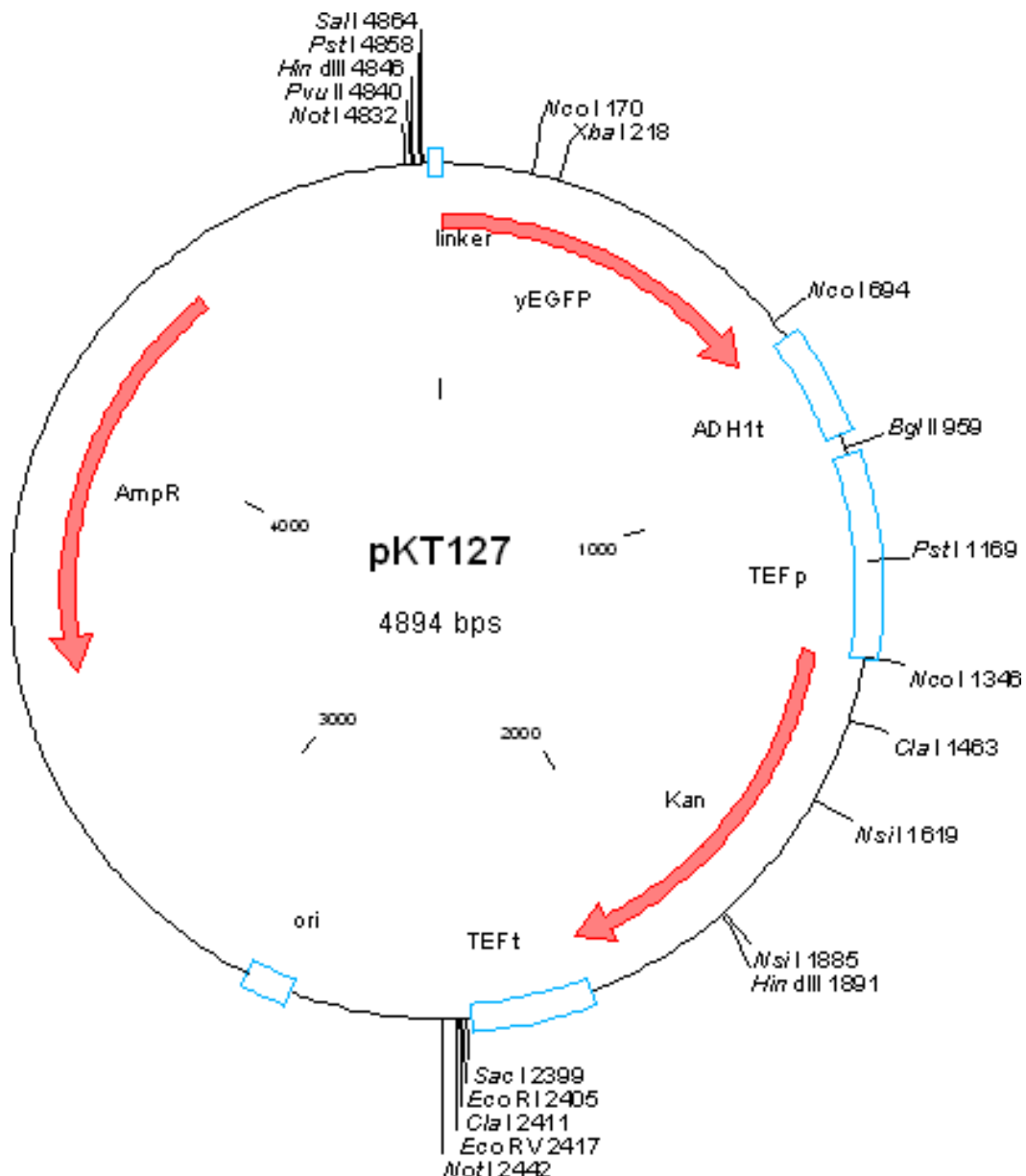
27. Cougot, N., Babajko, S., and Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165, 31–40.
28. Anderson, P., and Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803–808.
29. Anderson, P., and Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *J. Cell Sci.* 115, 3227–3234.
30. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884.
31. Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M.E., Kaufman, R.J., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I., and Pelletier, J. (2006). Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 17, 4212–4219.
32. Fischer, N., and Weis, K. (2002). The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *EMBO J.* 21, 2788–2797.
33. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4569–4574.
34. Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell*, 25(5), 635–46. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011
35. Matsumoto, K., Minami, M., Shinozaki, F., Suzuki, Y., Abe, K., Zenno, S., Matsumoto, S., et al. (2011). Hsp90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. *Biochemical and biophysical research communications*, 407(4), 720–4. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.088
36. Feder ME, Hofmann GE. 1999, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.*;61:243-82
37. Ritossa F. 1962 A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962;18:571–573. doi: 10.1007/BF02172188.
38. Merck KB, Groenen PJ, Voorter CE, de Haard-Hoekman WA, Horwitz J, Bloemendal H & de Jong WW (1993). Structural and functional similarities of bovine α -crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J Biol Chem* 268, 1046–1052.

39. Carmelo V & Sa-Correia I (1997) HySP26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiol Lett* 149: 85–88.
40. Bossier P, Fitch IT, Boucherie H & Tuite MF (1989) Structure and expression of a yeast gene encoding the small heat-shock protein Hsp26. *Gene* 78: 323–330.
41. Amorós M., Estruch F. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene and stress type-dependent manner. *Mol. Microbiol.* 2001;39:1523–1532
42. G.J. Lee, A.M. Roseman, H.R. Saibil, E. Vierling, 1997, A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state, *EMBO J.* 3:659–671.
43. Ehrnsperger M., Graber S., Gaestel M., Buchner J., 1997, Binding of nonnative protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation, *EMBO J.* 16 221–229.
44. K. Wang, A. Spector, 2001, ATP causes small heat shock proteins to release denatured protein, *Eur. J. Biochem.* 268: 6335–6345.
45. Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., et al. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO journal*, 18(23), 6744–51. doi:10.1093/emboj/18.23.6744
46. Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 5(6), 602–607. doi:10.1016/S1369-5274(02)00377-6

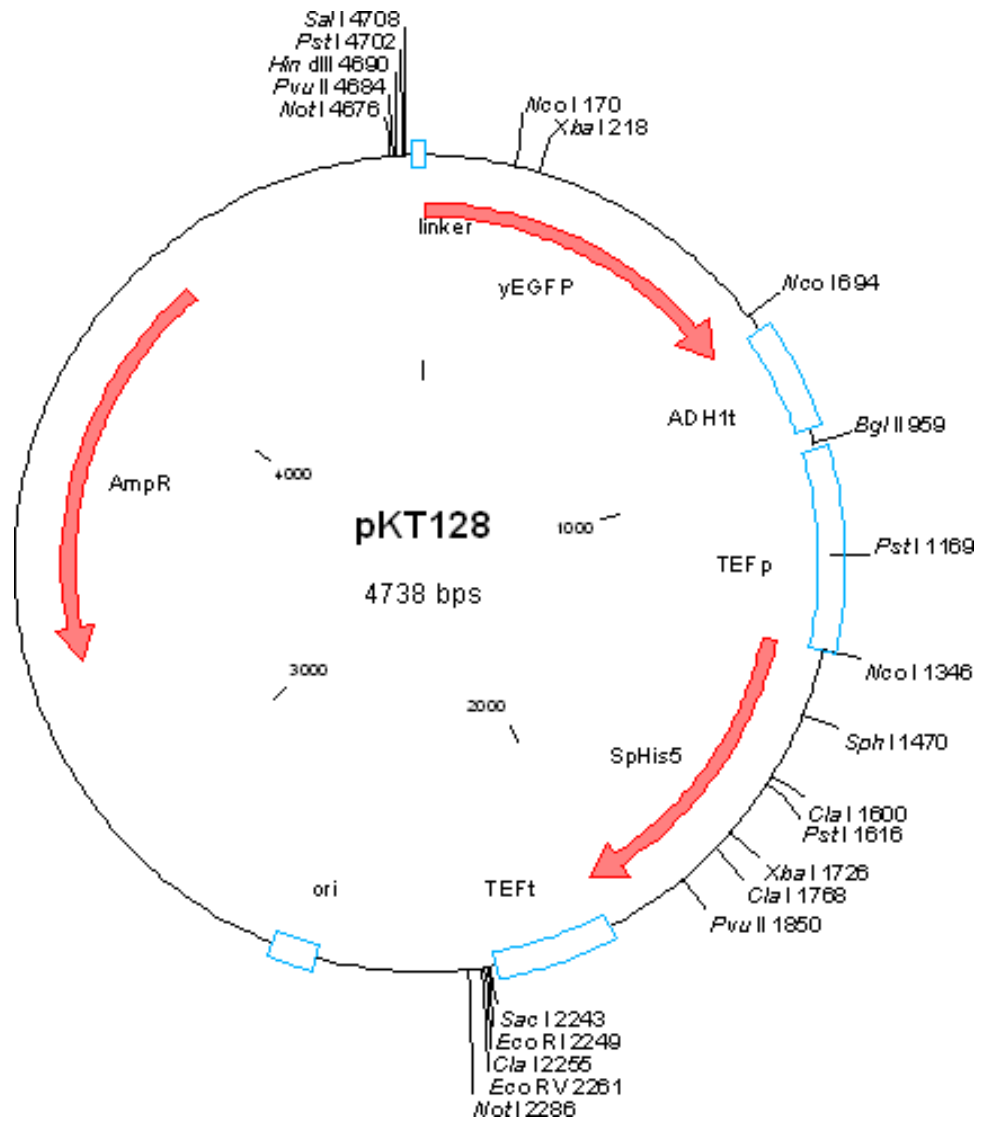
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

➤ Πλασμιδιακοί χάρτες

1) Χάρτης pKT127



2) Χάρτης pKT128



3) Χάρτης PYM6

