



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ
ΤΩΝ 70 kDa (HEAT SHOCK PROTEIN 70: Hsp70)
ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΚΑΛΑΪΤΖΑΚΗΣ Τ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καλαϊτζάκη Αλέξανδρου: 11-9-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 592^α/24-10-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αγγελίδης Χαράλαμπος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βεζυράκη Πατρώνα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-11-2006

«Η λειτουργία της πρωτεΐνης θερμικού σοκ των 70 kDa (heat shock protein 70: Hsp70) στα θηλαστικά κύτταρα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 718^α/12-7-2011

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία - Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μιχάλης Λάμπρος	Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Νάκα Αικατερίνη	Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-12-2012

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

*Στη σύντροφο της ζωής μου Κωνσταντίνα
και στην οικογένειά μου
που δεν έπαψαν να πιστεύουν σε εμένα σε μια από τις πιο
δύσκολες στιγμές της ζωής μου*

*Οι νόμοι είναι τα σκηνικά στα οποία
δεν πιστεύουν ούτε οι θεατές,
ούτε οι άνθρωποι στα παρασκήνια, αλλά
χωρίς αυτά δε βγαίνει η παράσταση*

B. Γκαβρίλοφ

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Ένας μεγάλος κύκλος φτάνει στο τέλος του! Ήταν Δεκέμβριος του 2003 (9 χρόνια πριν), όταν ο φίλος και συνάδελφος Γιώργος Μαρκόπουλος έχοντας ήδη ξεκινήσει πρακτική στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, ήρθε ένα πρωινό λέγοντάς μου ότι ο μετέπειτα επιβλέπων καθηγητής μου κ. Αγγελίδης Χαράλαμπος ζητούσε κάποιο άτομο για πρακτική. Αμέσως ανταποκρίθηκα θετικά, δεδομένου του γεγονότος ότι αρέσκομαι ιδιαίτέρως σε τεχνικά και εργαστηριακά ζητήματα και ήρθα σε συνενόηση με τον κ. Αγγελίδη, οπότε ξεκίνησα πρακτική στο εργαστήριό του. Μετά την πρακτική, το 2005, ήρθε η ώρα της διπλωματικής μου εργασίας για το πτυχίο του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών στο οποίο φοιτούσα. Τελειώνοντας τη διπλωματική μου εργασία, ο κ. Αγγελίδης μου πρότεινε να συνεχίσουμε τη συνεργασία μας στα πλαίσια μιας διδακτορικής διατριβής. Χωρίς σκέψη, απάντησα θετικά. Έτσι, φτάνουμε στο 2012, εννέα χρόνια μετά και ήρθε η μεγάλη ώρα να υποστηρίξω την μακρόχρονη και κοπιώδη εργασία μου στα πλαίσια της διατριβής αυτής.

Τα χρόνια αυτά στο εργαστήριο ήταν γεμάτα εμπειρίες, πότε ευχάριστες, πότε δυσάρεστες, αλλά όταν σε ευχαριστεί το περιβάλλον και αυτό που κάνεις, ξεχνάς τα πάντα και σου μένουν μόνο καλές αναμνήσεις. Επιπλέον, μέσα στα χρόνια αυτά, γνώρισα πολλούς συναδέλφους και έκανα αρκετές φιλίες. Δυστυχώς όμως, ολοκληρώνω τον κύκλο αυτό με μια πίκρα στο στόμα, δεδομένης της σημερινής κατάστασης του Πανεπιστημίου, το οποίο μετά λύπης βλέπω καθημερινά να βυθίζεται λόγω της σημερινής κατάστασης!

Στα πλαίσια της παραμονής μου στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, θα πρέπει να ευχαριστήσω αρκετούς ανθρώπους, αρκετούς από τους οποίους μπορεί και να ξεχάσω, λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος παραμονής στο χώρο και για το λόγο αυτό ζητώ προκαταρκτικά συγγνώμη.

Αρχικά, θα πρέπει να ευχαριστήσω το άτομο που με έφερε αρχικά στο εργαστήριο, το φίλο και συνάδελφο διδάκτορα Μαρκόπουλο Γεώργιο, χωρίς τη συμβολή του οποίου δεν θα είχα ίσως την ευκαιρία αυτή, αλλά και για τη βοήθεια σε πειραματικά αδιέξοδα και για τις συζητήσεις που είχαμε σε σχέση με τα εργαστηριακά και μη θέματα.

Ακολούθως, θα πρέπει να ευχαριστήσω αρκετά άτομα με τα οποία συνεργαστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια και με βοήθησαν με τον ένα ή με τον άλλο τρόπο, είτε σε τεχνικά ζητήματα, είτε σε υλική βοήθεια, είτε ακόμη και σε ηθική υποστήριξη με τις συζητήσεις που είχαμε κατά καιρούς. Ευχαριστώ λοιπόν για τους λόγους αυτούς σε τυχαία σειρά και με ιεράρχηση βάσει ιδιότητας τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Κασμερίδου Ευαγγελία και Κολιού Μαρία, τους υποψηφίους διδάκτορες Γιαννιό Ιωάννη, Μάντζιου Στεφανία Μαλταμπέ Βιολέτα, Βλάικου Μαριάντζελα, Δεληγιάνη Ιωάννη, Ζερικιώτη Στυλιανό και Χονδρογιάννη Γεώργιο, τους διδάκτορες Μποζίδη Πέτρο, Κοτόγλου Πολυχρόνη, Διαλυνά Γεώργιο, Ρήττου Ελένη, Μαρκάκη Γιολάντα, Σουψανά Αικατερίνη, Μακατσώρη Δήμητρα, Σαλιμά Αθανασία, Νουτσόπουλο Δημήτριο, Δημητριάδου Ευτυχία, Ντουχανιάρη Αλεξάνδρα, Λάλου Ηλιάνα, Σίμο Ιωάννη, Βεργινάδη Ιωάννη, Μάντζαρη Μιχάλη, Ζαραλή Αικατερίνη, αλλά και τη Χαρά και τη Μαριάνθη για την αμέριστη βοήθεια στο κυτταρόμετρο ροής, ζητώντας συγγνώμη για όποιονδήποτε πιθανά ξεχάσα.

Ευχαριστίες θα πρέπει να αποδώσω και σε μέλη ΔΕΠ του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις συμβουλές τους σχετικά με θεωρητικά ζητήματα και πρακτικά κωλύματα, αλλά και για την ευγενική παραχώρηση υλικών και συσκευών, χωρίς τα

οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χριστοφορίδη Σάββα, επίκουρο καθηγητή του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την παραχώρηση αντιδραστηρίων, την κ. Παπαμαρκάκη Θωμαή, αναπληρώτρια καθηγήτρια του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την παραχώρηση αντιδραστηρίων, τον κ. Γαλάρη Δημήτριο, καθηγητή στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, για την παραχώρηση αντιδραστηρίων, τον κ. Κούκλη Παναγιώτη, επίκουρο καθηγητή στο εργαστήριο Βιολογίας για την παραχώρηση αντιδραστηρίων και συμβουλών, τους κ. Λαζαρίδη Ιωάννη και Τζαβάρα Θεόδωρο, αναπληρωτές καθηγητές στο εργαστήριο Βιολογίας, για τις συμβουλές τους σε επιστημονικά θέματα και την παραχώρηση υλικών, την κ. Σύρρου Μαρίκα, αναπληρώτρια καθηγήτρια στο εργαστήριο Βιολογίας, για την παραχώρηση υλικών και τις συμβουλές σε θεωρητικά θέματα, την κ. Βεζυράκη Πάτρα, αναπληρώτρια καθηγήτρια στο εργαστήριο Φυσιολογίας για την ενεργό της συμμετοχή στην πειραματική διαδικασία και τις συμβουλές της σε τεχνικά θέματα, τον κ. Κωλέττα Ευάγγελο, επίκουρο καθηγητή του εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την παραχώρηση αντισωμάτων, την κ. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, αναπληρώτρια καθηγήτρια του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, για τις εμψυχωτικές συζητήσεις που είχαμε, την κ. Γαλάνη Βασιλική, επίκουρη καθηγήτρια του εργαστηρίου Ιστολογίας, για την παραχώρηση αντιδραστηρίων, τον κ. Καναβάρο Παναγιώτη, καθηγητή του εργαστηρίου Ιστολογίας, για την παραχώρηση αντιδραστηρίων και πειραματικών αλλά και θεωρητικών συμβουλών και την κ. Νάκα Αικατερίνη, επίκουρη καθηγήτρια καρδιολογίας, για την ενεργό της συμμετοχή σε πειραματικές διαδικασίες και την παραχώρηση υλικών πολύτιμων για αυτές.

Πέραν των συνεργατών και συναδέλφων, ευχαριστίες θα πρέπει να αποδώσω στην κ. Murphy Carol, επιστημονική συνεργάτη του Ινστιτούτου Βιοιατρικών Ερευνών Ιωαννίνων για την ευγενική χορηγία ορισμένων από τις χρησιμοποιηθείσες κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, τον κ. Μπέλλο Γεώργιο για την επιμέλεια των επισκευών ορισμένων χρήσιμων για τα πειράματα συσκευών, την κ. Τσουμάνη Ανδρομάχη, πρώην ΕΤΕΠ στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας για τα αντιδραστήρια αλλά και τις συμβουλές που παρείχε, τον κ. Εξάρχου Ιωάννη, ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου Βιολογίας για την βοήθεια εντός του εργαστηρίου και για την έγκαιρη προμήθεια υλικών, τον κ. Βέρρο Αθανάσιο και τον κ. Μπίλη Απόστολο, φροντιστές στο εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την διατήρηση σε καλή κατάσταση του εκτροφείου, παρά τις αντίξοες συνθήκες, τον κ. Βαρθολομάτο Γεώργιο για συμβουλές πάνω σε τεχνικά θέματα κυτταρομετρίας ροής, την κ. Χριστοδούλου Αντιγόνη, ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ευγενική παραχώρηση αντιδραστηρίων και την κ. Νάνου Αναστασία, συνεργάτιδα προγραμμάτων του Μιχαηλίδειου καρδιολογικού κέντρου, για τη βοήθεια σε γραφειοκρατικά ζητήματα.

Για την εύνομη λειτουργία του εργαστηρίου και τις άψογες σχέσεις και συνεργασία που υπήρξε όλο αυτό το διάστημα, θα πρέπει να ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας του κ. Αγγελίδη Βραζέλη Εύη και Κασιούμη Παναγιώτα, υποψήφιος διδάκτορες και Γκέκα Δέσποινα, μεταπτυχιακή φοιτήτρια.

Ευχαριστώ επίσης τους φίλους Γερογιάννη Δημήτρη, Αθανασίου Κυριάκο και Μαρκόπουλο Γεώργιο για τις στιγμές ξεκούρασης που περάσαμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια, η παρουσία των οποίων υπήρξε καταλυτική για την ανάπαυλα του μυαλού από τα ζητήματα του εργαστηρίου, καθώς επίσης και τη σύντροφό μου Κωνσταντίνα, της οποίας η υπομονή, η συντροφιά και οι συμβουλές υπήρξαν αμέριστο στήριγμά μου όλα αυτά τα χρόνια, ιδίως κατά τη διάρκεια του σταδίου της συγγραφής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα πρέπει να αποδώσω αυτή τη στιγμή στους γονείς μου Τρύφωνα και Μαρία, για την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια και τη στήριξη που μου προσέφεραν, τόσο ηθική, όσο και οικονομική, αλλά και τα αδέρφια μου Γιώργο και Κέλλυ, για τις αμέτρητες ώρες προβληματισμών στο τηλέφωνο.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις συμβουλές τους πάνω στο περιεχόμενο της διατριβής αυτής και να αποδώσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Αγγελίδη Χαράλαμπο, αναπληρωτή καθηγητή στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, τον οποίο θεωρώ τον επιστημονικό μου πατέρα, που για όλα αυτά τα χρόνια μου παραχώρησε τη δυνατότητα χρήσης του χώρου του εργαστηρίου του για την επιστημονική μου δράση, αλλά και τις γνώσεις του και τις συμβουλές του στα όποια θεωρητικά και τεχνικά θέματα της Βιολογικής Επιστήμης, χωρίς τις οποίες πολλά προβλήματα δεν θα είχαν επιλυθεί, αλλά και για τις εκτός εργαστηριακών θεμάτων συζητήσεις, σε στιγμές χαλάρωσης στο εργαστήριο.

ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΟΛΟΥΣ ΘΕΡΜΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Μοριακοί Συνοδοί (Chaperones – Co-chaperones)	1
Γενικά στοιχεία	1
Ιστορικά στοιχεία	4
1.1.1. Μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών	5
Chaperonins	5
Μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού σοκ και α-κρυσταλλίνες	6
Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 40kDa	6
Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 60kDa	7
Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70kDa	8
Hsc70	9
Hsp70	10
BiP	10
Grp75	11
Ssa1-4p	12
Kar2	12
DnaK	13
Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 90kDa	14
Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 100kDa	15
Καλνεξίνη, καλρετικουλίνη (Calnexin, calreticulin)	15
Εξειδικευμένοι μοριακοί συνοδοί	16
PapD	16
Hsp47	16
RAP (receptor-associated protein)	16
Ομοσυνοδές πρωτεΐνες της οικογένειας των Hsp70s	16
Bag-1	17
Hip	17
DnaJ1	17
Αυξιλίνη (auxilin)	17
p16	17
1.1.3. Λειτουργίες των μοριακών συνοδών	17
1.2. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ των 70 kDa – Hsp70	22
Δομή της Hsp70	27
Λειτουργίες της Hsp70	29
1.3. Βλάβες στο DNA και παράγοντες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωσή του	32
Θερμικό σοκ και DNA βλάβες	33
Δοξορουβικίνη και DNA βλάβες	33
Επιδιόρθωση DNA βλαβών: ο μηχανισμός BER	33
Η πολυμεράση 1 της πολυ-ADP-ριβόζης (PARP-1)	34
XRCC1	36
1.4. Εμπλοκή της Hsp70 στις βλάβες του DNA και στην επιδιόρθωσή τους	39
1.5. Η εμπλοκή των Hsp70/p14 ^{ARF} /β-κατενίνης σε αποπτωτικό κυτταρικό μηχανισμό μετά από οξειδωτικό και θερμικό στρες	40
Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p14 ^{ARF}	40

β-κατενίνη	43
Η επίδραση της Hsp70 στην p14 ^{ARF} /β-κατενίνη απόπτωση	47
1.6. Παθήσεις της καρδιάς	47
Ανατομική της καρδιάς	47
Καρδιακή ανεπάρκεια	48
1.7. Η κυτταροστατική ουσία δοξορουβικίνη	49
Αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τη δοξορουβικίνη και παράγοντες που εμπλέκονται	50
p53	50
BAX	51
Κασπάση-9	51
Κασπάση-3	51
1.9. Η Hsp70 στις καρδιακές παθήσεις	51
1.10. Σκοπός της εργασίας	53
2. ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ	55
2.1. Κυτταροκαλλιέργεια ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	55
2.1.1. Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων	55
2.1.2. Κυτταρικές σειρές	55
2.1.3. Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας	56
2.1.3.1. Θρεπτικά μέσα	56
2.1.3.2. Διάλυμα έκπλυσης με ιόντα φωσφορικών αλάτων (PBS)	56
2.1.3.3. Ορός (FBS)	56
2.1.3.4. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA	57
2.1.4. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	57
2.2. Καλλιέργεια βακτηρίων	57
2.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων	57
2.2.2. Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας βακτηρίων	58
2.2.3. Αποθήκευση βακτηριακών καλλιεργειών	58
2.3. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα θηλαστικών	58
2.4. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ιστούς	59
2.5. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad protein assay)	59
2.6. Άλλες μέθοδοι υπολογισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα	60
2.7. Συμπύκνωση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ (TCA precipitation)	60
2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	61
2.9. Μεταφορά πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης	62
2.10. Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με χρωστική coomassie blue	62
2.11. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)	63
2.12. Εμφάνιση των αντιγόνων με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)	64
2.13. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με Ponceau S	65
2.14. Μη αποδιατακτική ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Non-denaturing immunoprecipitation)	65
2.15. Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σε κυτταρικό παρασκεύασμα (Indirect cell immunofluorescence)	66
2.16. Έμμεσος ανοσοφθορισμός ιστών και χρώση πυρηνικού DNA	67
2.17. Συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal microscopy)	67

2.18. Απομόνωση πυρηνίσκων σε βαθμίδωση σακχαρόζης	69
2.19. Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων πυρηνίσκων σε πηκτική αγαρόζη (Nucleolar Comet Assay, NCA)	69
2.20. Διαδικασία δημιουργίας επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Competent cells)	70
2.21. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	70
2.22. Αλκαλική λύση βακτηρίων για εξαγωγή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep)	71
2.23. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi prep)	72
2.24. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα	72
2.25. Εισαγωγή εξωγενούς DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα	73
2.25.1. Συνδιαμόλυνση HeLa κυττάρων με πλασμιδιακό DNA για αποσιώπηση της Hsp70 μέσω της τεχνολογίας siRNA (Co-transfection)	73
2.25.2. Διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων για την αποσιώπηση έκφρασης της p14 ^{ARF} μέσω της τεχνολογίας short-hairpin RNA (shRNA)	74
2.25.3. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με Stealth select RNAi pool για αποσιώπηση της β-κατενίνης	74
2.26. Κυτταρομετρία ροής	74
2.26.1. Μελέτη της απόπτωσης και της έκφρασης της Hsp70 σε HeLa κύτταρα	74
2.26.2. Μελέτη της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa, H1299 και NARF2	75
2.27. Έλεγχος έκφρασης της β-κατενίνης μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)	75
2.28. Μέτρηση ενεργότητας της β-κατενίνης μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης (Luciferase assay)	76
2.29. Πειραματόζωα	76
2.29.1. Συντήρηση πειραματοζώων	77
2.29.2. Αναπαραγωγή πειραματοζώων	77
2.29.3. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού DNA από ιστούς ποντικών	77
2.29.4. Επιβεβαίωση ομοζυγωτίας για το διαγονίδιο της Hsp70 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	78
2.29.5. Πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας	78
2.29.6. Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη των ποντικών	79
2.29.7. Λήψη και συντήρηση ιστών	79
2.30. Κρυοτομές ιστών	80
2.31. Απομόνωση κυττάρων μυοκαρδίου από ποντίκια με τη μέθοδο ταχείας προσκόλλησης	80
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
Hsp70 & Λειτουργίες της	83
3.1. Γονιδιακή αποσιώπηση της Hsp70 σε HeLa κύτταρα	83
3.2. Η απουσία της Hsp70 στα HeLa κύτταρα προκαλεί θερμοευαισθησία και αυξημένη αποπτωτικότητα	84
3.3. Επιλογή κυτταρικών κλώνων για την αποσιώπηση της p14 ^{ARF} σε HeLa κύτταρα	87
3.4. Μελέτη έκφρασης της p14 ^{ARF} σε συνθήκες στρες	87
3.5. Μελέτες της επίδρασης της p14 ^{ARF} στην απόπτωση HeLa και H1299 κυττάρων μετά από στρες μέσω κυτταρομετρίας ροής	88
3.6. Η απουσία της p14 ^{ARF} εξασθενεί την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες	89

3.7. Έλεγχος έκφρασης της β-κατενίνης μετά από στρες σε καρκινικά κύτταρα	90
3.8. Μελέτη μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου της β-κατενίνης μέσω ενεργότητας λουσιφεράσης	92
3.9. Η β-κατενίνη εμφανίζει αντι-αποπτωτική δράση απουσία της p14 ^{ARF}	93
3.10. Η Hsp70 ρυθμίζει την έκφραση της β-κατενίνης και συνεργάζεται με την p14 ^{ARF}	94
3.11. Η Hsp70 συνεργάζεται άμεσα με την p14 ^{ARF} σε συνθήκες στρες	95
Hsp70 & καρδιακή ανεπάρκεια	99
3.12. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ως μέσο ανίχνευσης της ομοζυγωτίας διαγονιδιακών ζώων	99
3.13. Η παρουσία της Hsp70 βελτιώνει αισθητά την καρδιακή λειτουργία μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης	100
3.14. Η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, ελέγχοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-3	104
3.15. Η Hsp70 αποτρέπει την απόπτωση των κυττάρων του μυοκαρδίου ελέγχοντας τη φωσφορυλίωση της p53	105
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	119
5.1. Περίληψη	119
5.2. Summary	119
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	121
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	149
7.1. Συντομογραφίες	149

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Hsp70 (Heat Shock Protein 70) συνιστά μια πρωτεΐνη που εντάσσεται στην υπο-οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 kDa. Ανήκει επίσης στην οικογένεια των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών (Chaperones). Συνεργάζεται με ομο-συνοδές πρωτεΐνες (Co-chaperones) για τη δημιουργία λειτουργικών νανομηχανών. Η έκφρασή της επάγεται από περιβαλλοντικά, φυσικά ή χημικά ερεθίσματα και εμπλέκεται σε:

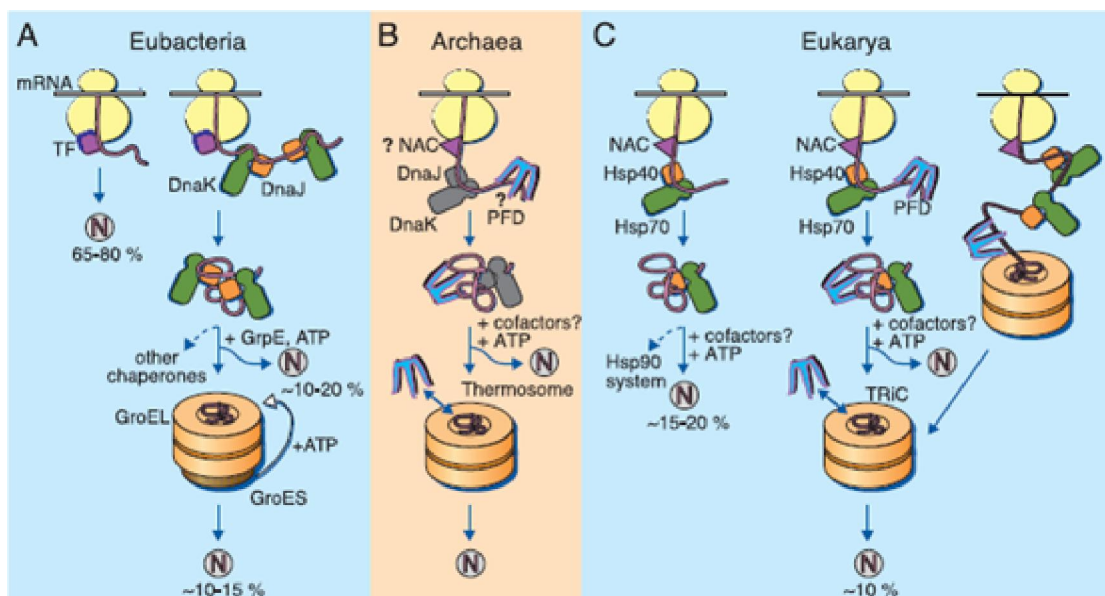
- α) μοριακούς κυτταρικούς μηχανισμούς όπως η δίπλωση/αναδίπλωση (folding/refolding) των πρωτεϊνών,
- β) κυτταρικά μονοπάτια όπως απόπτωση, κυτταρική επιβίωση, θερμοανοχή, DNA επιδιόρθωση και
- γ) στην προστασία των οργανισμών από ασθένειες ή παθολογικές καταστάσεις όπως έμφραγμα, εγκεφαλικό, επιληψία, μυϊκή δυστροφία και την καρδιακή ανεπάρκεια που αποτελεί και τον στόχο της παρούσας εργασίας.

1.1. Μοριακοί Συνοδοί (Chaperones – Co-chaperones)

Γενικά στοιχεία: Οι μοριακοί συνοδοί απαρτίζουν μια ομάδα από φαινομενικά μη σχετιζόμενες πρωτεΐνες. Δραστηριοποιούνται σε μια πληθώρα διεργασιών, όπως:

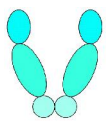



- α) τη μετα-μεταφραστική αναδίπλωση ολιγομερών πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό φέρουν δομικές πληροφορίες για τη συγκρότησή τους (Ellis, 1987; Goloubinoff et al., 1989b),
- β) την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Εάν υπάρχουν σημαντικά σφάλματα διαμόρφωσης ή συμπλεγματοποίηση που οφείλονται σε περιβαλλοντικό στρες ή ασθένεια, λειτουργούν ως αισθητήρες που ωθούν το κύτταρο προς απόπτωση (Saibil, 2008).

Συναντώνται σε ιικά, ζωικά αλλά και φυτικά κύτταρα (Ellis, 1987), αλλά και σε οργανισμούς και των τριών βασιλείων καθώς και σε ενδοσυμβιωτικά κυτταρικά οργανίδια (Ellis, 1996; Fenton and Horwich, 1997) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Η ευρεία κατανομή των μοριακών συνοδών στους οργανισμούς των διαφόρων βασιλείων (Hartl and Hayer-Hartl, 2002)

Συγκεντρωτικά, τα κυριότερα μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών, η δομή, η λειτουργία, καθώς και οι τυχόν ομοσυνοδές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στις διάφορες λειτουργίες τους παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1.1).

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

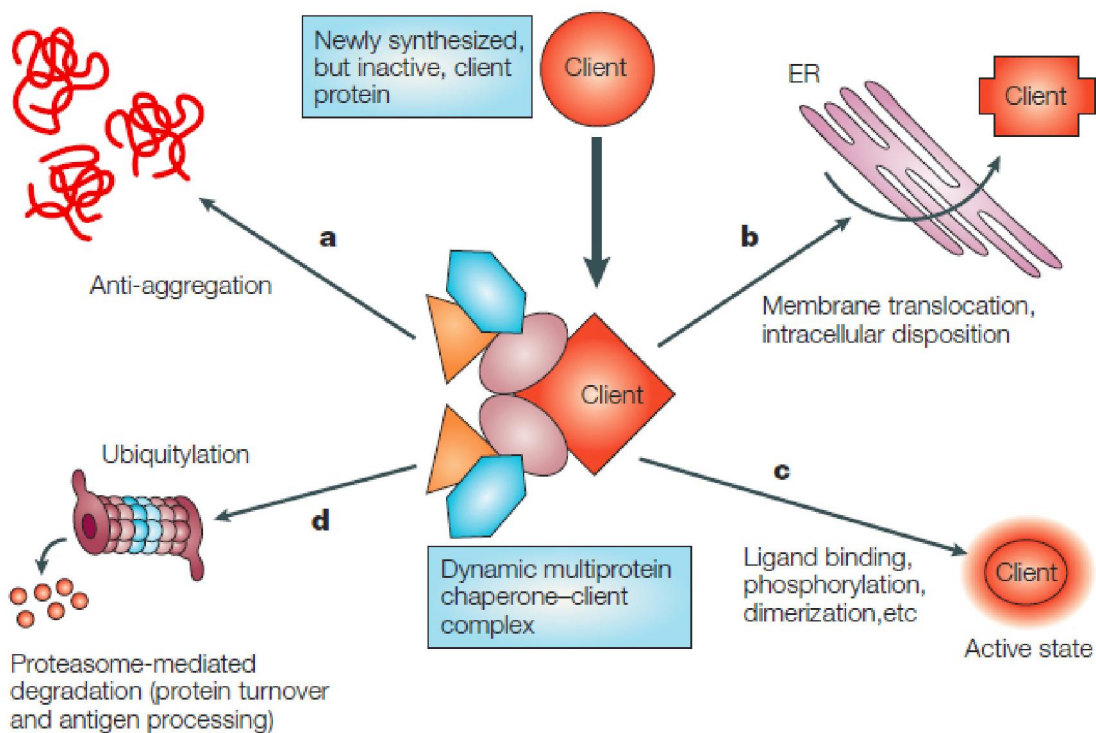
Πίνακας 1.1: Οι οικογένειες των μοριακών συνοδών με την αντίστοιχη δομή και λειτουργία τους (Αγγελίδης, 2003α; Macario and de Macario, 2005; Terasawa et al., 2005; Tyedmers et al., 2010).

Αναλύοντας τον πίνακα παρατηρούμε ότι οι συνοδές πρωτεΐνες (Hsp70, DnaK, GroEL) συνεργάζονται με ομοσυνοδές πρωτεΐνες (DnaJ, Grp, GroES) δημιουργώντας μοριακές νανομηχανές (Hsp70/DnaJ, DnaK/GrpE, GroES/GroEL) με συγκεκριμένη λειτουργία.

Οι μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται:

- α) στη σταθεροποίηση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών προς αποτροπή συμπλεγματοποίησής τους (Fenton and Horwich, 1997),
- β) στην αποδιάταξη πρωτεϊνών (Lewis and Pelham, 1985) προς μεταφορά αυτών διαμέσου μεμβρανών,
- γ) στον καταβολισμό πρωτεϊνών καθιστώντας τις στόχους σε πρωτεάσες (Saibil, 2008) και
- δ) στον έλεγχο της ορθής διαμόρφωσης και τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών (Saibil, 2008) (Εικόνα 1.2).

Η αποτυχία της ορθής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών είναι θανατηφόρος, όχι μόνο λόγω απώλειας της λειτουργικότητάς τους, αλλά ακόμη περισσότερο λόγω της τοξικότητας των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που σχηματίζουν. (Saibil, 2008).



Εικόνα 1.2: Διεργασίες της διατήρησης της ακεραιότητας των πρωτεϊνών στις οποίες συμμετέχουν οι μοριακοί συνοδοί (Whitesell and Lindquist, 2005).

Οι μοριακοί συνοδοί, συνήθως της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, εδράζονται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Saibil, 2008). Μετά από σύντομο, ή εκτεταμένο θερμικό σοκ, εισέρχονται στους πυρήνες και στους πυρηνίσκους αφενός μεν για την επιδιόρθωση του DNA (Kotoglou et al., 2009) αφετέρου δε για την ταχύτερη επιδιόρθωση των πυρηνίσκων και τη συγκρότηση των ριβοσωμάτων με άμεση πρόσδεση και επιδιόρθωση των κατεστραμμένων RNPs (Pelham, 1984).

Οι μοριακοί συνοδοί έχουν κάποιες κοινές ιδιότητες, οι οποίες συνοψίζονται στην αλληλεπίδραση με μη αναδιπλωμένες ή μερικά αναδιπλωμένες υπομονάδες, (π.χ. νεοσυντιθέμενες αλυσίδες κατά την έξοδό τους από το ριβόσωμα, ή εκτεταμένες

αλυσίδες που μεταφέρονται διαμέσου υποκυτταρικών μεμβρανών). Επιπλέον, σταθεροποιούν τη μη φυσική διαμόρφωση και διευκολύνουν την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνικών υπομονάδων (Ellis, 1987; Hartl, 1996). Δεν αλληλεπιδρούν με τις ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, ούτε αποτελούν τμήμα της τελικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών (Ellis, 1987). Ορισμένοι μοριακοί συνοδοί εμφανίζουν μη-ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα (Saibil, 2008), ενώ άλλοι περιορίζονται σε συγκεκριμένους στόχους. Συνήθως, απαιτούν πρόσδεση/υδρόλυση ATP προκειμένου να ολοκληρώσουν τη διαδικασία αναδίπλωσης (Gething and Sambrook, 1992; Barral et al., 2004; Morange, 2005; Saibil, 2008). Τέλος, θεωρούνται απαραίτητοι για τη βιωσιμότητα του κυττάρου (Hemmingsen et al., 1988; Ellis and Hemmingsen, 1989; Angelidis et al., 1991; Jakob et al., 1993), ενώ η έκφρασή τους πλειορρυθμίζεται στην περίπτωση που τα κύτταρα υποβληθούν σε κάποιο τύπο στρες (Gething and Sambrook, 1992; Craig et al., 1994; Hartl, 1996), όπως θερμικό (Lindquist, 1986; Lindquist and Craig, 1988; Craig and Gross, 1991; Braig et al., 1994; Plumier et al., 1995), χημικό (Lindquist, 1986; Lee, 1987; Lindquist and Craig, 1988; Yokota et al., 2000), υποξία ή ανοξία, ακόμα και ιική μόλυνση (Lindquist and Craig, 1988).

Ιστορικά στοιχεία: Η πρώτη ιδέα για την έννοια των μοριακών συνοδών προήλθε από την παρουσία μιας τοξίνης στο δηλητήριο του αυστραλιανού φιδιού *Oxyuranus s. scutellatus*. Οι δύο υπομονάδες (β και γ) της πρωτεΐνης που περιβάλλουν την ενεργό νευροτοξική υπομονάδα α, περιγράφησαν ως συνοδοί, οι οποίοι αυξάνουν την ειδικότητα της τοξίνης και την προστατεύουν από τον καταβολισμό (Fohlman et al., 1976). Από την παρατήρηση αυτή, δεν έγινε περαιτέρω προσπάθεια για επέκταση της έννοιας του συνοδού σε άλλα συστήματα (Ellis, 1996; Morange, 2005).

Ο όρος μοριακός συνοδός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Laskey, για να περιγράψει το ρόλο μιας πρωτεΐνης η οποία παρεμποδίζει τις λανθασμένες ιονικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ιστόνες και το DNA σε εκχυλίσματα από αυγά που λήφθηκαν από το βάτραχο *Xenopus laevis* (Laskey et al., 1978). Η πρωτεΐνη αυτή, η οποία αρχικά χαρακτηρίστηκε ως «πρωτεΐνη συγκρότησης νουκλεοσωμάτων», δεν ήταν άλλη από τη νουκλεοπλασμίνη. Ο καταλυτικός αυτός παράγοντας, έχοντας οξειδωτικές ιδιότητες, βοηθά στην οργάνωση των ιστονών σε «πρόδρομα νουκλεοσωμικά σύμπλοκα» (Laskey et al., 1978), ελλατώνοντας το ισχυρό θετικό φορτίο των μονομερών ιστονών. Η νουκλεοπλασμίνη χαρακτηρίστηκε ως μοριακός συνοδός, γιατί αφενός δεν είναι συστατικό των νουκλεοσωμάτων, αφετέρου δε το νουκλεόσωμα δύναται να συγκροτηθεί αφ' εαυτού, εάν μειωθεί η υψηλή αλατότητα του διαλύματος με διαπύδηση (Ellis, 1996).

Μια δεκαετία σχεδόν αργότερα, ο όρος αυτός γενικεύτηκε για να περιγράψει μια κατηγορία κυτταρικών πρωτεϊνών των οποίων η βασική λειτουργία είναι η διασφάλιση της ορθής αναδίπλωσης άλλων πολυπεπτιδικών αλυσίδων και της συγκρότησής τους σε ολιγομερείς δομές (Ellis, 1987), ακολουθώντας την πρόταση του Hugh Pelham για την ύπαρξη τέτοιων πρωτεϊνών και συγκεκριμένα της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 και 90 kDa (Hsp70s και Hsp90s). Ο Pelham είχε ισχυριστεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες, καθώς εδράζονται στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, κατεξοχήν χώροι της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ υπό συνθήκες στρες βοηθούν στην επανασυγκρότηση των αποδιαταγμένων κυτταρικών δομών (Pelham, 1986).

Η ιστορία της άλλης υπο-ομάδας των μοριακών συνοδών (chaperonins) περιλαμβάνει δύο άσχετες φαινομενικά παρατηρήσεις, που χρονολογούνται στη δεκαετία του 1970. Αυτές είναι η γενετική της μορφογένεσης του βακτηριοφάγου λ,

κατά την οποία απαιτείται η παρουσία των δύο ισομορφών της πρωτεΐνης GroE (GroEL και GroES ή chaperonin 60 – cpn60 και chaperonin 10 – cpn10 αντίστοιχα - Goloubinoff et al., 1989b) (Georgopoulos et al., 1973; Tilly et al., 1981; Georgopoulos et al., 1983; Kochan and Murialdo, 1983) όσο και του βακτηριοφάγου T4, κατά το πρώτο στάδιο συγκρότησης του καψιδίου (Murialdo, 1979; Georgopoulos et al., 1983), ενώ απουσία ή κατόπιν μετάλλαξης στο γονίδιο *groE*, παρατηρείται εσφαλμένη συγκρότηση της κεφαλής στους φάγους αυτούς (Coppo et al., 1973; Sternberg, 1973; Murialdo and Becker, 1978; Georgopoulos et al., 1983), όσο και της ουράς του φάγου T5 (Zweig and Cummings, 1973).

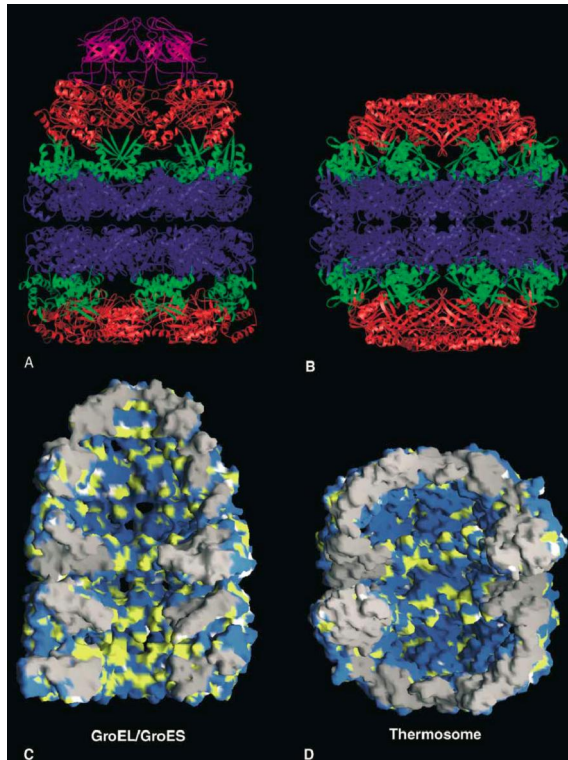
Η δεύτερη παρατήρηση αφορά στη σύνθεση του ενζύμου ribulose 1,5 biphosphate carboxylase (Rubisco) κατά τη βιογένεση των χλωροπλαστών (*Pisum sativum*), κατά την οποία απαιτείται η πρόσδεση της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος με το «πολυπεπτίδιο 60» (Barraclough and Ellis, 1980; Ellis, 1996). Ανάλογα φαινόμενα παρατηρήθηκαν και σε εκχυλίσματα από φύλλα σπανακιού, σίτου, κριθαριού και καπνού (Ellis and Van der Vies, 1988).

Οι δύο αυτές παρατηρήσεις συνδυάστηκαν στα τέλη του 1980 από τις ομάδες των Georgopoulos και Ellis, οι οποίοι έδειξαν ότι η GroEL και η Rubisco-συνδέουσα πρωτεΐνη είναι εξελικτικά ομόλογες μεταξύ τους. Η ομολογία αυτή βασίστηκε στην προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία τους, στη στερεοδομή τους, καθώς και οι δύο αποτελούνται από 14 υπομονάδες, αλλά και στη λειτουργία τους, καθώς εμφανίζουν ασθενή δράση ATPάσης (Hendrix, 1979; Hemmingsen et al., 1988; Ellis and Van der Vies, 1988). Τελικά στην κατηγορία αυτή των μοριακών συνοδών, στην οποία ανήκουν πρωτεΐνες βακτηρίων, μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών, αποδοθηκε η ονομασία «chaperonins» (Hemmingsen et al., 1988; Ellis, 1996). Επιπλέον δεδομένα για τη σχέση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών έδωσε και η ομάδα του Lorimer, αποδεικνύοντας ότι η αυξημένη έκφραση των GroE πρωτεϊνών οδηγεί σε αύξηση της ενεργής Rubisco κατά τη μετα-μεταφραστική συγκρότηση των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων της Rubisco για το σχηματισμό του ενεργού ολοενζύμου, αλλά και στη μετατροπή των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων σε ένα οκταμερή πυρήνα. Από την άλλη, μεταλλάξεις του *groE* γονιδίου, οδήγησαν σε έλλειψη ενεργής Rubisco και συγκρότησης του ολοενζύμου. (Goloubinoff et al., 1989a). Τελικώς, απεδείχθη ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας GroE αποτελούν σημαντικό κομμάτι της απόκρισης σε θερμικό σοκ και επικουρούν τη διαδικασία αναδίπλωσης άλλων πρωτεϊνών (Lorimer, 2001).

1.1.1. Μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών

Η οικογένεια των μοριακών συνοδών (Chaperones) και ομο-συνοδών (Co-Chaperones) αποτελείται από αρκετά μέλη (Πίνακας 1.1). Μερικά από αυτά επάγονται κατά την διάρκεια έκθεσης των κυττάρων σε στρες (περιβαλλοντικό, φυσικό ή χημικό). Για τον λόγο αυτό ονομάζονται και στρες πρωτεΐνες (stress proteins) ή πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins).

Chaperonins: Όσον αφορά στην υποομάδα των «chaperonins», βασισμένοι στην ομολογία των αλληλουχιών τους, μπορούμε να τις κατατάξουμε σε δύο ομάδες (Εικόνα 1.3). Η ομάδα I αποτελείται από μέλη που ανήκουν στα ευβακτήρια (GroEL), τα μιτοχόνδρια (Hsp60) και τους χλωροπλάστες (Rubisco προσδένουσα πρωτεΐνη), ενώ η ομάδα II αποτελείται από μέλη που ανήκουν στα αρχαιοβακτήρια (θερμόσωμα/TF55) (Phipps et al., 1991) και μέλη που συναντώνται στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών οργανισμών, από ζυμομύκητες έως και θηλαστικά (TCP1/CCT)



Εικόνα 1.3: Η δομή δύο βασικών μελών από τις 2 ομάδες των “chaperonins” (Horwich et al., 2004).

(Lewis et al., 1992; Yaffe et al., 1992). Οι δύο ομάδες έχουν παρόμοια αρχιτεκτονική και ενζυμικές ιδιότητες, αλλά έχουν και σημαντικές διαφορές που υποδεικνύουν τους διαφορετικούς τους ρόλους (Xu and Sigler, 1998).

Και οι δύο ομάδες είναι θερμικά επαγόμενες και διευκολύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών στη φυσική τους διαμόρφωση *in vivo* μέσω κύκλων πρόσδεσης ATP (Horwich et al., 2004).

Μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού σοκ και α-κρυσταλλίνες: Οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού σοκ αποτελούν μια πολυπληθή και ετερογενή ομάδα ATP-ανεξάρτητων μοριακών συνοδών (Lindquist, 1986; Barral et al., 2004) που σχηματίζουν μεγάλα σύμπλοκα (συνήθως ένα κέλυφος 12 – 24 υπομονάδων, πιο σπάνια 50 υπομονάδων - Clark and Muchowski, 2000) που φέρουν μια κοινή περιοχή α-

κρυσταλλίνης με μια β-πτυχή (Saibil, 2008). Συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς (Lindquist, 1986) και το μοριακό τους βάρος ποικίλει από 12 έως 43 kDa (Fink, 1999), ενώ άλλες αναφορές υποδεικνύουν πρωτεΐνες μοριακού βάρους 15 έως 40 kDa (Barral et al., 2004) ή ακόμα και 16 έως 40 kDa (White et al., 2006). Συνήθως συγκροτούνται από διμερή που σχηματίζουν μεταβλητούς δεσμούς στις αμινικές (N-) και καρβοξυλικές (C-) περιοχές τους (White et al., 2006; Shi et al., 2006). Σταθεροποιούν παθητικά τις αποδιαταγμένες λόγω στρες πρωτεΐνες, οι οποίες παραδίδονται ακολούθως στους ATP-εξαρτούμενους μοριακούς συνοδούς προς επαναδίπλωση ή αποσυμπλοκοποίηση. Εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες και φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα και τη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς και με αρκετά άλλα κυτταρικά μονοπάτια (Saibil, 2008). Παρ’ όλα αυτά, ο ρόλος τους φαίνεται να είναι δευτερεύουσας σημασίας, καθώς ο ρυθμός απελευθέρωσης των προσδεδεμένων αποδιαταγμένων πρωτεϊνών είναι μικρός ή ανύπαρκτος (Fink, 1999).

Αντιπρόσωπος της οικογένειας αυτής είναι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ των 25 kDa (Hsp25) που ανήκει στις α-κρυσταλλίνες και αποτελεί συστατικό του φακού του οφθαλμού. Η δράση της έγκειται στην προστασία έναντι του κυτταρικού στρες, προσδένοντας ισχυρά τις μετουσιωμένες από το στρες πρωτεΐνες, παρεμποδίζοντας έτσι τη συσσώρευσή τους. Με τον τρόπο αυτό, δεν επιτρέπει το σχηματισμό καταρράκτη στον οφθαλμό (Fink, 1999).

Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 40kDa: Η οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 40 kDa ή DnaJ οικογένεια αριθμεί πάνω από 100 μέλη που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας διατηρημένης J-περιοχής αποτελούμενης από περίπου 78 κατάλοιπα (Fink, 1999). Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αποτελούνται συνήθως

από αρκετές περιοχές (Fink, 1999). Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των μη J-περιοχών των μελών της οικογένειας. Τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα είναι η DnaJ από την *E. coli* και αρκετά ομόλογα αυτής που συναντώνται στους ζυμομύκητες, όπως η Mdj1p και η Ydj1p (Fink, 1999). Η Mdj1p αποτελεί τη μιτοχονδριακή ομόλογο της DnaJ και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Cyr et al., 1994; Rowley et al., 1994), την προστασία των πρωτεϊνών από θερμική αποδιάταξη, το σχηματισμό συμπλεγμάτων (Rowley et al., 1994) και τη συγκρότηση των μιτοχονδρίων κατά την αερόβια ανάπτυξη (Rowley et al., 1994; Cyr et al., 1994). Με την απουσία της Mdj1p παρατηρείται συνάθροιση συμπλεγμάτων από τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες που εισέρχονται στα μιτοχόνδρια σε υψηλές θερμοκρασίες (Rowley et al., 1994; Cyr et al., 1994). Η Ydj1p, που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, αποτελεί ομόλογη της DnaJ στους ζυμομύκητες και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη δράση ATPάσης των Ssa και Ssb πρωτεϊνών, που είναι ομόλογες της Hsp70 στους ζυμομύκητες, επηρεάζοντας την πρόσδεση των υποστρωμάτων σε αυτές (Cyr and Douglas, 1994). Επιπλέον, η Ydj1p διευκολύνει την είσοδο των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, ενώ με τη φαρνεσυλίωσή της μετά από θερμικό σοκ προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα (Cyr et al., 1994). Άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας θερμικού σοκ των 40 kDa με δράση μοριακού συνοδού που φέρουν J-περιοχή είναι η Sisl που εμπλέκεται στα στάδια συγκρότησης/αποδιάταξης των πρωτεϊνών κατά την έναρξη της μετάφρασης, με την πρόσδεσή της στη 40S υπομονάδα των ριβοσωμάτων αλλά και στα μικρότερα πολυσώματα (Zhong and Arndt, 1993) και η Sec63, μια μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελεί την πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας των J-πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκε σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελεί ενδογενές στοιχείο του μηχανισμού διαμεμβρανικής μεταφοράς. Η τελευταία είναι γνωστό ότι διευκολύνει τη μεταφορά νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών που εκκρίνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Rothblatt et al., 1989), ή τη μεταφορά πρωτεϊνών στον πυρήνα, αποτελώντας ίσως στοιχείο του πυρηνικού πόρου (Sadler et al., 1989).

Ο ρόλος της Hsp40 που έχει προσδιοριστεί καλύτερα μέχρι σήμερα είναι αυτός του ομοσυνοδού της Hsp70. Παρ' όλα αυτά, δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της Hsp40, ενώ υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η DnaJ και άλλα μέλη της οικογένειας θερμικού σοκ των 40 kDa είναι αφ'εαυτού μοριακοί συνοδοί, εφόσον προσδέονται σε κάποιες μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Fink, 1999; Bozidis et al., 2002).

Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 60kDa: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής ανήκουν στην οικογένεια των “chaperonins” (Hemmingsen et al., 1988). Έχουν ασθενή δράση ATPάσης (Chandrasekhar et al., 1986; Viitanen et al., 1990; Martin et al., 1991), εκφράζονται κατά συνεχή τρόπο (Hartl et al., 1992) και εμπλέκονται στη ρύθμιση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (Cheng et al., 1989; Goloubinoff et al., 1989a; Goloubinoff et al., 1989b; Ostermann et al., 1989; Buchner et al., 1991; Martin et al., 1991; Mendoza et al., 1991). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει την GroEL των ευβακτηρίων, τη μιτοχονδριακή Hsp60, τη Rubisco συνδέουσα πρωτεΐνη των χλωροπλαστών, την CCT (γνωστή και ως TriC ή c-cpn) του ευκαρυωτικού κυτοσόλιου και πυρήνα και ορισμένες πρωτεΐνες των αρχαιοβακτηρίων όπως οι TF55/56 και το θερμόσωμα (Kubota, 2000). Πιο αναλυτικά, η οικογένεια αυτή χωρίζεται σε δύο υποοικογένειες με βάση την ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων και δομικές ομοιότητες: την GroE (ομάδα I) και την TCP-1 (ομάδα II) υποοικογένεια (Fink, 1999; Kubota, 2000).

Η GroE υποοικογένεια περιλαμβάνει την πρωτεΐνη GroEL, της οποίας το κωδικονομικό γονίδιο φέρει τις πληροφορίες για μια πιο μικρή πρωτεΐνη, την GroES, γνωστή και ως chaperonin 10 (Hartl et al., 1992). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν τις κύριες θερμικά επαγόμενες πρωτεΐνες στην *E. coli*, ενώ η έκφρασή τους φαίνεται να επάγεται και από αιθανόλη, βαρέα μέταλλα και ανάλογα αμινοξέων. Εμπλέκονται στη *de novo* πρωτεϊνική αναδίπλωση και στην παρεμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών, ωθώντας τις προς την ορθή αναδίπλωση. Με τον τρόπο αυτό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη στρες απόκριση (Kubota, 2000). Υπάρχουν αναφορές ότι οι πρωτεΐνες αυτές απαιτούνται για τη συγκρότηση του καμψιδίου ορισμένων φάγων (Georgopoulos et al., 1973; Sternberg, 1973; Tilly et al., 1981). Στην ίδια υποοικογένεια, στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες αντίστοιχα, συναντώνται οι Hsp60 και η Rubisco προσδένουσα πρωτεΐνη. Η Hsp60 βοηθά στην αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που εισέρχονται από το κυτοσόλιο στη μιτοχονδριακή μεμβράνη ή στον καταβολισμό των πρωτεϊνών αυτών μετά από στρες. Επιπλέον, η δράση της φαίνεται να σχετίζεται με την αντιγονικότητα στα θηλαστικά. Έχει βρεθεί ότι η Hsp60 εμπλέκεται στην ανοσολογική απόκριση σε ασθένειες όπως αρθρίτιδες, ερυθματώδης λύκος και διαβήτη. Το τελευταίο μέλος της υποοικογένειας, η Rubisco προσδένουσα πρωτεΐνη ρυθμίζει την αναδίπλωση της Rubisco στους χλωροπλάστες (Kubota, 2000).

Η TCP-1 υποοικογένεια, περιλαμβάνει το θερμόσωμα και την πρωτεΐνη TF55. Οι άνωθι αναφερόμενες πρωτεΐνες αποτελούν τις κύρια επαγόμενες θερμικά πρωτεΐνες των Αρχαιοβακτηρίων, στον οποίων το κυτταρόπλασμα και εντοπίζονται. Προσδένονται στις θερμικά αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και αποτρέπουν τη μεταξύ τους συμπλεγματοποίηση, χωρίς όμως να έχουν πάντα δραστηριότητα επαναδίπλωσης. Η άλλη πρωτεΐνη της ίδιας υποοικογένειας, που συναντάται όμως στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών κυττάρων, είναι η CCT (TrtC). Ο ρόλος της είναι η αναδίπλωση της νεοσυντιθέμενης ακτίνης και τουμπουλίνης και κάποιων άλλων πρωτεϊνών του κυτοσολίου (Kubota, 2000), ενώ έχει βρεθεί ότι βοηθά στην αναδίπλωση της νεοσυντιθέμενης στα ριβοσώματα λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας *in vitro*, σε συνδυασμό με άλλους μοριακούς συνοδούς, όπως η Hsp40 ή η Hsp70/Hsc70, με την προϋπόθεση ότι η πολυπεπτιδική αλυσίδα που εξέρχεται από το ριβόσωμα να έχει μήκος τουλάχιστον 100 έως 150 αμινοξέων. Ο ρόλος της φαίνεται να είναι η αναδίπλωση της πρωτεΐνης στη φυσική της διαμόρφωση, μετά τη σταθεροποίηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από τα άλλα μέλη της μηχανής αναδίπλωσης (Frydman et al., 1994). Πέραν της TCP-1 υποοικογένειας και της εμπλοκής της στην αναδίπλωση της λουσιφεράσης, υποστηρίζεται ότι και το σύστημα GroEL/GroES βοηθά στην αναδίπλωση της βακτηριακής λουσιφεράσης, αλλά και άλλων πρωτεϊνών που έχουν ως ενδιάμεση μορφή αυτή της «λιωμένης σφαίρας» (molten globule), παρεμποδίζοντας το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ αυτών των ενδιάμεσων μορφών (Flynn et al., 1993).

Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70kDa: Τα μέλη της οικογένειας αυτής αποτελούν τα περισσότερο διατηρημένα μέλη των μοριακών συνοδών. Συναντώνται στο κυτταρόπλασμα των αρχαιοβακτηρίων και ευβακτηρίων, καθώς και στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών οργανισμών (Barral et al., 2004). Εμπλέκονται στη *de novo* αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και στην παρεμπόδιση συμπλεγματοποίησης σε μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών διεργασιών (Hartl and Hayer-Hartl, 2002), όπως η στόχευση πρωτεϊνών, η διαμεμβρανική μεταφορά, η πρωτεϊνική αποδιάταξη και η απόπτωση (Kang et al., 1990; Hartl et al., 1994; Pilon

and Schekman, 1999). Η έκφραση συγκεκριμένων μελών της οικογένειας αυτής επάγεται ισχυρά υπό συνθήκες στρες, όπως π.χ. θερμικό. Έχουν δράση ATPάσης, που σε συνδυασμό με τους ομοσυννοδούς τους, τους επιτρέπει να προσαρμόζονται στις διάφορες λειτουργίες τους (Barral et al., 2004). Γενικά σταθεροποιούν εκτεταμένες πρωτεϊνικές αλυσίδες προς αποφυγή συμπλεγματοποίησής τους (Hartl et al., 1994; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Ρυθμίζουν την απόκριση σε θερμικό σοκ, το οποίο προκαλεί και αύξηση της ενδοκυττάριας ποσότητάς τους (Didomenico et al., 1982; Tilly et al., 1983; Baler et al., 1992; Shi et al., 1998). Αυτό το επιτυγχάνουν καταστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα ενεργοποίησης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ HSF-1, με την απευθείας πρόσδεσή τους στην περιοχή ενεργοποίησής του (μοντέλο αυτορρύθμισης) (Baler et al., 1992; Shi et al., 1998). Το μοντέλο αυτορρύθμισης δεν ισχύει στην περίπτωση μετάλλαξης στα τελευταία 4 αμινοξέα της Hsp70 από EEVD σε AAAA. Στην περίπτωση αυτή, δεν είναι δυνατή η πρόσδεσή της στον HSF-1 και συνεπώς δεν μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφική του δραστηριότητα (Shi et al., 1998).

Αντίστοιχο φαινόμενο αυτορρύθμισης της απόκρισης στο θερμικό στρες φαίνεται να υφίσταται και η πρωτεΐνη Ssa1p του *Saccharomyces cerevisiae*, της οποίας η υπερέκφραση φαίνεται να παρεμποδίζει τη μεταγραφή του *ssa1* γονιδίου, μέσω παρεμπόδισης της ενεργοποίησης του υποκινητή του SSA1. (Stone and Craig, 1990).

Οι μοριακοί συνοδοί της οικογένειας των 70kDa έχουν δύο κύριες λειτουργικές περιοχές: μια N-τελική περιοχή μοριακού βάρους 44 kDa με δράση ATPάσης (Wang et al., 1993; Zhu et al., 1996). Η δράση αυτή διευκολύνεται παρουσία Mg^{2+} και K^{+} (Fink, 1999). Περιέχουν επίσης μια C-τελική περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (Wang et al., 1993; Grageron et al., 1994; Zhu et al., 1996) μεταβλητού μοριακού βάρους 18 - 27 kDa, το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από την πρωτεΐνη στόχο (Wang et al., 1993; Zhu et al., 1996).

Ορισμένα από τα πιο γνωστά μέλη της οικογένειας στα θηλαστικά είναι η συνεχώς εκφραζόμενη Hsc70 (ή Hsp73) που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, η στρες επαγόμενη Hsp70 (ή Hsp72) που εδράζεται επίσης στο κυτταρόπλασμα, η BiP (ή Grp78) του ενδοπλασματικού δικτύου και η mHsp70 (ή mito-Hsp70, ή Grp75) των μιτοχονδρίων. Στους ζυμομύκητες οι ομόλογες πρωτεΐνες των Hsc70 και BiP είναι γνωστές ως Ssa1-4 και Kar2 αντίστοιχα. Στα βακτήρια τέλος, η κύρια μορφή της Hsp70 είναι η DnaK (Fink, 1999). Η δράση των μελών αυτών παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω.

Hsc70: Η Hsc70 αποτελεί το συνεχώς εκφραζόμενο μέλος της οικογένειας των στρες-70 πρωτεϊνών. Το N-τελικό της άκρο αποτελείται από μια περιοχή με δράση ATPάσης, η οποία αποτελείται από δύο λοβούς. Η πρόσδεση των νουκλεοτιδίων πραγματοποιείται στη βάση μιας βαθιάς αύλακας ανάμεσα στους δύο αυτούς λοβούς. Το C-τελικό άκρο της Hsc70 έχει προταθεί ως η περιοχή «εξειδίκευσης», η οποία προκαλεί τη σύζευξη των πρωτεϊνών στόχων με την περιοχή ATPάσης της διατηρημένης N-τελικής περιοχής (Gething and Sambrook, 1992). Η Hsc70 παίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές συνθήκες κατά τη σταθεροποίηση της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Dastoor and Dreyer, 2000) και την εισαγωγή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Zimmermann et al., 1988) και πιθανά στα μιτοχόνδρια (Chirico et al., 1988). Παρουσία ATP, αλληλεπιδρά με τις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να τις σταθεροποιήσει μέχρι να λάβουν την τελική διαμόρφωσή τους (Beckmann et al., 1990). Το ATP βοηθά στη σταθεροποίηση της μονομερούς μορφής

της Hsc70, σε αντίθεση με το ADP το οποίο σταθεροποιεί τη διμερή μορφή της πρωτεΐνης (Gething and Sambrook, 1992).

Πρόσφατα στοιχεία εμπλέκουν την Hsc70 στην απόκριση σε οξειδωτικό στρες, με τις αντι-οξειδωτικές ουσίες να εμποδίζουν την έκφραση του γονιδίου. Η υποξία επάγει την έκφραση της Hsc70 μέσω αυξημένης παραγωγής H_2O_2 (Dastoor and Dreyer, 2000). Επιπλέον, η απόπτωση κατά την εμβρυική εννεύρωση επηρεάζει κυρίως κύτταρα με χαμηλά επίπεδα Hsc70, υποδεικνύοντας ότι η Hsc70 ρυθμίζει την απόπτωση κατά την εμβρυογένεση (de la Rosa et al., 1998).

Μελέτες σχετικά με την κατανομή της Hsc70 απέδειξαν ότι είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματική, ενώ μετά από οξειδωτικό στρες εισέρχεται στον πυρήνα προκειμένου να καταλύσει την επαναδίπλωση των κατεστραμμένων λόγω ROS πυρηνικών πρωτεϊνών μέχρι να λάβουν την κατάλληλη διαμόρφωσή τους (Dastoor and Dreyer, 2000). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρείται και μετά από θερμικό στρες, οπότε η Hsc70 συνδέεται στον πυρήνα με πολυπεπίδια που σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα λόγω θερμικής αποδιάταξης (Gething and Sambrook, 1992). Επιπλέον, η υπερέκφραση της Hsc70 φαίνεται να καθιστά τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες (Dastoor and Dreyer, 2000). Τέλος, παρουσία ATP, προσδένεται στους κλωβούς κλαθρίνης, την ενδιάμεση δομή των επιστρωμένων κυστιδίων κατά το μονοπάτι της εξαρτώμενης από υποδοχείς ενδοκύττωσης, επάγοντας την υδρόλυση ενός μορίου ATP. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων κλαθρίνης, οδηγώντας τελικά στην αποδιάταξη των κλωβών στα συστατικά τους που είναι τα τριμερή κλαθρίνης (Ungewickell, 1985; Pelham, 1986).

Hsp70: Η επαγόμενη Hsp70 αποτελεί το κυριότερο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού πηγματός των 70 kDa. Καθώς θα γίνει εκτεταμένη αναφορά σε αυτήν παρακάτω, δεν θα αναφερθούν περαιτέρω στοιχεία σε αυτή την ενότητα.

BiP: Η BiP αποτελεί το μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 kDa, με μοριακό βάρος 78kDa, που εδράζεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και αποτελεί το 5% των συστατικών του. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά πρόδρομων πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου (Gething and Sambrook, 1992) και την επακόλουθη αναδίπλωση και συγκρότησή τους στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (Bole et al., 1986; Gething et al., 1986; Pelham, 1986; Gething and Sambrook, 1992). Αρχικά ανακαλύφθηκε στα κύτταρα των θηλαστικών, προσδεδεμένη σε πρόδρομα μόρια ανοσοσφαιρινών (Haas and Wabl, 1983) και συγκεκριμένα σε κύτταρα μυελώματος που δεν παράγουν ελαφριές αλυσίδες (Morrison and Scharff, 1975). Η BiP προσδένεται σφιχτά σε ατελώς ή κακώς αναδιπλωμένες, μεταλλαγμένες μορφές εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών, μπλοκάροντας την έξοδό τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο και στοχευοντάς τις πιθανά προς αποικοδόμηση (Pelham, 1986; Dörner et al., 1987; Gething and Sambrook, 1992). Αναγνωρίστηκε ως η κύρια πρωτεΐνη που επάγεται μετά από αποστέρηση γλυκόζης σε κύτταρα στην κυτταροκαλλιέργεια. Για το λόγο αυτό είναι γνωστή και με την ονομασία Grp78 (Shiu et al., 1977). Άλλες ομάδες την εντόπισαν αργότερα μετά από επεξεργασία με παράγοντες που παρεμποδίζουν τη γλυκοσυλίωση, ή προκαλούν συγκέντρωση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Wu et al., 1981; Resendez et al., 1985). Η συγκέντρωση μη ορθώς αναδιπλωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, οδηγεί σε επαγωγή της BiP (Kozutsumi et al., 1988).

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα για τη δράση της BiP που την εμπλέκουν στη σύνδεσή της με πολυμερή ατελώς συγκροτημένων εκκρινόμενων πρωτεϊνών, μέχρι την ολοκλήρωση της διαμόρφωσής τους (Bole et al., 1986), στην αποδιάταξη

συμπλόκων μεταξύ νεοσυντιθέμενων εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Munro and Pelham, 1986) και στην περισυλλογή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Rose et al., 1989). Το κοινό χαρακτηριστικό των παραπάνω μοντέλων είναι ότι η BiP προσδένεται παροδικά στις νεο-εκκριθείσες από το ενδοπλασματικό δίκτυο πρωτεΐνες σταθεροποιώντας την ενδιάμεση πολυπεπτιδική δομή τους, ενώ με την υδρόλυση ATP προωθεί την αναδίπλωση και τη συγκρότησή τους (Gething and Sambrook, 1992). Η απελευθέρωσή των πρωτεϊνών αυτών στόχων πραγματοποιείται μετά από την απόκτηση της ορθής αναδίπλωσης, διαμόρφωσης ή της τελικής κατάστασης γλυκοσυλίωσής τους. Συνεχής πρόσδεση με την πρωτεΐνη υποδηλώνει αποτυχία των παραπάνω (Munro and Pelham, 1987).

Η BiP ανήκει στις συνεχώς εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας των 70 kDa και περιέχει υδρόφοβες αμινοτελικές επαναλήψεις, χαρακτηριστικές μιας ακολουθίας σήματος εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Επιπλέον, από το αμινοτελικό άκρο του μορίου της πρωτεΐνης απουσιάζουν εν δυνάμει θέσεις γλυκοσυλίωσης (Rose et al., 1989). Τέλος, η BiP φέρει στο C-τελικό της άκρο τη χαρακτηριστική ακολουθία KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), που έχει χαρακτηριστεί ως σήμα συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Munro and Pelham, 1987).

Η ρύθμισή της πραγματοποιείται στο επίπεδο της μεταγραφής, με επαγωγή του μετάγραφου του γονιδίου της BiP/Grp78 από διάφορα περιβαλλοντικά στρες όπως αποστέρηση γλυκόζης, επώαση με παράγοντες που αναστέλουν τη γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών, διατάραξη του ενδοκυτταρικού ισοζυγίου ιόντων Ca^{2+} και προσθήκη αναγωγικών παραγόντων (β-μερκαπτοαιθανόλη), που οδηγούν στη συγκέντρωση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Kozutsumi et al., 1988), ενώ σε αντίθεση με τις άλλες στρες-70 πρωτεΐνες, δεν επάγεται μετά από θερμικό στρες, λόγω έλλειψης του στοιχείου ελέγχου θερμικού σοκ HSE από τον υποκινητή του γονιδίου (Rose et al., 1989).

Grp75: Η Grp75 αποτελεί το μέλος της οικογένειας θερμικού σοκ των 70 kDa που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια (Mizzen et al., 1991). Έχει μοριακό βάρος 75 kDa και ανήκει στις συνεχώς εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας (Mizzen et al., 1989). Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται μετα-μεταφραστικά στο μιτοχόνδριο (Mizzen et al., 1991). Η σύνθεσή της αυξάνεται στα κύτταρα μετά από αποστέρηση γλυκόζης ή μετά από έκθεση σε μεταφορείς ιόντων ασβεστίου (A23187) ή 2-δεοξυγλυκόζη, καθώς και κατά την επαναφορά μετά από έκθεση σε ανάλογα αμινοξέων. Για το λόγο αυτό κατατάσσεται στις λεγόμενες γλυκοζο-ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες (Mizzen et al., 1989). Έχει βρεθεί ότι συνδέεται παροδικά με νεοσυντιθέμενες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κατά τρόπο ευαίσθητο στο ATP. Συνδέεται επίσης και με μια άλλη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη της οικογένειας GroE, την Hsp58, σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο. Η προσθήκη ATP φαίνεται όπως και πριν να καταστρέφει αυτό το σύμπλοκο και να οδηγεί στην αυτο-φωσφορυλίωση της Grp75, η οποία εξαρτάται από την παρουσία ασβεστίου, ενώ πραγματοποιείται σε χαμηλό pH (~6.0), δηλαδή τις συνθήκες που επικρατούν εντός του μιτοχονδρίου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, σε συνδυασμό και με τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, αποτελούν έναν πιθανό μηχανισμό που εξηγεί πως οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες μεταφέρονται και συγκροτούνται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, η Grp75 σταθεροποιεί τα μεταφερόμενα και μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια παρεμποδίζοντας την πρόωρη αναδίπλωση μέχρι να ολοκληρωθεί η μεταφορά εντός του μιτοχονδρίου. Εκεί ξεκινά η αναδίπλωση με την ATP-εξαρτώμενη όπως αναφέρθηκε αποκόλληση της Grp75 από το πολυπεπτίδιο και τη συμβολή της Hsp58, η οποία επικουρεί το σχηματισμό ολιγομερών μορφών, ή την υψηλότερου βαθμού συγκρότηση (Mizzen et al., 1991).

Ssa1-4p: Οι πρωτεΐνες Ssa1p (προϊόν του πρώην γονιδίου YG100 (Slater and Craig, 1989)), Ssa2p (προϊόν του πρώην γονιδίου YG102 (Slater and Craig, 1989)), Ssa3p και Ssa4p που εδράζονται στο κυτταρόπλασμα αποτελούν την SSA υποοικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* με ομολογία προς την Hsp70 των ευκαρυωτικών και δράση μοριακού συνοδού. Παρά τη γενική κατανομή τους στο κυτταρόπλασμα, οι Ssa1p και Ssa2p συναντώνται και στο κυτταρικό τοίχωμα (López-Ribot and LaJean Chaffin, 1996). Η Ssa1p φέρει ομολογία ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων κατά 99%, 84% και 85,6% με τις Ssa2p, Ssa3p και Ssa4p αντίστοιχα (Boorstein et al., 1994). Οι Ssa3p και Ssa4p αποτελούν τις θερμικά επαγόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας και δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση, τη θερμοανοχή και την εκβλάστηση των ζυμομυκήτων (Werner-Washburne et al., 1987). Η Ssa1p εκφράζεται συνεχώς, αλλά επάγεται και μετά από θερμικό σοκ (Ellwood and Craig, 1984; Craig and Jacobsen, 1984; Werner-Washburne et al., 1987), ενώ η Ssa2p δε φαίνεται να επάγεται θερμικά (Craig and Jacobsen, 1984; Werner-Washburne et al., 1987).

Η αυξημένη έκφραση μετά από θερμικό σοκ ελέγχεται από το μεταγραφικό ενεργοποιητή Hsf1p που αναγνωρίζει και προσδένει δυο στοιχεία θερμικού σοκ (HSEs), ένα στην καρβοξυ-τελική περιοχή του (CTA) και ένα στην αμινο-τελική περιοχή του (NTA), στον υποκινητή SSA1. Η ικανότητα αυτή πρόσδεσης DNA και στις δύο περιοχές του Hsf1, οδηγεί σε δύο διαφορετικές αποκρίσεις στο θερμικό σοκ. Μια μεταβατική, κατά την οποία η σύνθεση του mRNA των Ssas αυξάνεται, κορυφώνεται και ακολούθως μειώνεται και μια παρατεταμένη, κατά την οποία ορισμένα μόρια mRNA παραμένουν σταθερά σε αυξημένες ποσότητες (Halladay and Craig, 1995; Trott and Morano, 2003).

Οι Ssa πρωτεΐνες:

- α) εμπλέκονται στην αποδιάταξη ή την παρεμπόδιση σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ των μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Bukau and Horwich, 1998),
- β) επικουρούν τη μετέπειτα ορθή αναδίπλωσή τους σε συνεργασία με τις Ydj1 και Hsp104 (Glover and Lindquist, 1998),
- γ) μετέχουν στη μεταφορά πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Deshaies et al., 1988; Becker and Craig, 1994),
- δ) εμπλέκονται στον καταβολισμό των κατεστραμμένων πρωτεϊνών (McClellan et al., 2005; Park et al., 2007) και
- ε) εμπλέκονται στην αυτορρύθμιση της έκφρασής τους (Stone and Craig, 1990), αλλά και στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων πρωτεϊνών θερμικού σοκ, όπως του *KAR2* το οποίο κωδικοποιεί για την BiP στους ζυμομύκητες (Oka et al., 1997).
- στ) Επιπλέον, οι Ssa1p και Ssa2p εμπλέκονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, καθώς αναγνωρίστηκαν ως μέλη των συμπλόκων ελέγχου του DNA *Rad9* (Gilbert et al., 2003; van den Bosch and Lowndes, 2004).

Kar2: Η πρωτεΐνη Kar2 (Kar2p), προϊόν του γονιδίου καρνογαμίας *KAR2*, είναι υπεύθυνη για την πυρηνική σύντηξη κατά το σχηματισμό διπλοειδών πυρήνων κατά την σύζευξη του ζυμομύκητα του γένους *S. cerevisiae* (Polaina and Conde, 1982) και αποτελεί το ομόλογο μέλος της πρωτεΐνης BiP των θηλαστικών. Εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο και μαζί με τη BiP, αποτελεί το μοναδικό μέλος από τις συνεχώς εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας που φέρει μια λειτουργική ακολουθία εκκριτικής σηματοδότησης, η οποία οφείλεται στην παρουσία υδρόφοβων αμινοτελικών επαναλήψεων. Το καρβοξυτελικό άκρο της φέρει στο τέλος του την ακολουθία HDEL (Rose et al., 1989), που έχει βρεθεί ότι αποτελεί σήμα συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι τμήμα ενός συστήματος που αποτρέπει την έκκριση των πρωτεϊνών (Pelham, 1988). Από το αμινοτελικό άκρο του

μορίου απουσιάζουν πλήρως οι πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης (Rose et al., 1989), μια συχνά απαντώμενη τροποποίηση των πρωτεϊνών που επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία τους. Η τροποποίηση αυτή πραγματοποιείται στην ακολουθία Ser/Thr-Xaa-Asn, όπου Xaa μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από προλίνη (Benz and Schmidt, 2002).

Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυξάνεται μετά από επώαση των κυττάρων με φάρμακα τα οποία παρεμποδίζουν τη γλυκοσυλίωση, όπως η τουνικαμυκίνη (tunicamycin), η 2-δεοξυγλυκόζη και το ιονοφόρο A23187 που προκαλούν συγκέντρωση πρώιμων μορίων που εκκρίνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Rose et al., 1989). Επιπλέον, επάγεται σε μεταγραφικό επίπεδο από τη συνάθροιση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω ενός στοιχείου απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPRE). Επίσης επάγεται σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό μετά από θερμικό σοκ μέσω των στοιχείων απόκρισης σε θερμικό σοκ (HSE) (Oka et al., 1997).

Όπως συμβαίνει και με τα άλλα μέλη της οικογένειας θερμικού σοκ των 70kDa, τα 100 αμινοξέα της καρβοξυτελικής περιοχής αποτελούν την πιο ποικιλόμορφη περιοχή της πρωτεΐνης. Ανοδικά της κωδικεύουσας αλληλουχίας βρίσκονται δύο επαναλήψεις του ευκαρυωτικού στοιχείου συναίνεσης θερμικού σοκ που ανακαλύφθηκε από τον Pelham το 1982 (Rose et al., 1989). Η αλληλουχία αυτή είναι η CnnGAAnnTTCnnG και έχει παρόμοια λειτουργία και στους ζυμομύκητες (Slater and Craig, 1987).

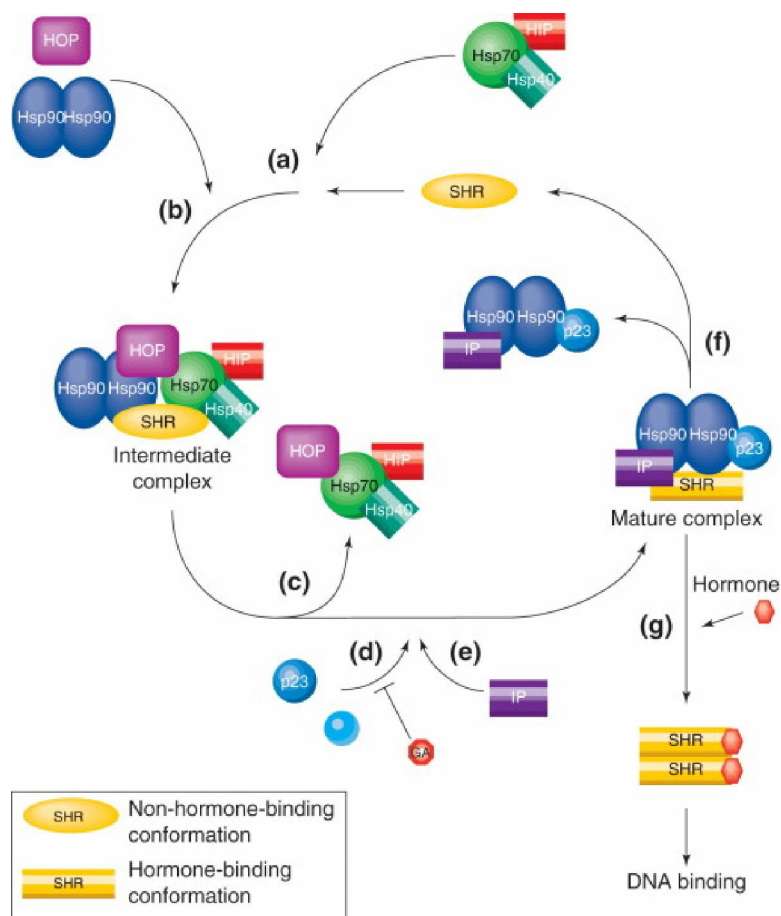
Η παρουσία της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την ανάπτυξη των απλοειδών, όσο και των διπλοειδών κυττάρων των ζυμομυκήτων. Υπάρχουν δύο μοντέλα σχετικά με τη δράση της Kar2p κατά την καρυογαμία. Κατά το πρώτο μοντέλο, η πρωτεΐνη δρα έμμεσα, με την παρουσία της να είναι απαραίτητη για την εντόπιση και τη συνάθροιση μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών, που είναι συστατικά στοιχεία της μηχανής πυρηνικής σύντηξης, στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Στο δεύτερο μοντέλο, η πρωτεΐνη εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία σύντηξης, καταλύοντας πιθανά το σχηματισμό ή την αποδιάταξη πρωτεϊνικών συμπλόκων κατά τη σύντηξη των πυρηνικών μεμβρανών (Rose et al., 1989).

DnaK: Η DnaK (συνώνυμη και με το παράγωγο του γονιδίου *groPC756* (Georgopoulos et al., 1979)) αρχικά αναγνωρίστηκε ως μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του βακτηριοφάγου λ (Georgopoulos, 1977; Sunshine et al., 1977; Georgopoulos et al., 1979). Στην ATP-προσδένουσα κατάσταση της, η DnaK προσδένει και απελευθερώνει υποστρώματα με μεγάλη ταχύτητα (Schmid et al., 1994). Η υδρόλυση του ATP σε ADP έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του συμπλόκου μοριακού συνοδού – υποστρώματος (Palleros et al., 1991; Bukau and Horwich, 1998). Ο κύκλος μεταξύ ATP και ADP-προσδένουσας κατάστασης της DnaK ρυθμίζεται από τους ομοσυνοδούς της DnaJ και GrpE (Liberek et al., 1991; Langer et al., 1992; Szabo et al., 1994). Η DnaJ ενεργοποιεί τη δράση ATPάσης της DnaK, επιτρέποντας έτσι την πρόσδεση και συγκράτηση του πεπτιδίου (Langer et al., 1992). Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GrpE επάγει την αποκόλληση του ADP από τη DnaK, οδηγώντας στην απελευθέρωση του υποστρώματος και την ολοκλήρωση του κύκλου αντίδρασης της DnaK.

Συνεργαζόμενη με τους συμπαράγοντές της DnaJ και GrpE, η DnaK σταθεροποιεί τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια και διατηρεί την ικανότητα αναδίπλωσης (Szabo et al., 1994). Επίσης, επανενεργοποιεί τις θερμικά αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες (Manukhov et al., 1999), ελέγχει την απόκριση σε συνθήκες θερμικού σοκ με την πρόσδεσή της στο μεταγραφικό παράγοντα σ^{32}

(Gamer et al., 1992; Liberek et al., 1992). Εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιβίωση των βακτηρίων υπό διάφορες συνθήκες στρες, η εκκίνηση της εξαρτώμενης από το *oriC* του *E. coli* αντιγραφής του DNA του βακτηριοφάγου λ, η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, η ρύθμιση της πρωτεόλυσης, η φωσφορυλίωση και η διαμεμβρανική μεταφορά των πρωτεϊνών (Liberek et al., 1991).

Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 90kDa: Τα μέλη της οικογένειας αυτής βρίσκονται στα ευβακτήρια, στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών οργανισμών, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια (Saibil, 2008). Δρουν καθοδικά του συστήματος Hsp70/Hsp40 και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών κατά τα τελικά στάδια της αναδίπλωσης και τη σηματοδότηση των κυττάρων (Barral et al., 2004; Saibil, 2008). Υπο φυσιολογικές συνθήκες, η Hsp90 φαίνεται να αλληλεπιδρά με μια σειρά υποστρωμάτων σχετικών με ιατρικές καταστάσεις. Μεταξύ αυτών η αντίστροφη μεταγραφάση του ιού της ηπατίτιδας Β (Hu et al., 1997), οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, οι κινάσες πρωτοογκογονιδίων (Raf, Src) και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Cdk4) (Aligue et al., 1994; Picard, 2002). Πρόσφατες μελέτες γενετικής ανάλυσης αποκάλυψαν την εμπλοκή της Hsp90 σε εκκριτικά μονοπάτια, την κυτταρική μεταφορά, τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική διαίρεση (McClellan et al., 2007).



Εικόνα 1.4: Ο κύκλος δράσης της Hsp90 ως μοριακού συνοδού με τους συμπαράγοντές της (Buchner, 1999).

της πρωτεΐνης στη φυσική διαμόρφωση (Obermann et al., 1998). Υπό συνθήκες στρες, όπως θερμικό, η Hsp90 μειώνει την εκλεκτικότητά της ως προς τα υποστρώματα και

Η Hsp90 σχηματίζει ένα ομοδιμερές. Κάθε υπομονάδα του αποτελείται από τρεις τομείς: μια N-τελική περιοχή με δράση ATPάσης, μια φορτισμένη περιοχή πρόσδεσης και μια C-τελική περιοχή διμερισμού (Young et al., 2001).

Η πρόσδεση των υποστρωμάτων στην Hsp90 εξαρτάται από την Hsp70 (Hutchison et al., 1994) και ρυθμίζεται από τη Hsp90, της οποίας η TPR2 περιοχή αλληλεπιδρά απευθείας με την Hsp90 με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Scheufler et al., 2000). Η Hsp90 πραγματοποιεί ρυθμιζόμενους κύκλους πρόσ-

δεσης και απελευθέρωσης ATP, μέχρι την τελική απελευθέρωση

υιοθετεί το ρόλο ενός αποθηκευτικού χώρου για τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, τις οποίες διατηρεί σε μια κατάσταση στην οποία δύνανται να αναδιπλωθούν. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ανα-διπλωθούν ακολούθως από άλλους μοριακούς συνοδούς, όπως η Hdj-1, ή η Hsp70 (Freeman and Morimoto, 1996).

Η Hsp90 αποτελεί τμήμα μιας εξαιρετικά εξελιγμένης μηχανής αποτελούμενης από πολλούς μοριακούς συνοδούς. Η δράση της βασίζεται σε αρκετούς συμπαράγοντες, που εξαρτώνται από το προσδεμένο υπόστρωμα (Εικόνα 1.4) (Barral et al., 2004).

Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 100kDa: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής ανήκουν στις θερμικά επαγόμενες πρωτεΐνες και έχουν ως λειτουργία την προστασία των οργανισμών από έντονα στρες (Glover et al., 1998). Αποτελούν μέλη της μεγάλης AAA+ υπεροικογένειας, που περιέχει πρωτεΐνες με δράση ATPάσης και σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Saibil, 2008), μεταξύ των οποίων και η πρωτεόλυση. Αποτελούν μια οικογένεια ιδιαίτερα διατηρημένων πρωτεϊνών που συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς (βακτήρια, ζυμομύκητες, φυτά και θηλαστικά), ενώ η δομή τους περιλαμβάνει περιοχές πρόσδεσης ATP και πεπτιδίων. Η δομή τους απαρτίζεται από εξαμερή δακτυλιοειδή σύμπλοκα (Fink, 1999), τα οποία συνδέονται με αμινοξέα τα οποία σηματοδοτούν τη μεταφορά του ξεδιπλωμένου πολυπεπτιδίου σε ένα πρωτεολυτικό θάλαμο, ή την αναδίπλωσή του από άλλους μοριακούς συνοδούς (Saibil, 2008). Φέρουν επίσης μία ή δύο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων που φέρουν τις αλληλουχίες πρόσδεσης νουκλεοτιδίων τύπου Walker A και B (Saibil, 2000) και χωρίζονται στους τύπους A, B και C. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν σε συνδυασμό με ομόλογες πρωτεΐνες της Hsp70 και της DnaJ προκειμένου να αυξήσουν την ποσότητα των επαναδιαταγμένων πρωτεϊνών (Glover et al., 1998).

Τα μέλη της οικογένειας αυτής θεωρούνται ως οι ισχυρότεροι μοριακοί συνοδοί, έχοντας την ικανότητα να ξεδιπλώνουν ακόμα και σταθερά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και να αποδιατάσσουν μεγάλα συσσωματώματα (Saibil, 2008). Η Hsp104 έχει βρεθεί ότι διαλυτοποιεί *in vivo* τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών που έχουν προκύψει μετά από θερμικό σοκ (Parsell et al., 1994) αυξάνοντας έτσι τη θερμοανθεκτικότητα (Saibil, 2008). Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται επειδή συνήθως οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής σχετίζονται με ένα δακτύλιο πρωτεάσης, όπως το ανάλογο προς το πρωτεόσωμα σύμπλοκο ClpA – ClpP, με τη ClpP να έχει δράση πρωτεάσης (Saibil, 2000).

Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας πραγματοποιείται με επαγωγή μετά από θερμικό σοκ, εξαιτίας της παρουσίας ενός στοιχείου θερμικού σοκ (HSE) στον υποκινητή του γονιδίου τους (Glover et al., 1998). Η έκφρασή τους φαίνεται επίσης να ρυθμίζεται από την παρουσία τριών στοιχείων απόκρισης σε στρες (STREs), τα οποία είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων ως απόκριση σε αρκετούς τύπους στρες όπως θερμικό, οσμωτικό, οξειδωτικό, αιθανόλη και έκθεση σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA (Ruis and Schüller, 1995; Mager and de Kruijff, 1995). Η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών επάγεται επίσης και μετά από την επώαση με βαρέα μέταλλα όπως αρσενικό, κάδμιο και χαλκό, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Glover et al., 1998).

Καλνεξίνη, καλρετικολίνη (Calnexin, calreticulin): Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στις λεκτίνες και αποτελούν τους κύριους παράγοντες ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Barral et al., 2004), αποτρέποντας την έξοδο από αυτό των ατελώς αναδιπλωμένων γλυκοπρωτεϊνών. Η καλνεξίνη είναι ένας διαμεμβρανικός μοριακός συνοδός που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η

καλρετικουλίνη, μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 46 kDa που προσδένει ATP, είναι ομόλογη της καλνεξίνης και ανήκει στις διαλυτές πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Fink, 1999). Δρουν σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα, όπως γλυκοσιδάση II, UDP-γλυκόζη και γλυκοζυλο-τρανσφεράση των γλυκοπρωτεϊνών, που προσθέτουν ή αφαιρούν κατάλοιπα γλυκόζης σε υψηλής περιεκτικότητας σε μανόζη αμινο-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες και λειτουργούν ως αισθητήρες που ελέγχουν και προωθούν την ορθή αναδίπλωση ενός μεγάλου εύρους γλυκοπρωτεϊνών (Ellgaard et al., 1999), αναγνωρίζοντας τις μονογλυκοζυλιωμένες ενδιάμεσες μορφές τους (Peterson et al., 1995), ή με την απευθείας πρόσδεση με αυτές (Ware et al., 1995). Μετά την απομάκρυνση της επιπλέον γλυκόζης, η γλυκοπρωτεΐνη απελευθερώνεται. Εάν έχει αναδιπλωθεί ατελώς, επαναγλυκοζυλιώνεται και επανασυνδέεται στην καλνεξίνη. Στην περίπτωση που ολοκληρωθεί η αναδίπλωση, δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο (Fink, 1999). Επιπλέον εμπλέκονται στην αναδίπλωση και συγκρότηση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου κατά ασβέστιο-εξαρτώμενο τρόπο (Bergeron et al., 1994; Krause and Michalak, 1997). Η πρόσδεση με τις πρωτεΐνες αυτές γίνεται κατά μεταβατικό τρόπο, με κάποιο ποσοστό αλληλεπικάλυψης των πρωτεϊνών που συνδέονται με την καλνεξίνη ή την καλρετικουλίνη (Fink, 1999). Οι αλληλεπιδράσεις των δύο αυτών μοριακών συνοδών με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από δισθενή κατιόντα ή πολυαμίνες (Wiuff and Houen, 1996).

Η δράση της καλνεξίνης ως μοριακού συνοδού έγκειται στην ικανότητά της να διευκολύνει την αναδίπλωση και τη συγκρότηση των βαριών αλυσίδων των μορίων ιστοσυμβατότητας κλάσης I και στην αποτροπή σχηματισμού συμπλόκων (Vassilakos et al., 1996). Η καλρετικουλίνη από την άλλη πλευρά, πλειορρυθμίζεται ειδικά ως απόκριση σε στρες μετά από μακροχρόνια αποστέρηση αμινοξέων (Plakidou-Dymock and McGivan, 1994) ή επώαση με ιονοφόρα ασβεστίου (Macer and Koch, 1988).

Εξειδικευμένοι μοριακοί συνοδοί: Στο εσωτερικό των κυττάρων υπάρχουν μεγάλες και περίπλοκες πρωτεϊνικές μηχανές, για τη συγκρότηση των οποίων απαιτούνται ειδικοί μοριακοί συνοδοί. Ορισμένοι μοριακοί συνοδοί δύνανται να είναι εξαιρετικά ειδικοί σε σχέση με τις αλληλεπιδράσεις τους. Έτσι, υπάρχουν περιπτώσεις μοριακών συνοδών που αλληλεπιδρούν μόνο με μια ή με περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών στόχων (Fink, 1999).

PapD: Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η PapD, η οποία εμπλέκεται στη συγκρότηση των συζευκτικών τριχιδίων στα βακτήρια (Kuehn et al., 1993)

Hsp47: Το ίδιο και η Hsp47, που εμπλέκεται στην αναδίπλωση και την επεξεργασία του προκολλαγόνου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Fink, 1999).

RAP (receptor-associated protein): Άλλο παράδειγμα εξειδικευμένου μοριακού συνοδού αποτελεί η σχετιζόμενη με υποδοχείς πρωτεΐνη RAP με μοριακό βάρος 39 kDa, της οποίας ο κύριος ρόλος είναι η διευκόλυνση της ορθής αναδίπλωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης LRP που σχετίζεται με υποδοχείς (low-density lipoprotein receptor related protein) και η αποτροπή της πρόωμης αλληλεπίδρασης προσδεμάτων με την LRP κατά την αρχή του εκκριτικού μονοπατιού (Obermoeller et al., 1997).

1.1.2 Ομοσυνοδές πρωτεΐνες της οικογένειας των Hsp70s

Επιπρόσθετα με τις από καιρό γνωστές DnaJ και GrpE που δρουν ως ομοσυνοδοί της DnaK (ομολόγου της Hsp70 των ευκαρυωτικών) στα βακτήρια, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που στα θηλαστικά κύτταρα δρουν ως ομοσυνοδοί της

Hsp70, όπως η Hip, η BAG-1, η DnaJ1 και η αυξιλίνη (auxilin). Η παρουσία αυτών των συμπαράγοντων φανερώνει την πολυπλοκότητα των μηχανισμών με τους οποίους δρουν οι Hsp70 μοριακοί συνοδοί στα κύτταρα (Fink, 1999). Παρακάτω, θα αναφερθούμε συνοπτικά στις ομοσυνοδές αυτές πρωτεΐνες.

Bag-1: Η Bag-1 είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου μέσω συνεργασίας με τη Bcl2. Θεωρείται ρυθμιστικό μέλος αποπτωτικών, μεταγραφικών και αυξητικών διεργασιών. Επιπλέον, εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση και διαφοροποίηση. Φέρει τρεις ισομορφές, με εντόπιση τόσο πυρηνική, όσο και κυτταροπλασματική (Aveic et al., 2011).

Hip: Η Hip είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με διατηρημένη αλληλουχία. Εκφράζεται κύρια στην καρδιά, τους σκελετικούς μύες και τον εγκέφαλο. Φέρει τρεις λειτουργικές περιοχές:

- α) TPR περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο,
- β) U-box περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο και
- γ) μια ενδιάμεση φορτισμένη περιοχή.

Η Hip αλληλεπιδρά με τις Hsp70, Hsc70 και Hsp90 μέσω της TPR περιοχής. Η αλληλεπίδραση με τους μοριακούς αυτούς συνοδούς έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτυνλίωση και αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στόχου από το πρωτεόσωμα (McDonough and Patterson, 2003).

DnaJ1: Η DnaJ1 αποτελεί τη βακτηριακή ομόλογο πρωτεΐνη της Hsp40 στα βακτηριακά κύτταρα. Εδράζεται στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκεται στη μετάφραση, αναδίπλωση, αποδίπλωση, μεταφορά και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Η εμπλοκή της στις διεργασίες αυτές έγκειται στην ενεργοποίηση της περιοχής ATPάσης των Hsp70s. Η πρόσδεσή της στις τελευταίες επιτυγχάνεται μέσω της J-περιοχής που φέρει στο μόριό της (Qiu et al., 2006).

Αυξιλίνη (auxilin): Η αυξιλίνη αποτελεί ένα συμπαράγοντα μοριακού βάρους 100 kDa που εμπλέκεται στη ρυθμιζόμενη από την Hsc70 απομάκρυνση της κλαθρίνης από επιστρωμένα κυστίδια. Η παρουσία μιας J-περιοχής στο -COOH άκρο της υποδηλώνει ότι αποτελεί μέλος της οικογένειας των DnaJ πρωτεϊνών (Ungewickell et al., 1995).

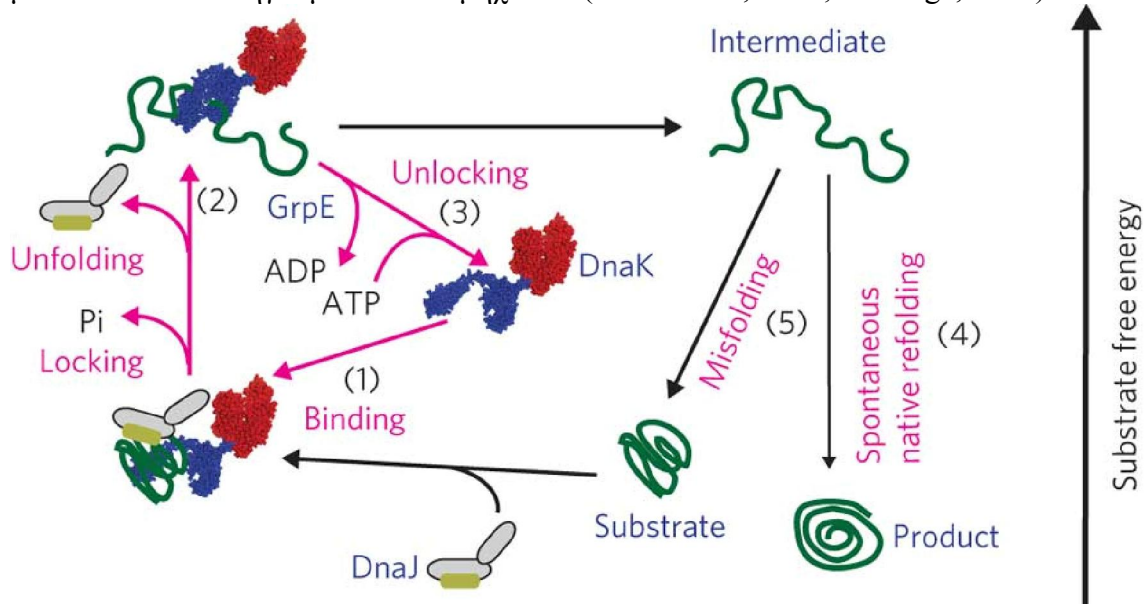
p16: Άλλο μέλος της οικογένειας των ομοσυνοδών των Hsp70s αποτελεί η p16, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που συγκατακρυσταλλίζεται με την Hsc70 σε ήπαρ ψαριού. Η p16 έχει αναγνωριστεί ως μέλος της οικογένειας των Nm23 νουκλεοτιδικών διφωσφορικών κινασών και ενδέχεται να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της Hsc70, διατηρώντας τη σε μονομερή μορφή (Leung and Hightower, 1997).

1.1.3. Λειτουργίες των μοριακών συνοδών

Η γενικότητα των λειτουργιών των μελών της οικογένειας των μοριακών συνοδών έγινε γνωστή από τη μελέτη τη απόκρισης σε θερμικό σοκ, η οποία ξεκίνησε το 1962 με την παρατήρηση του Ferruccio Ritossa ότι ενεργοποιείται η έκφραση μιας μικρής ομάδας γονιδίων της *Drosophila* μετά από σύντομη αύξηση της θερμοκρασίας και παραγωγή RNA που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένους, αλλά τους ίδιους κάθε φορά γονιδιακούς τόπους (Ritossa, 1962; Ritossa, 1996). Η σύνθεση κάποιων από τα μέλη της οικογένειας αυτής, που είναι παρόντα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μπορούσε επίσης να αυξηθεί μετά από αποστέρηση γλυκόζης. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκε ότι όχι μόνο δεν απουσίαζαν από τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά εκφράζονταν σε αφθονία (Hartl, 1996). Μελλοντικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράζονταν στον καρκίνο, συσχετιζόνταν με ογκογονικές πρωτεϊνικές κινάσες

και υποδοχείς στεροειδών ορμονών και παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση σε συγκεκριμένα στάδια διαφοροποίησης και ανάπτυξης (Morange, 2005).

Η περιγραφή της λειτουργίας των μοριακών συνοδών σε διάφορα στάδια και η δομική ανάλυση διαφόρων οικογενειών αυτών σε μοριακό επίπεδο, έδειξε πως εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (Ellis, 1987; Gething and Sambrook, 1992; Hartl, 1996; Xu and Sigler, 1998) και τον καταβολισμό μέσω των ATP-οδηγούμενων νανομηχανών (Barral et al., 2004; Morange, 2005).



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση του ATP τροφοδοτούμενου κύκλου αντίδρασης της DnaK με τους συμπαραγόντες της DnaJ και GrpE (Sharma et al., 2010).

Ο ATP-εξαρτώμενος κύκλος της αναδίπλωσης και απελευθέρωσης πεπτιδίων, είναι καλύτερα κατανοητός στη βακτηριακή DnaK και στους συμπαραγόντες της DnaJ και GrpE (Εικόνα 1.5). Όταν ATP βρίσκεται προσκολλημένο στη DnaK πραγματοποιείται ραγδαία προσκόλληση και απελευθέρωση πεπτιδίων. Αντίθετα, κατά την προσκόλληση ADP, η προσκόλληση και απελευθέρωση πεπτιδίων είναι αργή (Palleros et al., 1991; Schmid et al., 1994). Η σύνδεση των πεπτιδίων σε συνδυασμό με τις DnaJ και GrpE επιταχύνουν τη διαδικασία εναλλαγής των δύο μορφών της DnaK (ATP/ADP προσδένουσα) (Liberek et al., 1991; Szabo et al., 1994). Ο κύκλος υδρόλυσης ATP ακολουθεί τα εξής στάδια: (1) Η DnaJ αλληλεπιδρά με ένα μη αναδιπλωμένο πεπτίδιο και το στοχεύει στη DnaK. (2) Η DnaK προσδένει το πολυπεπίδιο στην ATP- προσδένουσα κατάσταση. Η αλληλεπίδραση με τη DnaJ προκαλεί την υδρόλυση του ATP από τη DnaK και σταθεροποιεί την ADP-προσδένουσα κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σταθερού τριμερούς συμπλόκου πεπτιδίου-DnaJ-DnaK. (3) Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GrpE προωθεί την απελευθέρωση του ADP από τη DnaK, γεγονός που αποσταθεροποιεί το τριμερές σύμπλοκο και προκαλεί την απελευθέρωση της DnaJ. (4) Το υπόστρωμα αποκολλάται από τη DnaK μετά από εκ νέου πρόσδεση ATP (Schmid et al., 1994). Μετέπειτα μπορεί να αναδιπλωθεί, να επαναπροσκολληθεί στη DnaJ, ή να μεταφερθεί σε άλλο σύστημα μοριακών συνοδών, όπως αυτό της GroEL που περιγράφεται παρακάτω, για τελική αναδίπλωση (Langer et al., 1992; Szabo et al., 1994).

Η διαδικασία της αναδίπλωσης στους μοριακούς συνοδούς GroEL/GroES των βακτηρίων πραγματοποιείται μέσω παρεμπόδισης της λανθασμένης αναδίπλωσης και της συμπλεγματοποίησης. Συνολικά αυξάνουν την απόδοση του κυττάρου σε ορθά

αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Hartl, 1996) παρά το ρυθμό αναδίπλωσης, ο οποίος παραμένει σταθερός ή και μειώνεται (Thirumalai and Lorimer, 2001), παρακάμπτοντας παράπλευρες αντιδράσεις που αναστέλλουν την αναδίπλωση (Itzhaki et al., 1995). Υπάρχουν δύο διαδοχικές διαδικασίες οι οποίες προωθούν την αναδίπλωση. Η πρώτη αφορά την πρόσδεση των κατεστραμμένων, ή των μη αναδιπλωμένων ενδιάμεσων πεπτιδίων στο κέντρο του δακτυλίου μέσω υδροφοβικών (Braig et al., 1994; Fenton et al., 1994; Itzhaki et al., 1995; Lin et al., 1995; Fenton and Horwich, 1997) ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Katsumata et al., 1996; Perrett et al., 1997; Pack et al., 2000). Η πρόσδεση αυτή σταθεροποιεί τη μη φυσική διαμόρφωση και έτσι η ενέργεια πρόσδεσης μπορεί να ξεδιπλώσει κινητικά παγιδευμένα μη-ορθώς αναδιπλωμένα ενδιάμεσα μόρια (Weissman et al., 1994; Ranson et al., 1995; Walter et al., 1996; Zahn et al., 1996). Η δεύτερη διαδικασία επιτρέπει την αναδίπλωση απελευθερώνοντας το προσδεδεμένο πολυπεπτίδιο σε μια εκτεταμένη κλειστή κοιλότητα, όπου μπορεί να αναδιπλωθεί απομονωμένο, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη συμπλεγματοποίηση ή την πρωτεόλυση (Weissman et al., 1995; Mayhew et al., 1996; Weissman et al., 1996). Το τελευταίο αυτό στάδιο απαιτεί την πρόσδεση και υδρόλυση ATP (Fenton and Horwich, 1997; Xu and Sigler, 1998), καθώς και την πρόσδεση του ομοσυνοδού GroES, ως καπάκι του κεντρικού αγωγού (Tilly et al., 1981; Chandrasekhar et al., 1986; Mayhew, 1996; Fenton and Horwich, 1997). Εάν η αναδίπλωση προς τη φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης δεν πραγματοποιηθεί με την πρώτη φορά, η GroEL συμμετέχει ενεργά σε περεταιίρω προσπάθειες αναδίπλωσης, ξεδιπλώνοντας ενεργά και κατ' εξακολούθηση το πρωτεϊνικό υπόστρωμα (Thirumalai and Lorimer, 2001).

Τη δράση των μοριακών συνοδών στους μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών, φαίνεται να αξιοποιούν και οι ιοί, εξελίσσοντας μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τους μοριακούς συνοδούς των ξενιστών τους προκειμένου να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους (Xiao et al., 2010). Αρκετές έρευνες υποδεικνύουν ότι η έκφραση των μοριακών συνοδών επάγεται κατά τη διάρκεια ιικών μολύνσεων, είτε προς διευκόλυνση της ιικής παθογένειας (Lewthwaite et al., 1998; Sullivan and Pipas, 2001; Neckers and Tatu, 2008), ή ως απόκριση προς τη μόλυνση, προκειμένου να αποσοβηθεί το στρες από τη μόλυνση αυτή. Επιπλέον, οι ιοί μπορούν να ρυθμίζουν τους μοριακούς συνοδούς των ξενιστών τους σε διάφορα επίπεδα, όπως μεταγραφή, μετάφραση, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και κυτταρικό εντοπισμό.

Η αυξημένη παρουσία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ έχει προταθεί ως μάρτυρας ορισμένων ιικών μολύνσεων (Xiao et al., 2010), ενώ η παρουσία της Grp94 έχει συσχετιστεί με την μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV), λειτουργώντας πιθανά ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας (Zhu et al., 2004). Η συγκέντρωση στοιχείων επέδειξε ότι οι μοριακοί συνοδοί έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών κατά τις ικές μολύνσεις. Συγκεκριμένα, όλες οι οικογένειες των μοριακών συνοδών φαίνεται να εμπλέκονται στις ικές μολύνσεις, η καθεμιά παίζοντας διαφορετικό ρόλο σε λειτουργίες όπως η εισαγωγή του ιού στον ξενιστή, η εισαγωγή του ιικού DNA στον πυρήνα του ξενιστή, ο ιικός πολλαπλασιασμός, η αναδίπλωση των ιικών πρωτεϊνών, η συγκρότηση του ιικού καψιδίου, η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή και τέλος η χρήση των αποπτωτικών μονοπατιών του ξενιστή (Xiao et al., 2010).

Πέραν όμως της εμπλοκής των μοριακών συνοδών στην πρωτεϊνική αναδίπλωση και καταβολισμό, περαιτέρω στοιχεία κατέδειξαν μια επιλέον λειτουργία, που έθεσε σε δεύτερη μοίρα αυτή της αναδίπλωσης-καταβολισμού. Η λειτουργία αυτή αφορούσε την εμπλοκή τους στο μηχανισμό ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα σε δύο επίπεδα: κατά την έναρξη της αναδίπλωσης και κατά τη

συγκρότηση ολιγομερών (Hurtley and Helenius, 1989). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι μοριακοί συνοδοί δεν αποτελούν πρωτεΐνες αναδίπλωσης, αλλά έχουν ένα μοναδικό ρόλο να αποτρέπουν άλλες πρωτεΐνες από το να εισέρχονται σε «αδιέξοδα αναδίπλωσης» και παράλληλα συνεργάζονται με πρωτεολυτικά συστήματα για την καταστροφή σταθερών λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Morange, 2005).

Μια ενδιαφέρουσα λειτουργία της GroEL η οποία θα μπορούσε να υποδηλώνει μια σύνδεση των μοριακών συνοδών με τον αρχαίο κόσμο του RNA, αφορά στη ρύθμιση του mRNA. Συγκεκριμένα, κατά την αύξηση παρατηρήθηκε σε αυξημένη ποσότητα μιας τροποποιημένης μορφής της GroEL, η οποία προσδένει RNA και εμπλέκεται στη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA, προστατεύοντάς το από πέψη μέσω νουκλεασών. Η πρόσδεση αυτή φαίνεται να αναστέλλεται με την προσθήκη Mg^{2+} και ATP/ADP, ενώ είναι πιο σταθερή για RNA που δε φέρει δευτεροταγείς ή τεταρτοταγείς δομές (Georgellis et al., 1995).

Η προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες στους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς σχετίζεται έντονα με τη λειτουργία των μοριακών συνοδών και συγκεκριμένα με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Graf and Jakob, 2002; Papp et al., 2003). Συγκεκριμένα, η οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μικρού μοριακού βάρους και η οικογένεια των Hsp70s δρουν ως κυτταροπλασματικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες, προστατεύοντας τις πρωτεΐνες στόχους τους, καλύπτοντας τις ευαίσθητες περιοχές τους. Σε περίπτωση αδυναμίας του μηχανισμού προστασίας, οι Hsps όπως έχει ήδη αναφερθεί, συγκρατούν τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες μέχρι την επαναδίπλωση ή την αποδιάταξή τους (Papp et al., 2003). Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, η Hsp33 παρουσιάζει οξειδοαναγωγικά ρυθμιζόμενη δραστηριότητα μοριακού συνοδού, προστατεύοντας πρωτεΐνες και κύτταρα από τα δηλητηριώδη αποτελέσματα των ενεργών μορφών οξυγόνου (Graf and Jakob, 2002). Φαίνεται λοιπόν πως οι μοριακοί συνοδοί δρουν ως κεντρικά μόρια στην μετάδοση των αλλαγών του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στο κύτταρο (Papp et al., 2003).

Ελλείπει βάσιμων στοιχείων, πολλοί υποθέτουν ότι η λειτουργία των μοριακών συνοδών μπορεί να ρίξει φως σε τομείς όπου δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή ερευνητικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα στην ανοσολογία, κατά την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων (Clark and Muchowski, 2000), αλλά και στον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου, της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης και στους μηχανισμούς γήρανσης (Morange, 2005), οι οποίοι σχετίζονται με την συμπλεγματοποίηση των πρωτεϊνών (Cohen et al., 2006).

Σε επίπεδο οργανισμού, έχει δειχθεί ότι η αργή εκκίνηση των συμπτωμάτων νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Huntington, η νόσος Creutzfeldt-Jacob, η νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία και το πάρκινσον συνδέονται γενετικά και παθολογικά με την συμπλεγματοποίηση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών πλούσιων σε β-πτυχές (Selkoe, 2003; Barral et al., 2004). Η βάση των ασθενειών αυτών πρέπει να οφείλεται σε εξασθένιση λόγω ηλικίας των μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών από τους μοριακούς συνοδούς (Barral et al., 2004). Ο λόγος για τον οποίο η τοξικότητα λόγω συμπλεγματοποίησης εμφανίζεται αργά στη ζωή (Selkoe, 2003) και εάν συνδέεται μηχανιστικά με τη γήρανση είναι άγνωστα μέχρι στιγμής (Cohen et al., 2006). Πρόσφατες έρευνες ωστόσο καταδεικνύουν το ρόλο του παράγοντα θερμικού σοκ 1 (Hsf1) στην επέκταση του προσδόκιμου ζωής στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* (Cohen et al., 2006). Συγκεκριμένα, αύξηση στην έκφραση του Hsf-1 οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής του σκώληκα (Hsu et al., 2003), ανεξάρτητα εάν η αύξηση αυτή πραγματοποιηθεί σε εντερικό, νευρικό, ή μυϊκό ιστό με χρήση ειδικών κάθε φορά για τον ιστό υποκινητών (Morley and Morimoto, 2004), ενώ η μείωση της έκφρασής του

οδηγεί σε ένα φαινότυπο ραγδαίας γήρανσης και μείωση του προσδόκιμου ζωής (Garigan et al., 2002; Morley and Morimoto, 2004). Ζώα που φέρουν επιπλέον αντίγραφα του γονιδίου *hsf-1* αποδείχθηκε ότι ανθίστανται στο οξειδωτικό και το θερμικό στρες και ζουν κατά 40% περισσότερο από τα αντίστοιχα αγρίου τύπου ζώα (Hsu et al., 2003). Το γεγονός ότι η μεταγραφή του Hsf-1 οδηγεί στην έκφραση διάφορων μοριακών συνοδών (Garigan et al., 2002; Hsu et al., 2003; Morley and Morimoto, 2004), υποδηλώνει ότι η ακεραιότητα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, στην οποία σημαντικό ρόλο παίζουν οι μοριακοί συνοδοί, μπορεί να διαδραματίσει ένα καίριο ρόλο στη διαμόρφωση του προσδόκιμου ζωής και στην υποβάθμιση της τοξικότητας που προέρχεται από τη συμπλεγματοποίηση των πρωτεϊνών (Cohen et al., 2006).

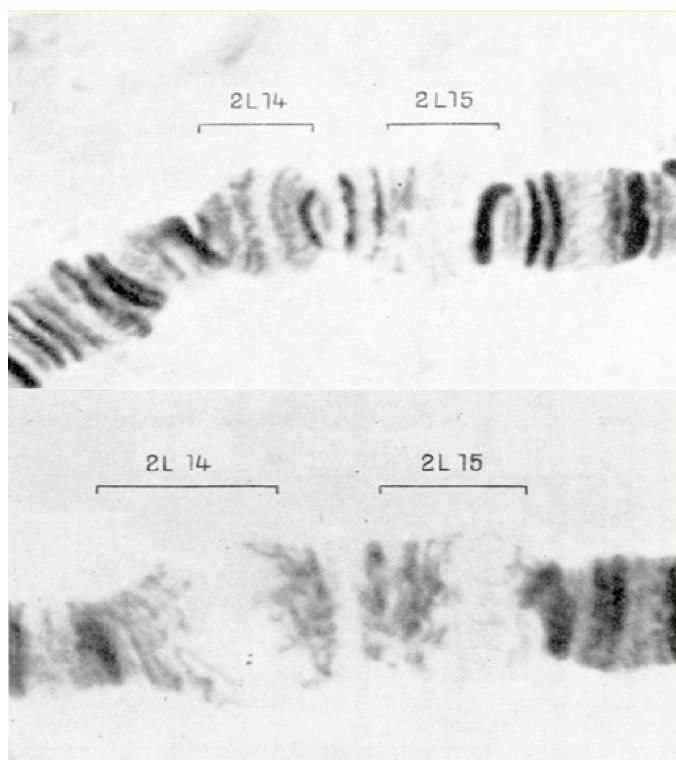
Οι μοριακοί συνοδοί της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, παίζουν σημαντικό ρόλο σε κλινικές καταστάσεις που έχουν να κάνουν με παθήσεις της καρδιάς, όπως καρδιακή υπερτροφία, καρδιακή ανεπάρκεια, ισχαιμικό επεισόδιο, τραύμα των αγγειακών τοιχωμάτων, βοηθώντας στην φυσιολογική προσαρμογή, αλλά και σε χειρουργικές επεμβάσεις της καρδιάς και κατά την ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning). Σε ορισμένες από αυτές τις καταστάσεις, όπως στην περίπτωση της ισχαιμίας οι πρωτεΐνες του μυοκαρδίου υφίστανται βλάβες, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Benjamin and McMillan, 1998; Willis and Patterson, 2010). Στις περιπτώσεις αυτές, για να επανέλθει η κυτταρική ομοιόσταση, το κύτταρο αποκρίνεται μέσω των Hsps (Willis and Patterson, 2010), οι οποίες όπως έχει αναφερθεί καθοδηγούν τις πρωτεΐνες στην ορθή τους διαμόρφωση (Ellis and Hemmingsen, 1989; Hartl, 1996), επιδιορθώνουν τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες ή προωθούν την αποικοδόμησή τους (Pelham, 1986; Hightower, 1991). Η επιβεβαίωση της εμπλοκής της Hsp70 σε καρδιακές παθήσεις, έρχεται από φαρμακολογικές ή γενετικές μεθόδους, οι οποίες αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης στο μυοκάρδιο των ασθενών με κίνδυνο οξέος ισχαιμικού επεισοδίου, μπορούν να μειώσουν το ισχαιμικό τραύμα (Benjamin and McMillan, 1998).

Η ανάλυση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που γειτνιάζουν σε μεταλλάξεις υπεύθυνες για μια σωρεία κληρονομίσιμων ασθενειών, αποκάλυψε ότι αλλαγές σε γονίδια που κωδικεύουν για μοριακούς συνοδούς με γνωστές λειτουργίες μπορεί να είναι υπεύθυνες για τις ασθένειες αυτές λόγω απώλειας της λειτουργίας μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών υποστρωμάτων που λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί (Barral et al., 2004). Παράδειγμα αποτελεί η κληρονομική σπαστική παραπληγία SPG13 η οποία προκαλείται από μια μη-νοηματική υποκατάσταση της γλυκίνης από αλανίνη στη θέση 292 της ισημερινής υπομονάδας του μιτοχondριακού μοριακού συνοδού Hsp60 (Hansen et al., 2002). Μη νοηματικές υποκαταστάσεις σε διατηρημένα κατάλοιπα αργινίνης στην α-κρυσταλλίνη, μέλος των μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μπορεί να οδηγήσει επίσης σε δύο ασθένειες. Η υποκατάσταση της αργινίνης από κυστεΐνη στη θέση 116 της αΑ υπομονάδας της α-κρυσταλλίνης οδηγεί στο σχηματισμό μιας μορφής κληρονομικού καταρράκτη λόγω αποσταθεροποίησης της φυσικής διαμόρφωσης της α-κρυσταλλίνης και συμπλεγματοποίησής της εξαιτίας σχηματισμού επιπλέον δισουλφιδικών δεσμών και αύξησης του θετικού φορτίου στο μόριό της (Litt et al., 1998), ενώ η υποκατάσταση της αργινίνης από γλυκίνη στη θέση 120 της αΒ υπομονάδας της α-κρυσταλλίνης οδηγεί σε μια μορφή μυοπάθειας σχετιζόμενης με τη δεσμίνη (Vicart et al., 1998).

Μια δράση των μοριακών συνοδών που πρόσφατα ήρθε στο φως, αφορά το ρόλο τους στην τοπική απόκριση του δέρματος σε πληγές, γήρανση λόγω περιβαλλοντικών ρύπων (Babizhayev et al., 2011) και ένα εύρος δερματικών παθήσεων όπως ερύθημα, οίδημα, ρυτίδωση, φλεγμονή, αυτοάνοσες αντιδράσεις,

υπερευαισθησία, ανωμαλίες κερατινοποίησης, προνεοπλαστικές κακώσεις και καρκίνος που πιθανά οφείλονται στην αλληλεπίδραση του δέρματος με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) που βρίθουν στο περιβάλλον (Trouba et al., 2002; Babizhayev et al., 2011). Στο ανθρώπινο δέρμα, συναντώνται υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και υπό συνθήκες στρες, όλες οι γνωστές οικογένειες των Hsps (Babizhayev et al., 2011). Η ύπαρξή τους θεωρείται σημαντική για το δέρμα σε θεμελιώδεις διεργασίες όπως η προστασία από βλάβες προκαλούμενες από UV ακτινοβολία (Trautinger et al., 1995; Zhou et al., 1998; Trautinger, 2003) και η επούλωση του δέρματος από πληγές (Laplante et al., 1998). Η προστατευτική τους δράση φαίνεται να έχει να κάνει κυρίως με τη διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης, η οποία αν διαταραχθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω των ανωτέρω αναφερόμενων στρεσογόνων για το δέρμα παραγόντων, μπορεί να οδηγήσει σε αναποτελεσματική ανάπτυξη και παθογένειες του δέρματος που σχετίζονται με μια σειρά ασθενειών που οφείλονται σε τραύμα του δερματικού ιστού (Babizhayev et al., 2011).

1.2. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ των 70 kDa - Hsp70



Εικόνα 1.6-Επάνω: Οι περιοχές 2L14 και 15 των χρωμοσώματων από σιελογόνους αδένες που εξήχθησαν από προνύμφες *Drosophila Busckii* που αναπτύχθηκαν στους 25° C.

Κάτω: Οι ίδιες περιοχές με την επάνω φωτογραφία μετά από θερμικό πλήγμα στους 30° C για 30 λεπτά (Ritossa, 1962).

Οι πρώτες αναφορές σχετικά με την επαγωγή της έκφρασης κάποιων γονιδίων μετά από θερμικό σοκ χρονολογούνται από το 1962, στο Ινστιτούτο Γενετικής της Παβία στην Ιταλία, όταν ένας συνεργάτης του Ferruccio Ritossa ανέβασε κατά λάθος τη θερμοκρασία ενός επωαστικού θαλάμου όπου ανέπτυσε ιστούς που είχε απομονώσει από σιελογόνους αδένες της *Drosophila busckii* από τους 25 στους 30° C, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο ένα ανεπιθύμητο ίσως, αλλά με ευχάριστες εξελίξεις θερμικό σοκ στους ιστούς (Ritossa, 1962; Ritossa, 1996). Ευχάριστες, διότι με τον τρόπο αυτό έγινε η πρώτη παρατήρηση για την απόκριση σε θερμικό σοκ. Στην ουσία, αυτό που μελετούσε ο Ritossa ήταν ποιο είδος νουκλεϊκού οξέος συντίθεται σε ορισμένες διογκώσεις που εμφανίζονταν

στα χρωμοσώματα της *Drosophila* και η παρουσία τους είχε εξηγηθεί ως μεταβολή στην ενεργότητα των χρωμοσωμάτων (Ritossa, 1962), παρ' όλο που ήδη από πιο νωρίς είχε παρατηρηθεί ότι το κύριο προϊόν αυτών των διογκώσεων είναι RNA (Sirlin, 1960).

Αυτό που παρατήρησε ο Ritossa μετά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας στον επωαστικό θάλαμο, ήταν πως το θερμικό σοκ προκαλούσε μεταβολές στο πρότυπο των διογκώσεων στους σιελογόνους αδένες της *Drosophila* (Εικόνα 1.6). Οι μεταβολές αυτές αφορούσαν πάντα τις ίδιες θέσεις και συγκεκριμένες μεταβολικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, οι διογκώσεις περιορίζονταν στις θέσεις 14, 15 και 20 του 2L χρωμοσώματος και συνέβαιναν μετά από θερμικό σοκ στους 30° C για 30 λεπτά ή και παραπάνω, ενώ με επαναφορά στους 25° C οι διογκώσεις υποχωρούσαν (Ritossa, 1962).

Χρησιμοποιώντας ραδιενεργό κυτιδίνη, απέδειξε ότι ήδη μετά από 3-4 λεπτά θερμικού σοκ υπήρχαν μεγάλα ποσά ραδιενέργειας στις διογκώσεις (Ritossa, 1962), ενώ η ραδιενέργεια απομακρυνόταν με τη χρήση RNAάσης (Ritossa et al., 1965), γεγονός που υποδεικνύει ότι το νουκλεϊκό οξύ που παράγεται στις διογκώσεις είναι RNA (Ritossa, 1962).

Μετά από 10 χρόνια περίπου από την ανακάλυψη του Ritossa, το 1973, η ομάδα των Tissières και Mitchell εγκαινίασε τη μοριακή ανάλυση της απόκρισης σε θερμικό σοκ, αναφέροντας ότι η επαγωγή αυτών των διογκώσεων συνέπιπτε με τη σύνθεση ενός μικρού αριθμού νέων πρωτεϊνών (Tissières et al., 1974), οι οποίες ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps), επειδή επάγονταν μετά από έκθεση των κυττάρων σε αυξημένη θερμοκρασία (Tavaria et al., 1996). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες αυτές είναι διατηρημένες σε όλους τους οργανισμούς, από τα ευβακτήρια ως τα αρχαιοβακτήρια, τα θηλαστικά και τα φυτά, ενώ η απόκριση σε θερμικό σοκ συναντάται σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιστό πολυκύτταρων οργανισμών (Lindquist, 1986).

Μια από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ που επάγονται αποτελεί και η Hsp70. Η Hsp70 αποτελεί το κυριότερο και πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος των στρες επαγόμενων πρωτεϊνών (Tavaria et al., 1996).

Στον άνθρωπο, υπάρχουν διάφορες ισομορφές της οικογένειας των Hsp70s που κωδικεύονται από αρκετά διακριτά γονίδια (Heck et al., 2011), για τον αριθμό των οποίων υπάρχουν διχογνωμίες ανάμεσα στις διάφορες ερευνητικές ομάδες. Έτσι, η πρώτη έρευνα ταυτοποίησε 11 γονίδια (Tavaria et al., 1996), ενώ πιο πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη 12 (Henderson, 2010), 13 (Kampinga et al., 2009; Hageman and Kampinga, 2009; Heck et al., 2011), ακόμα και 17 διακριτών γονιδίων (Bocchieri et al., 2008), που εδράζονται στα χρωμοσώματα 1 (Tavaria et al., 1996), 5 (Fathallah et al., 1993), 6 (Goate et al., 1987; Harrison et al., 1987; Sargent et al., 1989), 9 (Hendershot et al., 1994), 11 (Tavaria et al., 1995), 14 (Harrison et al., 1987; Bonnycastle et al., 1994) και 21 (Harisson et al., 1987).

Το πρώτο γονίδιο της Hsp70 που υποκλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε ήταν η επαγόμενη μορφή με εντοπισμό κυτταροπλασματικό (Wu et al., 1985) και πυρηνικό (Welch and Feramisco, 1984). Στη συγκεκριμένη ισομορφή δόθηκαν πολλά ονόματα, όπως *hsp70*, *hsp72*, *hsp70-1*, *hsp70i* και *hsx70*, ενώ σε καποιες γονιδιακές βάσεις δεδομένων εμφανίζεται και ως HSP70D. Δεν περιέχει ιντρόνια, όπως και οι άλλες επαγόμενες Hsp70s (Tavaria et al., 1996). Η χρωμοσωμική εντόπισή της πραγματοποιήθηκε σε δύο ξεχωριστές μελέτες χρησιμοποιώντας υβριδοποίηση κατά Southern σε υβριδικά σωματικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού (Goate et al., 1987; Harrison et al., 1987) και βελτιστοποιήθηκε αργότερα με χαρτογράφηση κοσμιδίων (Sargent et al., 1989). Η χαρτογράφηση αυτή τοποθέτησε το γονίδιο στο χρωμόσωμα 6p21.3 (Tavaria et al., 1996), εντός της περιοχής του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας κλάσης III (MHC class III) και αναγνώρισε επιπλέον δύο κοντινά γονίδια της Hsp70 (Milner and Campbell, 1990). Τα τρία αυτά γονίδια ήταν συνολικά γνωστά μέχρι πρόσφατα ως HSPA1 (Tavaria et al., 1996). Λεπτομερής κλωνοποίηση

και ανάλυση αλληλουχίας αποκάλυψε ότι το δεύτερο γονίδιο ήταν σχεδόν ταυτόσημο με το πρώτο και κωδικοποιούσε για μια παρόμοια πρωτεΐνη (Milner and Campbell, 1990). Το γονίδιο αυτό, που εδράζεται 11kb κεντρομεριδιακά προς το *hsp70-1*, ονομάστηκε *hsp70-2* (Tavaria et al., 1996). Το τρίτο γονίδιο, που εδράζεται περίπου 4kb τελομεριδιακά ως προς το *hsp70-1* ονομάστηκε *hsp70-Hom* (Milner and Campbell, 1990), καθώς δεν ήταν γνωστό εάν κωδικοποιούσε για κάποια λειτουργική πρωτεΐνη (Tavaria et al., 1996), ενώ ήταν ομόλογη της *hsp70-1*. Έκτοτε, η *hsp70-Hom* απεδείχθη ότι εκφράζεται τόσο συνεχώς όσο και μετά από θερμικό σοκ και όπως και οι *hsp70-1* και *hsp70-2* δεν περιέχει ιντρόνια (Milner and Campbell, 1990). Στα τρία αυτά γονίδια έχουν δοθεί οι ονομασίες HSPA1A, HSPA1B και HSPA1L σε σχέση με τους γονιδιακούς τόπους τους ενώ ως γονίδια είναι πλέον γνωστά ως *hsp70-1a*, *hsp70-1b* και *hsp70-1l* αντίστοιχα (Tavaria et al., 1996).

Η ανάλυση υβριδικών σωματικών κυττάρων ποντικού και ανθρώπου με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων αποκάλυψε την παρουσία πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 kDa σε υβριδικές κυτταρικές σειρές που περιείχαν τα ανθρώπινα χρωμοσώματα 6, 14 και 21 (Harrison et al., 1987). Η ανάλυση πολυμορφισμών με υβριδοποίηση κατά Southern επιβεβαίωσε την παρουσία μιας Hsp70-σχετιζόμενης αλληλουχίας στο χρωμόσωμα 14 (Goate et al., 1987) (γνωστή και με το όνομα *hsp70-3*) αλλά όχι στο χρωμόσωμα 21 (Tavaria et al., 1996), κάτι που επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε υβριδικά ωάρια επίμυος - ανθρώπου (Gabriele et al., 1996).

Στα 1994 κλωνοποιήθηκε ένα γονίδιο της Hsp70 στο χρωμόσωμα 14 που έχει ένα μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 639 αμινοξέων με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 70.030 Da. Βρέθηκε ότι εκφράζεται κατά συνεχή τρόπο στους περισσότερους ιστούς, με πολύ υψηλά επίπεδα στους όρχεις και τους σκελετικούς μύες, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα βρέθηκε στις ωοθήκες, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο, τον εγκέφαλο, τον πλακούντα και τους νεφρούς (Bonnycastle et al., 1994). Το γονίδιο αυτό με όνομα ως προς το γονιδιακό τόπο HSPA2 εντοπίστηκε στη θέση 14q22 (Tavaria et al., 1996) και στη θέση 14q24.1, σε ένα τεχνητό χρωμόσωμα ζυμομύκητα (YAC) που περιείχε την αλληλουχία του γονιδίου, με χρήση φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης (FISH) (Bonnycastle et al., 1994). Η διαφορά εντόπισης στις δύο αυτές θέσεις είναι πολύ σημαντική σε κυτταρογενετικούς όρους. Κατόπιν ενδελεχούς μελέτης των δημοσιευμένων αλληλουχιών διαπιστώθηκε ότι οι αυτές δεν είναι στην πραγματικότητα όμοιες. Η μερική αλληλουχία της ομάδας του Roux στα 1994 περιέχει αρκετές διαφορές στην 5' αμετάφραστη περιοχή, συμπεριλαμβανομένης μιας ακολουθίας που φαίνεται να καταστρέφει το υποθετικό πλαίσιο CAAT που ανακαλύφθηκε από την ομάδα του Bonnycastle, καθώς και ένα έλλειμμα τριών ζευγών βάσεων στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που οδηγεί σε έλλειμμα ενός αμινοξέος. Σε αυτό το στάδιο δεν ήταν ξεκάθαρο εάν αυτές οι διαφορές οφειλόταν σε πολυμορφισμούς, ή σφάλματα αλληλούχισης ή υποκλωνοποίησης. Ήταν επίσης πιθανό οι αλληλουχίες αυτές να αντιπροσώπευαν διαφορετικά γονίδια, ιδίως αφού το πρότυπο έκφρασης των δύο αλληλουχιών σε ιστούς διέφερε σημαντικά (Tavaria et al., 1996). Η πιθανότητα αυτή ενισχύθηκε σημαντικά από τη μεγάλη κατανομή κοκκίων στην περιοχή 14q22-24 μετά από *in situ* υβριδοποίηση (Harrison et al., 1987). Για το λόγο αυτό, οι δύο αλληλουχίες των Bonnycastle και Roux διαχωρίστηκαν ονοματολογικά ως *hsp70-2a* και *hsp70-2b* αντίστοιχα (Tavaria et al., 1996).

Στα 1993 κλωνοποιήθηκε ένα γονίδιο της Hsp70 από B-κύτταρα διαμολυσμένα με τον EBV που λήφθησαν από έναν ασθενή με λευκοκυτταρική ανεπάρκεια προσκόλλησης μορίων. Το cDNA του είχε μήκος 2391 bp και

κωδικοποιούσε για πρωτεΐνη μήκους 701 αμινοξέων. Η θέση του ταυτοποιήθηκε στο 5q31.1-31.2 χρωμόσωμα, ονομάστηκε Hsp70RY (Fathallah et al., 1993) και του δόθηκε ο γενετικός χαρακτηρισμός HSPA4, ενώ είναι γνωστό και ως *hsp70-4* (Tavaria et al., 1996).

Η ομόλογη της Hsp70 στο ενδοπλασματικό δίκτυο BiP ταυτοποιήθηκε με PCR και φθορισμογόνο *in situ* υβριδοποίηση σε υβριδικά σωματικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού στο 9q34 χρωμόσωμα (Hendershot et al., 1994). Επειδή η αρχική της ονομασία ως GRP78 δεν την κατέτασσε στην οικογένεια των Hsp70s, της έχει αποδοθεί και το σύμβολο HSPA5 και το γονιδιακό όνομα *hsp70-5* (Tavaria et al., 1996).

Δύο γονίδια με υψηλό βαθμό συσχέτισης με την Hsp70 βρίσκονται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (Leung et al., 1992). Αυτά τα γονίδια, που πρωτίστως είχαν χαρακτηριστεί ως *hsp70B* (Schiller et al., 1988) ή *hsp70-7* (Tavaria et al., 1996) και *hsp70B'* (Leung et al., 1990) ή *hsp70-6* (Tavaria et al., 1996), είναι θερμικά επαγόμενα, με διαφορετικό όμως πρότυπο επαγωγής. Στα γονίδια αυτά δόθηκαν οι γενετικοί συμβολισμοί HSPA7 (γονίδιο *hsp70-7*) και HSPA6 (γονίδιο *hsp70-6*) αντίστοιχα (Tavaria et al., 1996).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την κύρια συνεχώς εκφραζόμενη κυτταροπλασματική Hsp70 (Hsc70 ή Hsp73), εντοπίστηκε με *in situ* υβριδοποίηση σωματικών υβριδικών κυττάρων στο χρωμόσωμα 11q23.3-q25 και του δόθηκε ο γενετικός συμβολισμός HSPA8 (Tavaria et al., 1995).

Η Hsp70 αποτελεί το κυριότερο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 kDa (Tavaria et al., 1996). Στη συγκεκριμένη ενότητα θα γίνει αναφορά στην ανθρώπινη Hsp70 (HSPA1A – παλαιότερες ονομασίες Hsp72, Hsp70i, Hsp70-1, HSPA – κωδικός αρίθμησης Swiss Prot 3303), η οποία είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 641 αμινοξέα (PUBMED - US National Library of Medicine/National Institutes of Health) (Εικόνα 1.7) και της οποίας η έκφραση επάγεται σημαντικά σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας (Lindquist and Craig, 1988).

Η επαγόμενη από στρες Hsp70 εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα και την πλασματική μεμβράνη πρωτογενών όγκων διάφορων προελεύσεων. Έχει αποδειχθεί η ενσωμάτωση της Hsp70 στην πλασματική μεμβράνη κακοήθων νεοπλασιών, ενώ σε μη κακοήθη μετασχηματισμένα κύτταρα, συνδέεται με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Η έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα ενισχύεται περισσότερο ως απόκριση σε αρκετά παθολογικά και περιβαλλοντικά στρες όπως αποστέρηση θρεπτικών υλικών, υποξία, βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία και χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Αντίθετα, η έκφρασή της σε κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι χαμηλή και περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε συνθήκες θερμικού σοκ εισέρχεται στον πυρήνα και συγκεκριμένα στους πυρηνίσκους και/ή σε άλλες ετεροχρωματινικές περιοχές (Welch and Feramisco, 1984; Ferrarini et al., 1992; Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 1997; Hantschel et al., 2000; Nylandsted et al., 2004; Kotoglou et al., 2009; Multhoff and Hightower, 2011).

```

      10      20      30      40      50      60
MAKAAAIGID LGTTYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRTTTPS YVAFTDTERL IGDAAKNQVA

      70      80      90     100     110     120
LNPQNTVFDA KRLIGRKFQD PVVQSDMKHW PFQVINDGDK PKVQVSYKGE TKAFYPPEIS

     130     140     150     160     170     180
SMVLTKMKEI AEAYLGYFVT NAVITVPAYF NDSQRQATKD AGVIAGLNLV RIINEPTAAA

     190     200     210     220     230     240
IAYGLDRTGK GERNLVIFDL GGGTFDVSIL TIDDGIFEVK ATAGDTHLGG EDFDNRLVNH

     250     260     270     280     290     300
FVEEFKRKHK KDISQNKRAV RRLRTACERA KRTLSSSTQA SLEIDSLFEG IDFYTSITRA

     310     320     330     340     350     360
RFEELCSDLF RSTLEPVEKA LRDAKLDKAQ IHDLVLVGGS TRIPKVQKLL QDFFNGRDLN

     370     380     390     400     410     420
KSINPDEAVA YGAAVQAAIL MGDKSENVQD LLLLDVAPLS LGLETAGGVM TALIKRNSTI

     430     440     450     460     470     480
PTKQTQIFTT YSDNQPGVLI QVYEGERAMT KDNLLGRFE LSGIPPAPRG VPQIEVTFDI

     490     500     510     520     530     540
DANGILNVTA TDKSTGKANK ITITNDRGRL SKEEIERMVQ EAEKYKAEDE VQRERVSARN

     550     560     570     580     590     600
ALESYAFNMK SAVEDEGLKG KISEADKRRV LDKCQEVISW LDANTLAERD EFEHKRKELE

     610     620     630     640
QVCNPIISGL YQGAGGPGPG GFGAQGPRGG SSGSGPTIEEV D

```

Εικόνα 1.7: Η αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης Hsp70 (HSPA1A) με τα αμινοξέα να αναπαριστώνται στον κώδικα ενός γράμματος (Pubmed - US National Library of Medicine/National Institutes of Health).

Εκτός από την ενδοκυττάρια εντόπιση της Hsp70, υπάρχουν αναφορές για ανεξάρτητη απελευθέρωσή της από το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi (Hightower and Guidon, 1989; Multhoff and Hightower, 2011), με αρκετά υψηλές ποσότητες να μετρώνται στο πλάσμα και τον ορό του αίματος (Périard et al., 2012). Επιπλέον, η Hsp70 έχει βρεθεί στην επιφάνεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (Multhoff et al., 1995), παρ'όλο που δεν φέρει διαμεμβρανική περιοχή (Multhoff and Hightower, 2011), όχι όμως και στην επιφάνεια φυσιολογικών

κυττάρων (Muthhoff et al., 1995). Οι μηχανισμοί εξόδου της Hsp70 από τα κύτταρα είναι ακόμα αμφιλεγόμενοι, καθώς δεν έχει βρεθεί κάποιο σήμα έκκρισης από αυτά (Muthhoff and Hightower, 2011). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι το περιβάλλον σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα είναι όξινο, υποξικό και χωρίς θρεπτικά στοιχεία (Vaupel et al., 1989), επάγοντας έτσι ένα χαμηλότερο ενδοκυτταρικό pH σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι το χαμηλό pH προκαλεί τέτοιες αλλαγές στη διαμόρφωση της Hsp70 που τελικά έχουν ως αποτέλεσμα την εντόπισή της στην επιφάνεια του κυττάρου. Δεν πρέπει όμως να αποκλειστεί και η πιθανότητα της απευθείας αλληλεπίδρασης της Hsp70 με τη μεμβράνη, δεδομένου ότι δεν έχει βρεθεί κάποιος υποδοχέας για την Hsp70 στην επιφάνεια των κυττάρων (Muthhoff and Hightower, 1996). Όσον αφορά στην εξωκυττάρια eHsp70 στον άνθρωπο, δεν ανιχνεύεται στους σκελετικούς μύες, οι οποίοι δεν φαίνεται να την εκφράζουν (Pétiard et al., 2012). Φαίνεται ότι οι μυϊκές ίνες που δεν έχουν υποστεί βλάβες λόγω άσκησης είναι αδιαπέραστες από την Hsp70 (Febbraio et al., 2002b). Αντίθετα, οι ηπατοσπλαγγχνικοί ιστοί δύνανται να απελευθερώσουν Hsp70 στη συστηματική κυκλοφορία μετά από άσκηση (Febbraio et al., 2002a). Παρόμοια έκκριση της Hsp70 μετά από άσκηση, φαίνεται να πραγματοποιείται και από τον εγκέφαλο (Lancaster et al., 2004).

Δομή της Hsp70: Τα μέλη της οικογένειας θερμικού σοκ των 70 kDa έχουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους ως προς την ακολουθία των αμινοξέων τους. Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό των συντηρημένων αμινοξέων των διάφορων μελών ανάμεσα στις ίδιες πρωτεΐνες στα διάφορα είδη, εξαρτάται από το πόσο σημαντική λειτουργία επιτελεί κάθε μέλος, ώστε η αλληλουχία να έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη (Feige and Polla, 1994).

Η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας των Hsp70 εξήχθη κυρίως από δεδομένα που λήφθησαν από βιοχημική, κρυσταλλογραφική και μοριακή ανάλυση μοντέλων (Günther and Walter, 1994).

Η ανάλυση του γονιδίου της Hsp70 σε διάφορες κυτταρικές σειρές αποκάλυψε μια σειρά πολυμορφισμών στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5' utr) (Günther and Walter, 1994) και μια σιωπηλή μετάλλαξη C → T στην κωδικοποιούσα περιοχή στη θέση 438 (Milner and Campbell, 1992).

Το γονίδιο της Hsp70 μεταγράφεται ως ένα αδιάκοπο πρόδρομο μεταγράφημα 2440 νουκλεοτιδίων που αντιστοιχεί σε ένα πολυαδενυλιωμένο κυτταροπλασματικό mRNA 2,6 kb και αποτελείται από μια 5' αλληλουχία οδηγό 212 νουκλεοτιδίων, μια 3' μη κωδική περιοχή 242 νουκλεοτιδίων και ένα συνεχές ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 1986 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 69.800 daltons και καταλήγει στο εντός πλαισίου ανάγνωσης κωδικόνιο λήξης TAG. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου αποκάλυψε ότι το 5' άκρο γειτνιάζει με την συγκαταβατική αλληλουχία εκκίνησης TATAAA η οποία βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -22 έως -28 ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής, ενώ το 3' άκρο γειτνιάζει με το σήμα πολυαδενυλίωσης AATAAA. Το 5' αμετάφραστο τμήμα, με μήκος 211 νουκλεοτιδίων, ακολουθείται από το κωδικόνιο έναρξης AUG το οποίο σηματοδοτεί το σημείο έναρξης της μετάφρασης της Hsp70, αλλά και την έναρξη του μοναδικού συνεχούς ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης από τα τρία που συναντώνται εντός του γονιδίου (Hunt and Morimoto, 1985).

Ο υποκινητής των περισσότερων *hsp70* γονιδίων είναι συμπαγής και περιέχει τα απαραίτητα στοιχεία σε μια περιοχή περίπου 200 νουκλεοτιδίων ανοδικά της 5' UTR (Günther and Walter, 1994). Η *cis*-δρώσα περιοχή ανοδικά του υποκινητή είναι επίσης εξαιρετικά συμπαγής (Lin et al., 1999). Το χαρακτηριστικό στοιχείο του

υποκινητή είναι το συχνά επαναλαμβανόμενο στοιχείο θερμικού σοκ (HSE: Heat Shock Element) που είναι απαραίτητο για τη θερμική επαγωγή (Günther and Walter, 1994). Ο υποκινητής του γονιδίου της ανθρώπινης Hsp70 περιέχει τουλάχιστον δύο περιοχές ρύθμισης: μια μακρινή περιοχή που οδηγεί σε μεταγραφή μετά από θερμικό σοκ ή επώαση με κάδμιο και μια κοντινή περιοχή που δίνει μεταγραφήματα μετά από αποστέρηση ορού. Η μακρινή περιοχή εδράζεται 100 νουκλεοτίδια ανοδικά του γονιδίου της Hsp70 και αποτελεί ένα 14-νουκλεοτίδιο με αλληλουχία CTGGAATATTCCTCG. Η έλλειψη αυτής της αλληλουχίας οδηγεί σε αδυναμία απόκρισης σε θερμικό στρες. Η κοντινή περιοχή περιέχει δύο αλληλουχίες, ένα πλαίσιο CCAAT στην μη κωδική αλυσίδα και μια περιοχή πλούσια σε πουρίνες με αλληλουχία AGAAGGGAAAAGG. Αυτή η αλληλουχία είναι και η πιο σημαντική από τις δύο και είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα του υποκινητή μετά από αποστέρηση ορού (Wu et al., 1986). Ένα άλλο στοιχείο θερμικής επαγωγής (HSE) που βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -180 και -203 και πιο συγκεκριμένα οι αλληλουχίες του τύπου nTTCn που βρίσκονται εντός του HSE, είναι υπεύθυνο για την επαγωγή του γονιδίου της Hsp70 κατά την έκθεση σε μαγνητικά πεδία (Lin et al., 1999).

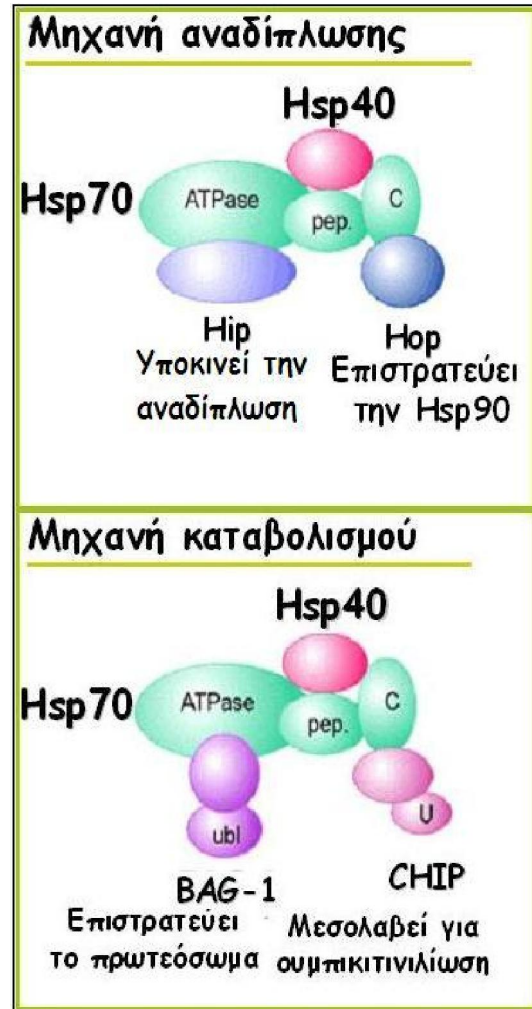
Εντός του γονιδίου της Hsp70 μεταξύ των νουκλεοτιδίων -115 και -131, βρίσκεται η αλληλουχία GGGGCaggacggGAGGC η οποία φέρει δύο αντίγραφα της πεντανουκλεοτιδικής αλληλουχίας G(A/G)GGC, η οποία φέρει ομολογία προς την περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων του μεγάλου T αντιγόνου του SV40 και του ιού πολυώματος (Hunt and Morimoto, 1985). Η θέση των προαναφερθέντων πεντανουκλεοτιδικών αλληλουχιών ανοδικά του γονιδίου της Hsp70 μπορεί να υποδηλώνει ένα μηχανισμό ενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου από τον SV40 και τον ιό πολυώματος (Hunt and Morimoto, 1985; Angelidis et al., 1988).

Η ανθρώπινη Hsp70 είναι μια πρωτεΐνη 640 αμινοξέων (Sriram et al., 1997). Η ανάλυση της δομής της έδειξε ότι αποτελείται από δύο περιοχές (Εικόνα 1.8), μια υψηλά συντηρημένη N-τελική περιοχή με δράση ATPάσης (Chappell et al., 1987; DeLuca-Flaherty et al., 1988; Feige and Polla, 1994) των 44 kDa (Chappell et al., 1987; DeLuca-Flaherty et al., 1988; Günther and Walter, 1994) που προσδένει νουκλεοτίδια (Heck et al., 2011) και φέρει ομολογία με την ακτίνη (Flaherty et al., 1991; Feige and Polla, 1994; Heck et al., 2011) και την εξοκινάση (Flaherty et al., 1990). Η περιοχή αυτή βρέθηκε να είναι ανθεκτική σε πρωτεόλυση (Günther and Walter, 1994), ενώ αποτελείται από δύο λοβούς με μια βαθιά αύλακα ανάμεσά τους, στη βάση της οποίας προσδένεται το ATP (Flaherty et al., 1990). Στην περιοχή ATPάσης συναντώνται δύο ιόντα ασβεστίου εκ των οποίων το ένα εμπλέκεται στην υδρόλυση του ATP και την *in vitro* φωσφορυλίωση, ενώ το δεύτερο πιθανώς είναι υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση της πρωτεϊνικής δομής της Hsp70 (Sriram et al., 1997). Το μόριο της Hsp70 φέρει και μια λιγότερο διατηρημένη C-τελική περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (Feige and Polla, 1994) με μοριακή μάζα 25 kDa (Kotoglou et al., 2009). Η περιοχή αυτή διαχωρίζεται στην περιοχή πρόσδεσης υποστρωμάτων (SBD), γνωστή και ως περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (PBD) με μέγεθος 15 kDa περίπου (Heck et al., 2011). Το υπόλοιπο τμήμα των 10 kDa (Wang et al., 1993) εμπλέκεται στην πρόσδεση των ομο-συνοδών μορίων (Heck et al., 2011). Η περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων βρίσκεται πλησίον της περιοχής με δράση ATPάσης (Wang et al., 1993) και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις της Hsp70 με κακώς αναδιπλωμένα, μη αναδιπλωμένα, ή μερικώς αποδιεταγμένα πολυπεπτιδικά υποστρώματα (Kotoglou et al., 2009). Το υπόλοιπο τμήμα της C-τελικής περιοχής μεγέθους 10 kDa που αναφέρθηκε, περιέχει την όξινη ρυθμιστική περιοχή EEVD (Glu-Glu-Val-Asp), η οποία ρυθμίζει την υδρόλυση του ATP, την αλληλεπίδραση της Hsp70 με τα

Σε μοριακό επίπεδο, η θερμικά επαγόμενη Hsp70 καθοδηγεί τη διαμόρφωση άλλων πρωτεϊνών καθ'όλη τη διάρκεια της ύπαρξής τους, αποτρέποντας τη συμπλεγματοποίησή τους, με την προστασία των ενεργών – υδρόφοβων περιοχών τους από το σχηματισμό μη παραγωγικών αλληλεπιδράσεων (Bukau et al., 2006; Kampinga and Craig, 2010). Με αυτή της τη δράση, η Hsp70 λειτουργεί ως μοριακός συνοδός που:

α) εμπλέκεται στα μονοπάτια της αναδίπλωσης (Beckman et al., 1990), βοηθώντας στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, όπως αυτές εξέρχονται από τα ριβοσώματα (Bukau et al., 2006; Kampinga and Craig, 2010),

β) καθοδηγεί τη διαμεμβρανική μεταφορά πρωτεϊνών στα μικροσωμάτια (Chirico et al., 1988; Bukau et al., 2006; Kampinga and Craig, 2010)



Εικόνα 1.9: Η νανομηχανή αναδίπλωσης - καταβολισμού της Hsp70 (Αγγελίδης, 2003α.)

Στοιχεία σχετικά με την κατάσταση ολιγομερισμού των Hsp70s οδήγησε στην υπόθεση ότι η ολιγομερής Hsp70 είναι αδρανής ή έχει ελάχιστη δραστηριότητα και για να έχει δράση μοριακού συνοδού, θα πρέπει να βρίσκεται στη μονομερή μορφή (Benaroudj et al., 1996; Angelidis et al., 1999).

Η Hsp70 δεν δρα μόνη της, αλλά στις λεγόμενες «Hsp70 μοριακές νανομηχανές», συνεργάζεται και ρυθμίζεται από αρκετούς ομοσυνοδούς και συμπαραγόντες (Kampinga and Craig, 2010). Ένα εκτεταμένα μελετημένο μοντέλο τέτοιας «μηχανής», αποτελεί η μηχανή αναδίπλωσης – καταβολισμού (Εικόνα 1.9),

γ) ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ελέγχοντας τις αλλαγές στη διαμόρφωσή τους (Bukau et al., 2006; Kampinga and Craig, 2010) και

δ) σε περιπτώσεις στρες, όπως θερμικό στρες κατά το οποίο προκαλείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών (Hofman and Somero, 1995), ή την αποστέρηση ορού, η Hsp70 διευκολύνει τη λυσοσωμική αποδιάταξη (Chiang et al., 1989), είτε παρεμποδίζοντας απλά τη συμπλεγματοποίηση, κρατώντας τα υποστρώματα σε μια κατάσταση ευπαθή στην πρωτεόλυση, είτε διευκολύνοντας ενεργά τη μεταφορά τους σε πρωτεολυτικά συστήματα (Bukau et al., 2006; Kampinga and Craig, 2010).

Οι λειτουργίες αυτές της Hsp70 περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενους κύκλους πρόσδεσης και απελευθέρωσης υποστρωμάτων, μέχρι την τελική ενεργό διαμόρφωση, ή την είσοδο των υποστρωμάτων σε πρωτεολυτικά συστήματα (Bukau et al., 2006; Kampinga and Craig, 2010). Συνήθως δρα σε συνεργασία με μια ομάδα ομο-συνοδών πρωτεϊνών, όπως η Hsp40, προς σχηματισμό ενεργών μοριακών συμπλόκων (μοριακές νανομηχανές) οι οποίες επικουρούν τη δράση της ως μοριακού συνοδού (Minami et al., 1996).

στην οποία η Hsp70, συνεργαζόμενη με τις Hsp40 και Hsp90, ανάλογα με την ανταγωνιστική πρόσδεση των ομοσυνοδών Hip και BAG-1 στο N-άκρο της δομής ATPάσης της, οδηγεί τα υποστρώματα στην αναδίπλωση ή τον καταβολισμό μέσω συγκρότησης του πρωτεοσώματος αντίστοιχα. Στο C-άκρο της Hsp70, προσδένονται ανταγωνιστικά οι Hop και CHIP μέσω του TPR υποδοχέα. Η Hop, ωθεί προς την κατεύθυνση της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, ενώ η CHIP αδρανοποιεί τη δράση ATPάσης της Hsp70 εμποδίζοντας τη σύνδεσή της με άλλους παράγοντες που θα ήταν απαραίτητοι για την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Έτσι το σύστημα οδηγείται προς καταβολισμό (Εικόνα 1.9) (Αγγελίδης, 2003β).

Είναι άξιο λόγου να αναφερθεί ότι η N- και C-τελική περιοχή σχετίζονται με την έκθεση σε αντιγόνο, μια σημαντική διεργασία με την οποία η Hsp70 συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση, εμφανίζοντας παράλληλη δράση μοριακού συνοδού και κυτοκίνης (Asea, 2005).

Ως απόκριση σε θερμικό σοκ, η Hsp70 επάγεται και μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα και τους πυρηνίσκους (Welch and Feramisco, 1984). Η μετατόπιση αυτή πραγματοποιείται προκειμένου η Hsp70 να ρυθμίσει μονοπάτια που εμπλέκονται στην ποιότητα και την ακεραιότητα του DNA αλλά και των πυρηνίσκων υπό συνθήκες στρες (Kotoglou et al., 2009), γεγονός που καθιστά την Hsp70 ένα καίριο μόριο στο κύτταρο, καθώς οι πυρηνίσκοι αποτελούν βασικό συστατικό στοιχείο των ριβοσωμάτων, στα οποία πραγματοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση (Cooper and Hausman, 2007). Επιπλέον, υπάρχουν εκτεταμένες μελέτες που υποδηλώνουν μια πιθανή σχέση ανάμεσα στην υπερέκφραση της Hsp70 και την προστασία από βλάβες στο DNA, όπως σχάσεις μονής και διπλής έλικας, που προκαλούνται από διάφορα ερεθίσματα, όπως ακραίο θερμικό σοκ, απουσία οξυγόνου, βαρέα μέταλλα, UV ακτινοβολία, γ-ακτινοβολία και χημικές ενώσεις (Calini et al., 2003; Niu et al., 2006). Επίσης, ορισμένες ομάδες έχουν προσδώσει στην Hsp70 επιδιορθωτικό ρόλο στα συστήματα επιδιόρθωσης DNA. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η Hsp70 ενισχύει την επιδιόρθωση μέσω αποκοπής βάσεων (BER) σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα μετά από επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας (Bases, 2006), ενώ εμπλέκεται και στο μηχανισμό επαγωγής βλαβών στο DNA από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), με την Hsp70 να ρυθμίζει την ομοιόσταση ιόντων σιδήρου στο κύτταρο και να προστατεύει τις μεμβράνες των λυσοσωμάτων από την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες αποσταθεροποίηση, μέσω ρύθμισης των σχάσεων μονής αλυσίδας του DNA (Doulias et al., 2007).

Σε επίπεδο κυττάρων, η Hsp70 εμπλέκεται στην ογκογένεση (Jäätelä, 1995; Nylandsted et al., 2004; Jäätelä, 2004) και την κυτταρική επιβίωση μετά από ακραίο θερμικό στρες (Angelidis et al., 1991), ενώ η παρουσία της φαίνεται να προσδίδει ανθεκτικότητα στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο από απόπτωση ή νέκρωση (Samali and Cotter, 1996) μετά από διάφορα κασπάσο - εξαρτώμενα (Jäätelä et al., 1998; Xanthoudakis and Nicholson, 2000; Nylandsted et al., 2004) ή κασπάσο-ανεξάρτητα ερεθίσματα, όπως TNF, θερμικό στρες, αποστέρηση ορού ή οξειδωτικό στρες (Creagh et al., 2000; Gabai et al., 2000; Nylandsted et al., 2004), εμφανίζοντας αντιφλεγμονώδη δράση (Gutierrez et al., 2008). Επιπλέον, η παρουσία της Hsp70 προσδίδει θερμοανθεκτικότητα (Li and Werb, 1982; Li et al., 1991; Angelidis et al., 1991; Angelidis et al., 1999) και προστασία των κυττάρων του μυοκαρδίου από ισχαιμικό σοκ (Plumier et al., 1995; Angelidis et al., 1999).

Η δράση της Hsp70 σχετίζεται συχνά με την προστασία από διάφορες ασθένειες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακές παθήσεις (Plumier et al., 1995; Pockley et al., 2003), πνευμονοπάθειες (Ogawa et al., 2008), μυοπάθειες (Gehrig et al., 2012) και νευροεκφυλιστικές νόσους (Cummings et al.,

2001; Adachi et al., 2003). Η μείωση της έκφρασής της ενδέχεται να προστατεύει από διάφορα είδη καρκίνου (Mosser and Morimoto 2004), ενώ η ίδια η παρουσία της στα καρκινικά κύτταρα τα προστατεύει από βλάβες που μπορούν να προκληθούν από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, σταθεροποιώντας τα λυσοσώματα και παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική αυτοφαγία (Horvath et al., 2008; Horvath and Vigh, 2010).

1.3. Βλάβες στο DNA και παράγοντες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωσή του

Οι βλάβες στο DNA είναι το αποτέλεσμα της δράσης εξωγενών παραγόντων και ενδογενών μεταβολικών διεργασιών. Η φύση έχει εφεύρει πολλαπλές στρατηγικές για τη διαφύλαξη της γενετικής πληροφορίας με την ανάπτυξη ενδογενών μηχανισμών επιδιόρθωσης που στόχος τους είναι η αντιστροφή μιας σειράς βλαβών. Η αποτυχία αυτών των επιδιορθωτικών μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, πρόωρη γήρανση και καρκίνο (Germann et al., 2012).

Το DNA υφίσταται συνεχείς βλάβες. Οι βλάβες αυτές οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες, όπως χημικοί παράγοντες ή ιονίζουσα ακτινοβολία (Germann et al., 2012). Ένα ανθρώπινο κύτταρο πρέπει να επιδιορθώνει καθημερινά βλάβες στο DNA που φτάνουν τις 10000 και προέρχονται από ενδογενείς πηγές, όπως η αυθόρμητη υδρολυτική αποπουρίνωση που οφείλεται στο υδατικό περιβάλλον του DNA (Lindahl, 1993; Germann et al., 2012). Μια βλάβη στο DNA (π.χ. εξαλλαγή κάποιας αζωτούχου βάσης) μπορεί να είναι τοξική και να παρεμποδίσει την αντιγραφή και τη μεταγραφή, ή μπορεί να είναι μεταλλαξιγόνο και να οδηγήσει σε σφάλματα στο γενετικό κώδικα κατά την αντιγραφή (Verdine and Bruner, 1997). Η αποτυχία επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις, γενετική αστάθεια, πρόωμη γήρανση, νοητική υστέρηση ή άλλες αναπτυξιακές διαταραχές και καρκίνο (Germann et al., 2012).

Παρ'όλο που το DNA είναι ένα σχετικά αδρανές χημικά μόριο, ο τεράστιος αριθμός νουκλεοτιδίων σε ένα κύτταρο, της τάξης των 7×10^9 , καθιστά τη γενετική πληροφορία επιρρεπή σε γεγονότα που συμβαίνουν ακόμα και με πολύ μικρή συχνότητα (Germann et al., 2012). Ακόμα και το νερό μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA (Verdine and Bruner, 1997). Η αυθόρμητη αποπουρίνωση του DNA οδηγεί στη δημιουργία 2.000 – 10.000 θέσεων χωρίς βάσεις ανά κύτταρο ανά ημέρα (Lindahl, 1993). Για το λόγο αυτό ένα σύστημα επιδιόρθωσης είναι απαραίτητο για τη διαφύλαξη του DNA από την ενδογενή αστάθειά του και από τα παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. Οι βλάβες του DNA οδηγούν σε αλκυλίωση, σχηματισμό ογκωδών προϊόντων προσθήκης, απαμινίωση, σταυροσυνδέσεις, οξειδωση και σχάσεις των αλυσίδων (Germann et al., 2012).

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με διάφορα κυτταρικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένου του DNA, προκαλώντας καθημερινά έως και 10.000 βλάβες ανά κύτταρο, που μπορεί να οδηγήσουν στην αμφιμετατροπή $G \rightarrow T$ εάν δεν επιδιορθωθούν. Ο τύπος της βλάβης εξαρτάται από τη δραστηριότητα του είδους των ROS, με τις ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$) να συγκαταλέγονται στις πιο επιθετικές και να καταλήγουν σε πολλαπλές και μη ειδικές βλάβες (Germann et al., 2012).

Οι κυριότερες βλάβες που οφείλονται σε ενδογενείς κυτταρικές διαδικασίες (γνωστές και ως αυθόρμητες βλάβες (Billen, 1990)) είναι 5 τύπων και αφορούν:

α) την οξειδωση βάσεων και τη δημιουργία παρεμβολών στις αλυσίδες του DNA από τη δράση ROS,

β) την αλκυλίωση – κυρίως μεθυλίωση – βάσεων, με κύρια προϊόντα την 7 μέθυλο-γουανίνη και την 3 μέθυλο-αδενίνη, εκ των οποίων η πρώτη δεν αποτελεί απειλή στο κύτταρο, καθώς δε μεταβάλλει την ειδικότητα της βάσεως, ενώ η δεύτερη θεωρείται κυτταροτοξική, καθώς παρεμποδίζει την αντιγραφή,

γ) την υδρόλυση βάσεων που οδηγεί σε απαμίνωση, αποπουρίνωση και αποπυριμιδίνωση (Lindahl, 1993),

δ) το σχηματισμό ογκωδών προϊόντων προσθήκης λόγω έκθεσης σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), που οδηγούν σε καρκινογενέσεις (Veglia et al., 2003; Peluso et al., 2008) και

ε) το εσφαλμένο ταίριασμα των βάσεων, λόγω σφαλμάτων στην αντιγραφή κατά την οποία προστίθεται μια λανθασμένη βάση στη νεοσχηματιζόμενη αλυσίδα, παραλείπεται ή προστίθεται μια επιπλέον βάση (Hsieh and Yamane, 2008).

Οι βλάβες που προέρχονται από εξωγενείς παράγοντες εμφανίζονται με διάφορες μορφές. Ορισμένα παραδείγματα αυτών είναι: (α) οι σταυροσυνδέσεις μεταξύ γειτονικών κυτοσινών και θυμινών, δημιουργώντας διμερή πυριμιδινών, που συγκαταλέγονται στις άμεσες βλάβες και προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία και (β) σχάσεις μονής ή διπλής έλικας προερχόμενες από ιονίζουσα ακτινοβολία που οδηγούν σε σφάλματα αντιγραφής ή μεταγραφής (Vogiatzi and Claudio, 2010).

Θερμικό σοκ και DNA βλάβες: Η αυξημένη θερμοκρασία αποτελεί ένα παράγοντα που συνεχώς δημιουργεί βλάβες στο DNA. Οι κυριότερες από αυτές αφορούν:

α) αποπουρινώσεις,

β) σχάσεις μονής αλυσίδας,

γ) απαμινώσεις κυτοσίνης και

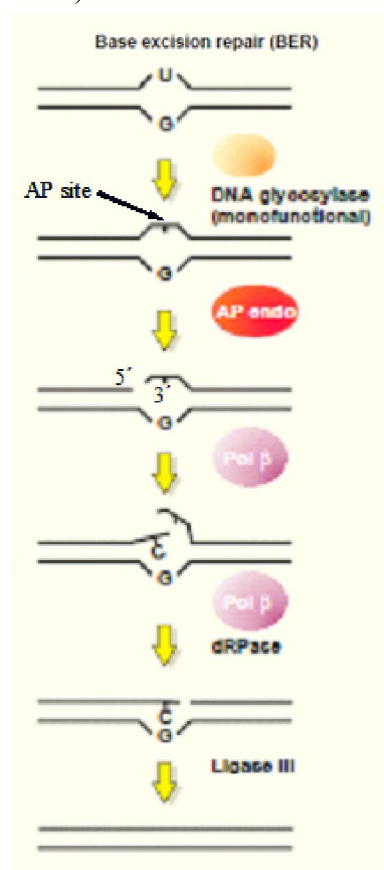
δ) σχηματισμό 7,8-διυδρο-οξογουανίνης από dGMP.

Παλαιότερα, πιστευότο ότι η αποπουρίνωση του DNA συνέβαινε μέσω όξινης υδρόλυσης, ενώ οι απαμινώσεις των κυτοσινών πραγματοποιούνταν μέσω αλκαλικής υδρόλυσης. Και οι δύο αντιδράσεις θεωρείτο ότι καταλύονταν από το νερό. Πιο πρόσφατα όμως, απεδείχθη ότι η θερμότητα δημιουργεί ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) μέσα σε υδατικά διαλύματα, οι οποίες οδηγούν και σε βλάβες στο DNA (Chernikov et al., 2007).

Δοξορουβικίνη και DNA βλάβες: Η δοξορουβικίνη αποτελεί ένα αντιβιοτικό ανθρακυκλίνης, ο μεταβολισμός του οποίου στα κύτταρα οδηγεί σε σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου, οι οποίες ταχύτατα γεννούν ROS. Με τον τρόπο αυτό η δοξορουβικίνη οδηγεί σε οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Palhano Fedato and Maistro, 2012) προκαλώντας σχάσεις μονής ή διπλής αλυσίδας. Στόχος της δοξορουβικίνης θεωρείται το ένζυμο τοποισομεράση II. Η παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου αυτού έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της επανασυγκόλλησης των αλυσίδων και συνεπώς το σχηματισμό σχάσεων στο DNA (Fornari et al., 1994).

Επιδιόρθωση DNA βλαβών: ο μηχανισμός BER: Δυνητικά, η πιο απλή προσέγγιση για την επιδιόρθωση μιας βλάβης στο DNA είναι η ευθεία αναστροφή της (Germann et al., 2012). Παρ' όλα αυτά κάτι τέτοιο δεν είναι πάντοτε δυνατό. Έτσι, υπάρχει ο μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής βάσεων (BER) που είναι διατηρημένος από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο. Ο μηχανισμός BER προορίζεται κυρίως για επιδιόρθωση βλαβών σε βάσεις (αλκυλίώσεις, οξειδώσεις, απώλειες βάσεων) και σχάσεις μονής αλυσίδας (Hegde et al., 2008).

Επιπλέον των βλαβών που έχουν ήδη αναφερθεί ότι επιδιορθώνονται από το μηχανισμό BER, ο τελευταίος είναι υπεύθυνος και για την επιδιόρθωση των οξειδωμένων βάσεων, αλλά και των σχάσεων των αλυσίδων του DNA που καταλήγουν σε μη συνδεδεμένα άκρα και οφείλονται στη δράση ROS (Hegde et al., 2008).



Εικόνα 1.10: Τα βασικά στάδια του μηχανισμού BER και τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτά (με τροποποιήσεις από Fleck and Nielsen, 2004)

χρησιμοποιούνται κατά τον παραπάνω μηχανισμό είναι διατηρημένα από την *E. coli* έως τα θηλαστικά (Hegde et al., 2008).

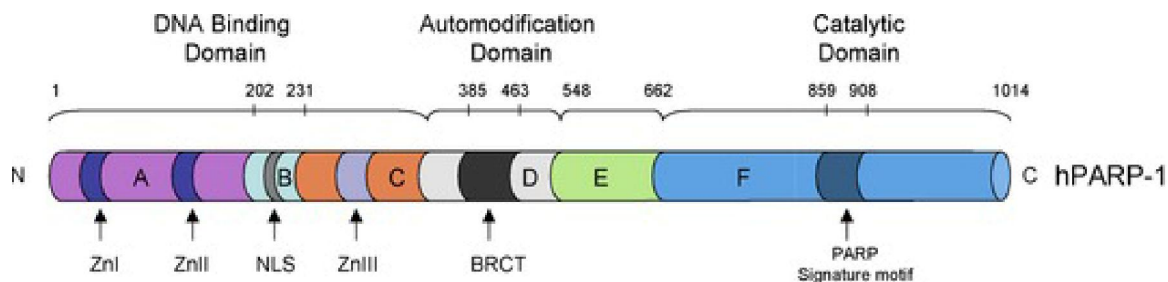
Παρά την παλιότερη άποψη ότι ο μηχανισμός BER είναι μια απλή διαδικασία στην οποία εμπλέκονται μόνο λίγες πρωτεΐνες, πιο πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν ένα πολύπλοκο μονοπάτι με αρκετά υπομονοπάτια (Hegde et al., 2008). Ο μηχανισμός BER απαιτεί τέσσερα διαφορετικά είδη ενζύμων για την επιδιόρθωση αβασικών θέσεων, ή βλαβών σε βάσεις (Εικόνα 1.10). Μια DNA γλυκοζυλάση, μια AP ενδοουκλεάση (APE), μια DNA πολυμεράση και μια DNA λιγάση (Mitra et al., 2001). Η διαδικασία ξεκινά με την αποκοπή μιας κατεστραμμένης βάσης από τη DNA γλυκοζυλάση. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται μια θέση χωρίς βάση, εξαιτίας της διάσπασης του N-γλυκοσιδικού δεσμού στην κατεστραμμένη περιοχή (Sakumi and Sekiguchi, 1990). Η APE διασπά την αβασική θέση σε ένα δεύτερο βήμα, για να δημιουργηθεί ένα 3'OH άκρο και ένα 5' φωσφορικό άκρο δεοξυριβόζης (dRP) (Doetsch and Cunningham, 1990). Η τρίτη κατά σειρά αντίδραση του μηχανισμού περιλαμβάνει την πλήρωση του κενού που προήλθε από την απομάκρυνση της κατεστραμμένης βάσης από τη DNA πολυμεράση. Στα θηλαστικά, η επιδιορθωτική

DNA πολυμεράση β έχει ενδογενή δράση dRP λυάσης (Matsumoto and Kim, 1995), η οποία διασπά το dRP κατάλοιπο προς δημιουργία 5' φωσφορικής ομάδας, ενώ η θηλιά που δημιουργείται από την ενσωμάτωση ενός μονονουκλεοτιδίου καλύπτεται από τη DNA λιγάση στο τελικό στάδιο. Τα ένζυμα που

Η πολυμεράση 1 της πολυ-ADP-ριβόζης (PARP-1): Οι πολυμεράσες των πολυ-ADP-ριβοζών (PARPs) αποτελούν μια οικογένεια πυρηνικών ενζύμων με 16 μέλη (Leung et al., 2011) που καταλύουν τη μεταφορά μορίων ADP-ριβόζης από β-νικοτιναμιδικά δινουκλεοτίδια αδενίνης (β -NAD⁺ ή NAD⁺) σε πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Οι βιολογικοί ρόλοι των πολυμερών της ADP-ριβόζης (PAR) και της πολυ-ADP-ριβοζυλίωσης των πρωτεϊνών είναι εκτεταμένοι (Banasik et al., 2012).

Μέσα στην οικογένεια των PARPs, οι PARP-1 και PARP-2 αποτελούν τα μοναδικά πυρηνικά μέλη που ενεργοποιούνται από βλάβες στο DNA. Η PARP-3 αλληλεπιδρά με την PARP-1 και το κεντρόσωμα. (Curtin, 2005).

Το πρώτο και καλύτερα μελετημένο μέλος της οικογένειας των PARPs, είναι η PARP-1 (D'Amours et al., 1999) που έχει ανακαλυφθεί για περισσότερο από 40 χρόνια (Chambon et al., 1963). Η PARP-1 είναι μια διατηρημένη πυρηνική



Εικόνα 1.11: Η δομή της εξαρτώμενης από βλάβες ανθρώπινης πρωτεΐνης PARP-1, με τις περιοχές πρόσδεσης DNA, αυτορρύθμισης και την καταλυτική περιοχή (περιοχές A – F). Η αλληλουχία υπογραφή της PARP (σκουρό μπλε) στην καταλυτική C-περιοχή είναι η πιο διατηρημένη στην οικογένεια των PARPs. Zn I, Zn II και Zn III: μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου. NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού. BRCT: καρβοξυ-τελική BRCA1 περιοχή (Mégnin-Chanet et al., 2010)

μεταλλοπρωτεΐνη ψευδαργύρου 113 kDa που λειτουργεί ως αισθητήρας θηλιών στο DNA και ως σηματοδοτικό μόριο. Αποτελείται από τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 1.11): μια N-τελική DNA προσδένουσα περιοχή που περιλαμβάνει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού, μια κεντρική περιοχή αυτορρύθμισης που περιλαμβάνει και μια BRCT περιοχή και μια C-τελική καταλυτική περιοχή. Η DNA προσδένουσα περιοχή περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (D'Amours et al., 1999) που διευκολύνουν την πρόσδεση σε σχάσεις τόσο μονής (Gradwohl et al., 1990), όσο και διπλής αλυσίδας (Banasik et al., 2012), ενώ ένα τρίτο μοτίβο δακτύλου ψευδαργύρου συντονίζει τη DNA εξαρτώμενη ενεργοποίηση του ενζύμου (Langelier et al., 2008). Η περιοχή αυτορρύθμισης είναι η θέση της αυτο-πολυ-ADP-ρυβοζυλίωσης και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις της PARP-1 με άλλες πρωτεΐνες που φέρουν «φερμουάρ» λευκίνης (leucine zipper) (D'Amours et al., 1999). Η καταλυτική περιοχή του ενζύμου προσδένει NAD^+ . Με την πρόσδεση του NAD^+ , η ADP ριβόζη μεταφέρεται επανειλημμένα από το υπόστρωμά της NAD^+ στην περιοχή αυτορρύθμισης της PARP-1 και στις ουρές των ιστονών H1 και H2B, σχηματίζοντας γραμμικές και διακλαδιζόμενες αλυσίδες πολυ-ADP-ριβόζης (Leung et al., 2011).

Ο λειτουργικός ρόλος της PARP-1 ρυθμίζεται κυρίως από την ενεργοποίησή της μετά από πρόσδεση σε βλάβη του DNA. Αμέσως μετά την πρόσδεση της PARP-1 η δραστηριότητά της αυξάνει ραγδαία (Banasik et al., 2012) (εώς και εκατοντάδες φορές) ως απόκριση στην ανίχνευση σχάσεων μονής αλυσίδας στο DNA (Leung et al., 2011) και διασπά το NAD^+ σε ADP-ριβόζη και νικοτιναμίδιο (Banasik et al., 2012).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες ήπιου στρες, η PARP-1 λειτουργεί ως αμυντικός μηχανισμός (Banasik et al., 2012), εντοπίζοντας βλάβες στο DNA και θηλιές (Kauppinen 2007), που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της συνεχούς προσβολής του DNA από ROS που προκύπτουν κατά την αερόβια αναπνοή. Η PARP-1 εμπλέκεται και στο μηχανισμό BER και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής (Banasik et al., 2012). Σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως ισχαιμικά επεισόδια και φλεγμονές που προκαλούν βλάβες στο DNA, υπερενεργοποιείται η PARP-1, οδηγώντας το κύτταρο σε ενεργειακή κρίση εξαιτίας της ταχείας εξάλειψης της NAD^+ και σε τελικό στάδιο του ATP (Virág and Szabó, 2002; Skaper, 2003; Jagtap and Szabó, 2005; Koh et al., 2005; Altmeyer and Hottiger, 2009). Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα των PAR, μπορεί να μεταβάλλουν τη μιτοχονδριακή περατότητα, οδηγώντας σε απελευθέρωση του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης AIF από τα μιτοχόνδρια. Η μετατόπιση του AIF στον πυρήνα μπορεί να ενεργοποιήσει τον κασπασο-ανεξάρτητο κυτταρικό θάνατο (Andrabi et al., 2008).

Η παρεμπόδιση της PARP-1 έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει αυτά τα φαινόμενα (Strosznajder et al., 2005; Strosznajder and Gajkowska, 2006), καθώς και αυτά που προκύπτουν από χημικές προσβολές που δρουν μέσα από ελεύθερες ρίζες (Banasik et al., 2011).

Οι λειτουργίες της PARP-1 αποκαλύφθηκαν κυρίως μετά από πειράματα παρεμπόδισης της δράσης της (Banasik et al., 2012). Η εμπλοκή της σε διάφορες ασθένειες αναφέρεται παρακάτω.

Έχει βρεθεί ότι η PARP-1 ενεργοποιείται από τις σχάσεις του DNA και συμμετέχει στην επιδιόρθωση μονής αλυσίδας βλαβών μέσω του μηχανισμού αποκοπής βάσεων (Schreiber et al., 2002). Οι θηλιές μονής αλυσίδας στο DNA αποτελούν επίσης ένα ερέθισμα ενεργοποίησης του ενζύμου (D'Silva et al., 1999). Η αυτο-πολυ-ADP ριβοζυλίωση της PARP-1 που αναφέρθηκε πιο πριν δημιουργεί μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή που ρυθμίζει τη συγκρότηση των πρωτεϊνών του μηχανισμού BER, συμπεριλαμβανομένων της XRCC1, της DNA πολυμεράσης β και της DNA λιγάσης III. Ακολουθεί η αποκόλληση της PARP-1 από το DNA (Leung et al., 2011) και οι αλυσίδες πολυ-ADP ριβόζης αποικοδομούνται από την γλυκο-υδρολάση της πολυ-ADP ριβόζης (PARG) και πιθανά και από την υδρολάση της ADP-ριβόζης ARH3 (Oka et al., 2006), μετά από τη συνδεδεση της σχάσης του DNA (Leung et al., 2011).

Επιπρόσθετα του ρόλου της PARP-1 στην ανίχνευση DNA βλαβών, μπορεί να δράσει και κατά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσα από διάφορους επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως ο έλεγχος της συμπύκνωσης της χρωματίνης, η μεθυλίωση του DNA και η ρύθμιση μεταγραφικών καταστολέων – ενισχυτών (Kraus, 2008; Caiafa et al., 2009).

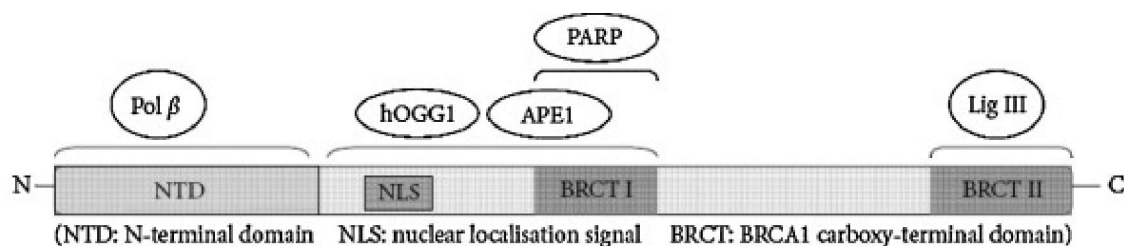
Παρ' όλο που η PARP-1 διαδραματίζει ένα καίριο ρόλο στην επιδιόρθωση των μονής αλυσίδας σχάσεων του DNA, υπάρχουν και άλλα μόρια της οικογένειας των PARP που δύνανται να επιτελέσουν το έργο της κατά την επιδιόρθωση του DNA, με σαφώς χαμηλότερους όμως ρυθμούς. Παρακλινικές μελέτες έδειξαν ότι ποντίκια που φέρουν αποσιώπηση της PARP-1, έχουν ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών που υφίσταται το DNA τους χωρίς μάλιστα να αφήνουν βλάβες που να μην επιδιορθώνουν (Shall and de Murcia, 2000). Επιπλέον, τα ποντίκια αυτά παραμένουν βιώσιμα και γόνιμα (Masutani et al., 1999). Ωστόσο, έχουν γενικά αυξημένη ευαισθησία (Wang et al., 1997). Χαρακτηριστικό των παραπάνω αποτελεί το γεγονός ότι απουσία της PARP-1 επιστρατεύονται άλλοι μηχανισμοί για τη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη μετατροπή των σχάσεων μονής αλυσίδας σε διπλής κατά την S-φάση του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα με αποσιώπηση της PARP-1 (Leung et al., 2011).

Παρ' όλο που η PARP-1 δεν θεωρείται καίριο μόριο για την επιβίωση, μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση (Simbulan-Rosenthal et al., 1998; Scovassi and Poirier, 1999; Chiarugi, 2002). Όπως αναφέρθηκε, η ενεργοποίηση της PARP-1 προωθεί την απελευθέρωση της μιτοχονδριακής προαποπτωτικής πρωτεΐνης AIF, η οποία ξεκινά τον κασπασο-ανεξάρτητο κυτταρικό θάνατο (Yu et al., 2002).

XRCC1: Η ανθρώπινη XRCC1 κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές τις δεκαετίας του '90 (Caldecott, 2003). Το γονίδιο της εδράζεται στο 19q13.2 χρωμόσωμα (Mohrenweiser et al., 1989; Sterpone and Cozzi, 2010) και αποτελείται από 17 εξόνια (Lamerdin et al., 1995). Αποτελεί μια πρωτεΐνη «σκαλωσιά» 70 kDa (Ginsberg et al., 2011), το σημαντικότερο στοιχείο της οποίας είναι η ικανότητά της να αλληλεπιδρά με άλλες DNA επιδιορθωτικές πρωτεΐνες, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που διευκολύνει τις διεργασίες του μηχανισμού BER, ή του μηχανισμού

SSBR (Caldecott et al., 1996; Caldecott, 2003; Ellenberger and Tomkinson, 2008). Παρ' όλο που η ίδια δεν διαθέτει κάποια γνωστή ενζυμική δραστικότητα, αλληλεπιδρά με ένζυμα από κάθε στάδιο του επιδιορθωτικού μηχανισμού σχάσεων του DNA (Caldecott, 2003). Επιπλέον, προσδένεται απευθείας τόσο στα κενά, όσο και σε θηλιές μονής αλυσίδας DNA στα οποία προσκολλάται η DNA pol β (Marintchev et al., 1999), υποδεικνύοντας ότι μπορεί να εμπλέκεται ανεξάρτητα στην αναγνώριση βλαβών στο DNA (Duarte et al., 2005).

Η XRCC1 εκφράζεται σε μεγάλα ποσά στους ιστούς, χωρίς όμως να έχει ομοιομορφία στην έκφραση (Walter et al., 1994). Ειδικά στα πρωτεύοντα, εκφράζεται σε μεγάλα ποσοστά στους όρχεις και ακολουθούν με σειρά ελάσσωνος έκφρασης οι ωοθήκες, ο εγκέφαλος, το συκώτι, οι νεφροί, η καρδιά, οι λεμφαδένες, οι πνεύμονες, ενώ η χαμηλότερη έκφραση εμφανίζεται στο σπλήνα (Zhou and Walter, 1995). Η υψηλή έκφραση της XRCC1 στις γονάδες συνάδει με ένα καίριο ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και στη διασφάλιση του εκμαγείου κατά τη μείωση (Ginsberg et al., 2011).



Εικόνα 1.12: Οι περιοχές της ανθρώπινης XRCC1 και οι θέσεις πρόσδεσης σε αυτή των υπόλοιπων μορίων του μηχανισμού BER (Ginsberg et al., 2011).

Η XRCC1 αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές (Εικόνα 1.12), σε καθεμία από τις οποίες προσδένονται διαφορετικοί συνεργάτες της κατά τα διάφορα στάδια επιδιόρθωσης βλαβών. Έτσι, αποτελείται από μια N-τελική περιοχή, μια ενδιάμεση περιοχή όπου περιέχονται ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και η C-περιοχή ομολογίας προς την πρωτεΐνη επιδεκτικότητας για τον καρκίνο του μαστού 1 (BRCT I domain) και μια C-τελική BRCT II περιοχή. Οι περιοχές BRCT I και II είναι όμοιες με αυτές του γονιδίου του καρκίνου του μαστού 1 (BRCA1) (Taylor et al., 2002; Ginsberg et al., 2011).

Η XRCC1, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συνεργάζεται με πολλά επιδιορθωτικά μόρια του DNA, τα οποία προσδένονται στις διάφορες περιοχές του μορίου. Συγκεκριμένα, η DNA pol β προσδένεται στη N-τελική περιοχή, η ανθρώπινη DNA γλυκοζυλάση hOGG1 και η APE1 συνδέονται στην ενδιάμεση περιοχή, όπως και η PARP-1, η οποία όμως προσδένεται συγκεκριμένα στην BRCT I περιοχή της XRCC1. Τέλος, η DNA λιγάση III προσδένεται στην BRCT II περιοχή (Ginsberg et al., 2011).

Η πρόσκαιρη πρόσδεση της PARP-1 σε σχάσεις του DNA μπορεί να εξυπηρετήσει ένα ρόλο σηματοδότησης της εκκίνησης των επιδιορθωτικών διεργασιών στρατολογώντας άλλες πρωτεΐνες (de Murcia and Ménissier de Murcia, 1994). Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η XRCC1 αλληλεπιδρά με την PARP-1 (Caldecott et al., 1996; Masson et al., 1998) και την PARP-2 (Schreiber et al., 2002), παρουσιάζοντας προτίμηση στην αυτοριβοζυλιωμένη μορφή τους (Masson et al., 1998). Μια πιθανή εξήγηση για την ικανότητα της XRCC1 να αναγνωρίζει μεταξύ των ενεργών και ανενεργών PARPs έδωσε η ανακάλυψη ότι η BRCT I περιοχή της XRCC1 που προσδένει τις PARP-1 και PARP-2 περιέχει ένα

εκφυλισμένο μοτίβο συγκατάβασης 20 αμινοξέων για την αλληλεπίδραση με την PAR (Pleschke et al., 2000). Η XRCC1 συγκεντρώνεται ακαριαία σε διακριτές πυρηνικές εστίες μετά από επίδραση με H_2O_2 , οι οποίες συνεντοπίζονται εκτεταμένα με τις περιοχές σύνθεσης της PAR. Η εμφάνιση των εστιών της XRCC1 κορυφώνεται λίγο μετά την κορύφωση σύνθεσης της PAR, υποδεικνύοντας ότι η πρότερη στρατολογείται από την PARP-1. Επιπλέον, δεν εμφανίζονται εστίες της XRCC1 σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) στους οποίους έχει αποσιωπηθεί η PARP-1, επιβεβαιώνοντας ότι η δημιουργία εστιών απαιτεί την παρουσία της PARP-1 (Caldecott, 2003).

Το 1996 η $pol\ \beta$ αναγνωρίστηκε ως συνεργάτης της XRCC1 από δύο ομάδες (Caldecott et al., 1996; Kubota et al., 1996). Αυτή η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα στην περιοχή παλάμης-αντίχειρα (palm-thumb) του ενεργού κέντρου της πολυμεράσης και την αμινοτελική περιοχή (NTD) της XRCC1 (Marintchev et al., 1999; Marintchev et al., 2000; Marintchev et al., 2003). Ένας συνδυασμός βιοχημικών πειραμάτων και μοριακών μοντέλων βασισμένων στις δομές αυτές, έδειξε ότι η NTD μπορεί να προσδένει ταυτόχρονα DNA και τις περιοχές παλάμης-αντίχειρα της $pol\beta$ (Rice, 1999). Κατά αυτό τον τρόπο, το σύμπλοκο XRCC1- $Pol\beta$ μπορεί να περικυκλώσει ένα μόριο DNA στην περιοχή μιας σχάσης μονής αλυσίδας, προστατεύοντας ίσως την άθικτη αλυσίδα από νουκλεολυτικά ένζυμα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο σχηματισμό σχάσης διπλής αλυσίδας. Αυτή η αλληλεπίδραση θα μπορούσε να βοηθήσει επίσης τη συστράτευση της XRCC1 σε σχάσεις μονής αλυσίδας όπου έχει προσδεθεί η $Pol\beta$ ή αντίστροφα, τη συστράτευση της $Pol\beta$ σε σχάσεις μονής αλυσίδας όπου έχει προσδεθεί η XRCC1, αναλόγως του χρησιμοποιούμενου μονοπατιού (Caldecott, 2003).

Παρά την εμπλοκή της στο τελικό επιδιορθωτικό στάδιο, η DNA λιγάση III ήταν ο πρώτος συνεργάτης της XRCC1 που αποκαλύφθηκε (Caldecott et al., 1994). Η αλληλεπίδραση μεταξύ λιγάσης 3α και XRCC1 ρυθμίζεται από τις C-περιοχές τους (Nash et al., 1997), οι οποίες κωδικοποιούν αμφότερες μια BRCT περιοχή. Η XRCC1 φαίνεται να απαιτείται για τη σταθερότητα της κυτταρικής Lig3α, παρεμποδίζοντας την αποδιάταξή της από το πρωτεόσωμα (Caldecott, 2003). Είναι πιθανό ότι εκτός από τη διατήρηση της σταθερότητας της Lig3α, μια σημαντική δραστηριότητα της αλληλεπίδρασης με την XRCC1 είναι η στόχευση της λιγάσης στις περιοχές των θραύσεων των αλυσίδων. Σε ενίσχυση αυτού, η αποσιώπηση ή μετάλλαξη της BRCT περιοχής της XRCC1 που προσδένει τη Lig3α παρεμποδίζει την ικανότητα της XRCC1 να διευκολύνει τη γρήγορη επανασύνδεση των κυτταρικών σχάσεων μονής αλυσίδας μετά από επώαση με αλκυλιωτικούς παράγοντες, ακόμη και αν τα επίπεδα της Lig3α αυξηθούν με αναστολές πρωτεασών (Moore et al., 2000).

Υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο ρύθμισης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από την XRCC1. Καθεμιά από τις αλληλεπιδράσεις που προαναφέρθηκαν αναγνωρίστηκαν σε κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί σε γενοτοξίνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές συμβαίνουν κατά συνεχή τρόπο ως ένα βαθμό, χωρίς όμως να αποκλείεται να ενεργοποιούνται από βλάβες στο DNA, καθώς στα κύτταρα δημιουργούνται συνεχώς σχάσεις μονής αλυσίδας. Είναι πιθανό η XRCC1 να αλληλεπιδρά με έναν ή όλους τους συνεργάτες της ως ένα βαθμό ανεξάρτητα από βλάβες στο DNA, όμως τα ποσοστά των συμπλόκων αυξάνουν σε περιπτώσεις εκτεταμένων βλαβών. Η αλληλεπίδραση της XRCC1 με τις PARP-1 και -2 σίγουρα ενεργοποιείται από βλάβες στο DNA, καθώς συμβαίνει κατά προτίμηση όταν σχηματίζονται τα αυτο-τροποποιούμενα ένζυμα στις σχάσεις. Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση της Lig3α με την XRCC1 είναι κατά κύριο λόγο συνεχής. Το γεγονός αυτό βασίζεται στην παρατηρημένη εξάρτηση κατά 80% ή

περισσότερο της Lig3α από την XRCC1 για τη σταθερότητά της, στο βαθμό που οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται στα ίδια κλάσματα και καθαρίζονται μαζί βιοχημικά (Caldecott, 2003).

Δεν είναι ακόμη γνωστό πως ρυθμίζονται οι υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις της XRCC1, αλλά είναι ξεκάθαρο ότι μόνο μικρά ποσά της κυτταρικής PNK και Polβ συνεντοπίζονται με την XRCC1 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από άθικτα κύτταρα (Caldecott, 2003). Υπάρχει ωστόσο ένα γενικά αποδεκτό μοντέλο που υποστηρίζει ότι η XRCC1 αλληλεπιδρά με τους συνεργάτες της κατά σειρά στην περιοχή της βλάβης (Caldecott, 2001; Whitehouse et al., 2001).

Ο βασικός ρόλος της XRCC1 στον επιδιορθωτικό μηχανισμό BER είναι δευτερεύουσας σημασίας, καθώς αποτελεί δευτερεύον στοιχείο προσκόλλησης το οποίο στρατολογείται στο χώρο του «μπαλώματος» μετά την αρχική εκτομή και εξυπηρετεί στη σταθεροποίηση των ενδιάμεσων DNA δομών, όπως οι αβασικές θέσεις. Επίσης, επιστρατεύει τα ένζυμα των ακόλουθων βημάτων. Συμπλέκεται όπως ήδη αναφέρθηκε με τις Polβ και Lig3 διευκολύνοντας εισαγωγή νέων νουκλεοτιδίων και καλύπτοντας την επισκευασμένη σχάση μέσα από τη δράση της λιγάσης 3 (Ginsberg et al., 2011).

Ένα βασικό ερώτημα σχετικά με τις επιδιορθωτικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από την XRCC1 είναι αυτό που αφορά την κατανομή τους στον κυτταρικό κύκλο. Σήμερα, είναι γνωστά τρία μονοπάτια για την επιδιόρθωση των σχάσεων μονής αλυσίδας. Το πρώτο είναι γνωστό ως ταχεία επιδιόρθωση σχάσεων μονής αλυσίδας εξαρτώμενης από την XRCC1. Το μονοπάτι αυτό φαίνεται να λειτουργεί καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ή τουλάχιστον κατά τη μεσόφαση. Η παρεμπόδιση του ταχέως μονοπατιού επιδιόρθωσης προς μεγάλη έκπληξη των ερευνητών δεν ευαισθητοποίησε τα κύτταρα σε αλκυλιωτικούς παράγοντες (Caldecott, 2003). Αυτό φαίνεται να συμβαίνει επειδή τα κύτταρα διαθέτουν και δεύτερο εξαρτώμενο από την XRCC1 μονοπάτι που δρα ειδικά κατά την S/G2 φάση και ρυθμίζεται από τη BRCT II περιοχή. Το μονοπάτι αυτό αφαιρεί τις εμμένουσες, μη επιδιορθωμένες βλάβες μόλις τα κύτταρα εισέλθουν στην S/G2 φάση. Και τα δύο αυτά μονοπάτια φαίνεται να αδρανοποιούνται από μεταλλάξεις στην κεντρική BRCT I περιοχή της XRCC1 (Taylor et al., 2002). Έτσι, φαίνεται ότι η BRCT I περιοχή αποτελεί μια κρίσιμη περιοχή για την κυτταρική επιβίωση μετά από επώαση με αλκυλιωτικούς παράγοντες ή H₂O₂. Ο κρίσιμος ρόλος της περιοχής ενισχύεται από το γεγονός ότι είναι η πιο διατηρημένη περιοχή της XRCC1. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η φύση του τελευταίου μονοπατιού, οι παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτό, αλλά και ο τρόπος που επηρεάζει η XRCC1 την επιδιόρθωση των σχάσεων μονής αλυσίδας, είναι εν πολλοίς άγνωστα. Ένα τρίτο μονοπάτι επιδιόρθωσης σχάσεων μονής αλυσίδας που υφίσταται, είναι ανεξάρτητο από τη δράση της XRCC1. Είναι όμως σχετικά αργό, και δεν μπορεί να αντισταθμίσει την απουσία των εξαρτώμενων από την XRCC1 διεργασιών (Caldecott, 2003).

1.4. Εμπλοκή της Hsp70 στις βλάβες του DNA και στην επιδιόρθωσή τους

Είναι γνωστός από χρόνια ο κυτταροπροστατευτικός ρόλος της Hsp70 (Mosser et al., 1997). Επίσης, υπάρχουν περιορισμένες μελέτες που υποστηρίζουν μια σχέση ανάμεσα στα επίπεδα της Hsp70 και τις βλάβες στο DNA. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες στο DNA (σχάσεις μονής-διπλής αλυσίδας) που προκαλούν ειδικές ακτινοβολίες, χημικές ενώσεις (βενζο-α-πυρένιο, παραπροϊόντα καύσης του άνθρακα), βαρέα μέταλλα (κάδμιο) και

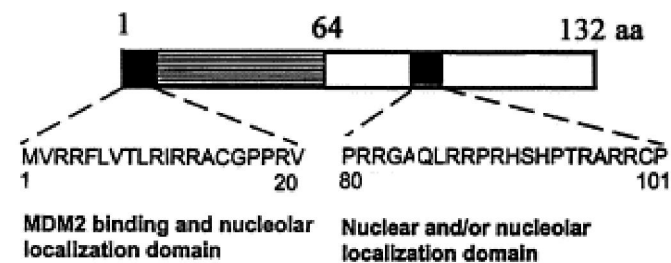
ROS (Xiao et al., 2002; Calini et al., 2003; Gao et al., 2004; Niu et al., 2006; Doulias et al., 2007; Pandita et al., 2009; Selim et al., 2012).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η Hsp70 εμπλέκεται σε συστήματα επιδιόρθωσης του DNA. Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι η Hsp70 βοηθά στην ενίσχυση του μηχανισμού BER μετά από επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας, θερμικού σοκ και χημικών ενώσεων (Kenny et al., 2001; Mendez et al., 2003α; Mendez et al., 2003β; Bases, 2005; Bases, 2006; Doulias et al., 2006; Kotoglou et al., 2009). Επιπρόσθετα, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο ρόλος της μετατόπισης της Hsp70 στους πυρηνίσκους μετά από στρες. Στην περίπτωση αυτή, η Hsp70 λειτουργεί ως φορέας επιτάχυνσης της διαδικασίας επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA από σχάσεις μονής έλικας, διευκολύνοντας τη δράση των διάφορων επιδιορθωτικών μορίων, μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασης με αυτά (Kotoglou et al., 2009)

Η συμμετοχή της Hsp70 τόσο στην προστασία από βλάβες στο DNA, όσο και στην επιδιόρθωση αυτών, την καθιστά ένα καίριο μόριο για την προστασία της πιστότητας της αντιγραφής και διατήρησης της ακεραιότητας του DNA ως φορέα της γενετικής πληροφορίας.

1.5. Η εμπλοκή των Hsp70/p14^{ARF}/β-κατενίνης σε αποπτωτικό κυτταρικό μηχανισμό μετά από οξειδωτικό και θερμικό στρες

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p14^{ARF}: Η πρωτεΐνη ARF, γνωστή και ως p14^{ARF}, αναγνωρίστηκε αρχικά ως εναλλακτικό μετάγραφο του γενετικού τόπου INK4b-ARF-



Εικόνα 1.13: Δομή της p14^{ARF}. Φαίνονται οι δύο περιοχές πυρηνισκινικού εντοπισμού στις N- και C-τελικές περιοχές. Η NoLS στη N-περιοχή συμπίπτει με την περιοχή πρόσδεσης της MDM2 (Hashemi et al., 2002- με τροποποιήσεις).

INK4a που εδράζεται στο χρωμόσωμα 9p21 του ανθρώπου (Ozenne et al., 2010). Είναι μια πρωτεΐνη με ογκοκατασταλτικές λειτουργίες, όπως αποδεικνύεται από τον επιρρεπή σε όγκους φαινότυπο των ποντικών με έλλειψη του ARF/INK4a γονιδίου (Kamijo et al., 1997; Sharpless et al., 2001). Ήδη από τις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους, τα αποσιωπημένα προς την ARF ποντίκια αναπτύσσουν κακο-

ήθεις όγκους (Kamijo et al., 1997).

Η βασική δομή της p14^{ARF} είναι ασυνήθιστη (Εικόνα 1.13) (Sherr, 2006). Αποτελείται από 132 αμινοξέα (Ozenne et al., 2010) και περιέχει πάνω από 20% κατάλοιπα αργινίνης που την καθιστούν εξαιρετικά βασική (Sherr, 2006) και υδρόφοβη. Παραδόξως, δεν περιέχει αναγνωρίσιμα δομικά μοτίβα (Ozenne et al., 2010). Προκειμένου να ολοκληρώσει την αναδίπλωση και να αποκτήσει ουδέτερο φορτίο σε φυσιολογικό pH, θα πρέπει να σχηματίσει σύμπλοκα με άλλα μόρια. Αυτό ίσως να εξηγεί τον συνεχώς αυξανόμενο αριθμό των συνεργατών της p14^{ARF} που ανακαλύπτονται (Sherr, 2006). Η πλήρης ARF εντοπίζεται κατά προτίμηση στους πυρηνίσκους, λόγω των πυρηνισκικών σημάτων εντοπισμού (NoLS) που φέρει (Ozenne et al., 2010). Συγκεκριμένα, η p14^{ARF} περιέχει δύο NoLS. Το πρώτο εδράζεται στο εξώνιο 1β και παίζει σημαντικό ρόλο στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της p14^{ARF}, καθώς η απαλοιφή του αναστέλλει την ικανότητα της p14^{ARF} να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο και να προσδεθεί με την Mdm2 (Rizos et al., 2000).

Το δεύτερο NoLS βρίσκεται στο εξώνιο 2 και σχετίζεται με την ικανότητα της p14^{ARF} να προωθεί τη σουμυλίωση των συνεργατών της και πιο συγκεκριμένα της Mdm2 (Xirodimas et al., 2002).

Η έκφραση της p14^{ARF} δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη, καθώς τα επίπεδα της δε μεταβάλλονται ιδιαίτερα και παραμένουν χαμηλά τόσο στα φυσιολογικά, όσο και σε γηρασμένα κύτταρα (Sharpless, 2004). Ωστόσο, η p14^{ARF} φαίνεται να είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του φαινότυπου γήρανσης που επάγεται από τον E2F1 (Dimgrt et al., 2000), υποδεικνύοντας ότι θα μπορούσε να παίζει κάποιο ρόλο σε ορισμένες μορφές γήρανσης που επάγονται από ογκογονίδια (Ozenne et al., 2010). Η ρύθμιση της p14^{ARF} επίσης δεν είναι πλήρως γνωστή. Είναι γνωστό ότι ο E2F1 αναστέλλει τη μεταγραφή της p14^{ARF}. Η έκφραση της p14^{ARF} δεν αυξάνεται μετά από έκθεση σε ακτινοβολία και γενετοξικά φάρμακα, ενώ η απώλειά της συνεισφέρει στην απόκριση σε βλάβες στο DNA (Sherr, 2006) αναστέλλοντας τη διαδικασία πολλαπλασιασμού στα κατεστραμμένα κύτταρα (Ozenne et al., 2010). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η έκφραση της ARF επάγεται μετά από ιική μόλυνση προς μείωση της ιικής μολυσματικότητας (García et al., 2006). Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις κατατάσσουν την ARF ως ένα γενικό αισθητήρα διάφορων τύπων κυτταρικού στρες. Ωστόσο, ο τρόπος ρύθμισης της ARF σε διάφορους τύπου στρες είναι επίσης άγνωστος (Ozenne et al., 2010). Παρά ταύτα, κατά την απόκριση σε ογκογονικό στρες, έχουν αναφερθεί ανεξάρτητοι από τη μεταγραφή μηχανισμοί ρύθμισης της ARF που περιλαμβάνουν την ουβικιτινύλωση και την αποικοδόμησή της (Chen et al., 2010).

Η p14^{ARF} είναι γενικά μια σταθερή πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται μεταξύ μιας και οκτώ ωρών (Ozenne et al., 2010). Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η αποικοδόμησή της εξαρτάται, εν μέρει τουλάχιστον, από το πρωτεόσωμα και παρά την έλλειψη λυσίνης, μπορεί να υποστεί N-τελική ουβικιτινύλωση ανεξάρτητα από την p53 και την MDM2 (Kuo et al., 2004; Pollice et al., 2008).

Μελέτες σχετικά με την υποκυτταρική εντόπιση της ARF δίνουν στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητά της. Η ARF είναι σταθερή όταν εκφράζεται μέσα στους πυρηνίσκους, αλλά αναγεννάται πιο γρήγορα στο πυρηνόπλασμα (Ozenne et al., 2010). Στους πυρηνίσκους, η ARF διατηρεί μια σταθερή δομή χάρη στην έγκλεισή της από τη νουκλεοφοσμίνη (NPM/B23) (den Besten et al., 2005) η οποία παρεμποδίζει την αποικοδόμησή της (Colombo et al., 2006).

Η απόκριση της ARF είναι αρκετά περίπλοκη. Παρόλο που ως πρωταρχικός ρόλος της ARF αναγνωρίστηκε η καταστολή της παρεκκλίνουσας κυτταρικής ανάπτυξης μέσω επαγωγής του μονοπατιού της p53 που ρυθμίζει την ογκοκαταστολή, υπάρχουν σήμερα και στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ARF εμφανίζει και p53-ανεξάρτητες λειτουργίες. (Ozenne et al., 2010).

Οι κύριες κυτταρικές λειτουργίες της ARF που σχετίζονται με την ογκοκαταστολή συνοπτικά αφορούν:

- α) τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης,
- β) τη βιογένεση των ριβοσωμάτων,
- γ) την απόκριση σε βλάβες του DNA και
- δ) την αυτοφαγία (Ozenne et al., 2010).

Πιο αναλυτικά, η ARF ως ογκοκαταστολέας, αποτελεί ένα βασικό ενεργοποιητή του μονοπατιού της p53. Συγκεκριμένα, σταματά την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση λόγω ογκογένεσης, ενεργοποιώντας την p53, η οποία ενεργοποιεί με τη σειρά της ενεργοποιητές της απόπτωσης και γονίδια αναστολής του κυτταρικού κύκλου (Ozenne et al., 2010).

Είναι γνωστό ότι η $p14^{ARF}$ μπορεί να σταματήσει τα κύτταρα στην S-φάση και/ή να ενεργοποιήσει την απόπτωση μέσω μηχανισμών που δεν απαιτούν την έκφραση της αγρίου τύπου p53 (Yarbrough et al., 2002). Επίσης, έχει αποδειχθεί, τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* συστήματα, ότι η $p14^{ARF}$ καταστέλλει την ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα στα οποία απουσιάζει η p53, επάγωντας μια αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση, ακολουθούμενη από απόπτωση (Ozenne et al., 2010). Επιπλέον, αρκετοί ερευνητές απέδειξαν ότι η ARF αλληλεπιδρά με τους Myc και E2F1, δύο παράγοντες που απαιτούνται για την συνέχιση του κυτταρικού κύκλου και ανταγωνίζεται τη μεταγραφική τους λειτουργία, ανεξάρτητα από την p53 (Sherr, 2006). Επειδή όμως οι Myc και E2F1 ενεργοποιούν την έκφραση της ARF έχουμε φαινόμενα μηχανισμών p53 ανεξάρτητης αρνητικής ανατροφοδότησης (Ozenne et al., 2010).

Στα πλαίσια του ογκοκατασταλτικού ρόλου της η ARF συνεισφέρει και στην απόκριση σε βλάβες στο DNA. Ποντίκια χωρίς ARF που έχουν εκτεθεί σε ιονίζουσα ακτινοβολία αναπτύσσουν πιο συχνά όγκους σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Kamijo et al., 1999). Επιπλέον, η ARF ενισχύει την επαγόμενη από βλάβες στο DNA απόπτωση μέσω της p53 (de Stanchina et al., 1998), ενώ οδηγεί στην p53 εξαρτώμενη παύση του κυτταρικού κύκλου (Khan et al., 2000). Τα παραπάνω υποστηρίζουν την ιδέα ότι η ARF διεγείρει μονοπάτια που είναι σημαντικά στη διατήρηση της γενωμικής ακεραιότητας και παίζει ρόλο στη γενωμική σταθερότητα (Ozenne et al., 2010).

Η ARF, πέραν των ογκοκατασταλτικών λειτουργιών της έχει και άλλες λειτουργίες. Μια από αυτές αφορά την προώθηση της αυτοφαγίας μέσω της μιτοχονδριακής μορφής της smARF. Η smARF συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια ως απόκριση στα μη φυσιολογικά σήματα πολλαπλασιασμού, αλλάζοντας το μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων. Έτσι, οδηγεί τα κύτταρα σε κασπασο-ανεξάρτητο αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο (Ozenne et al., 2010).

Η αδρανοποίηση του γενετικού τόπου INK4a/ARF αλλά και μεταλλάξεις στο εξόνιο 2 του γονιδίου που επηρεάζουν την $p14^{ARF}$, οδηγεί σε ογκογενέσεις εξαιτίας της αρδανοποίησης του ελέγχου του Rb/p53 μονοπατιού (Ozenne et al., 2010).

Επειδή τα φυσιολογικά επίπεδα της $p14^{ARF}$ είναι πολύ χαμηλά, η έκφρασή της σε ανθρώπινους καρκίνους έχει μελετηθεί κυρίως στο επίπεδο του mRNA (Ozenne et al., 2010). Η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της $p14^{ARF}$ φέρει την τυπική δομή νησίδας CpG των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας. Η μεθυλίωσή του μπορεί να μειορρυθμίσει την έκφραση της ARF (Robertson and Jones, 1998). Σε καρκίνους του μαστού, η ομόζυγη απαλοιφή, η απώλεια ετεροζυγωτίας και η υπερμεθυλίωση του υποκινητή θα μπορούσαν να εξηγήσουν τη μείωση του mRNA της $p14^{ARF}$ (Silva et al., 2001).

Η έκτροπη μεθυλίωση του υποκινητή της $p14^{ARF}$ σχετίζεται με μεταστάσεις στους λεμφικούς συνδέσμους, υψηλές συχνότητες ογκογένεσης σε καρκίνους του παχέως εντέρου (Lee et al., 2006) και με κακή πρόγνωση σε καρκινώματα του μαστού, του παχέως εντέρου και της ουροδόχου κύστης (Dominguez et al., 2003). Η έκφραση της $p14^{ARF}$ είναι ένας ανεξάρτητος δείκτης πρόβλεψης τόσο της επανεμφάνισης όσο και της επιβίωσης σε πλακώδεις καρκίνους της γλώσσας (Kwong et al., 2005).

Πολύ λίγες αναφορές υπάρχουν μέχρι σήμερα σχετικά με την εμπλοκή της $p14^{ARF}$ σε διάφορους τύπους στρες, μεταξύ των οποίων το οξειδωτικό και το θερμικό, παρ' όλο που η ARF δε φαίνεται να αποκρίνεται ιδιαίτερα σε βλάβες στο DNA (Sherr, 2000).

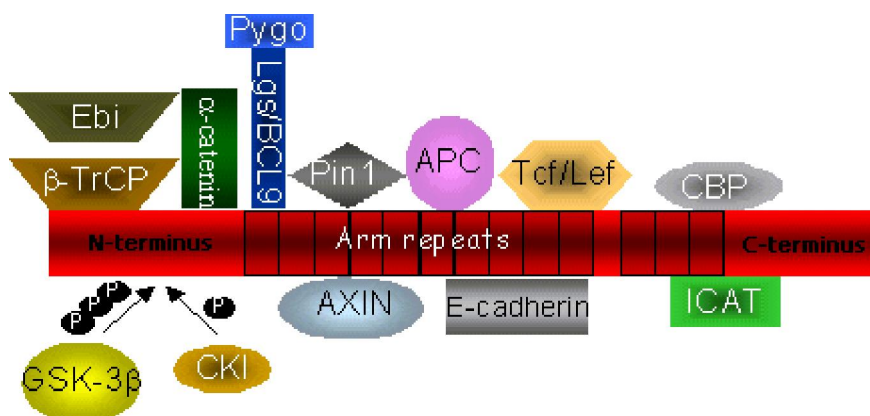
Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι η απόκριση των κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να επηρεαστεί από τα αποτελέσματα του οξειδωτικού

στρες στην $p14^{ARF}$. Τα αντικαρκινικά φάρμακα οδηγούν στην παραγωγή ROS. Φαίνεται ότι οι οξειδωτικοί παράγοντες όπως οι ROS σταθεροποιούν την ολιγομερή ενεργό μορφή της $p14^{ARF}$, αυξάνοντας τα ποσοστά της σε κύτταρα που επωάζονται με αυτούς. Η παρουσία αυτών των ολιγομερών μορφών παύει μόλις λίγα λεπτά μετά την απομάκρυνση του οξειδωτικού παράγοντα από τα κύτταρα (Menéndez et al., 2003). Από την άλλη, η απώλεια της $p14^{ARF}$, οδηγεί σε επιβίωση μετά από οξειδωτικό στρες, λόγω μη ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού (Damalas et al., 2011).

Έχει αποδειχθεί η συσχέτιση της $p14^{ARF}$ με την Hsp70. Η συνδυασμένη δράση των δύο πρωτεϊνών έγκειται στην ενίσχυση της ARF να μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια και να εκτελεί αυτοφαγικές λειτουργίες σε καρκίνους (Pimkina and Murphy, 2011).

Η $p14^{ARF}$ έχει ένα σημαντικότερο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Η πρωτεΐνη E1A του αδενοϊού και το ογκογονίδιο *myc* είναι ικανά να επάγουν τη ρυθμιζόμενη από την p53 απόπτωση, μια διαδικασία η οποία ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από την ARF. Η οδός του p53 λειτουργεί συνεπώς ως μια ασφαλιστική δικλείδα ενάντια στα ακατάλληλα σήματα υπερ-πολλαπλασιασμού. Εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (MEFs) οι οποίοι σχεδιάστηκαν ώστε να υπερεκφράζουν τους παράγοντες *myc*, E1A ή E2F-1 εμφανίζουν αυξημένη έκφραση της ARF και είναι επιρρεπείς σε απόπτωση (de Stanchina et al., 1998; Ivanchuk et al., 2001). Έχει αποδειχθεί ότι τα ποσοστά απόπτωσης σε κύτταρα λεμφώματος τα οποία έχουν χάσει και τα δύο αντίγραφα του γονιδίου *ARF* μειώνονται σημαντικά (Schmitt et al., 1999). Έτσι, η απενεργοποίηση του γονιδίου *INK4A/ARF* σε ανθρώπινους όγκους φαίνεται να οδηγεί στην επιβίωση και σε πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα των καρκινικών κυττάρων (Ivanchuk et al., 2001).

β-κατενίνη: Η β-κατενίνη είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως «πιλότος» κατά το σχηματισμό του εμβρύου, την οργανογένεση, τη δημιουργία και ρύθμιση των νευρωνικών συνάψεων, τη διατήρηση του επιθηλίου, την ανάπτυξη καρκίνου και την ομοιοστάση στους ενήλικες οργανισμούς (Fu et al., 2011; Tian et al., 2011; Maguschak and Ressler, 2012). Αρκετές από τις λειτουργίες της αυτές επιτυγχάνονται με τη συνεργασία της με την E-καδερίνη μέσω των μηχανισμών της επιθηλιακής προς μεσεγχευματική μετάβαση (EMT) και το αντίστροφο (MET) (Tian et al., 2011). Στους ανθρώπους η β-κατενίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *CTNNB1* που βρίσκεται στο 3p21 χρωμόσωμα (Kraus et al., 1994).



Εικόνα 1.14: Η β-κατενίνη και οι συνεργάτες της (Thorstensen and Lothe, 2003)

Η β-κατενίνη, μια πρωτεΐνη 781 αμινοξέων, ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών “armadillo”. Αποτελείται από τρεις περιοχές: μια N-τελική περιοχή, μια

κεντρική περιοχή και μια C-τελική περιοχή (Εικόνα 1.14). Στην κεντρική της περιοχή φέρει τη 42 αμινοξέων 12 Apm επαναλαμβανόμενη περιοχή (Pokutta and Weiss, 2007), η οποία εξειδικεύεται στις διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Jamieson et al., 2012). Η β-κατενίνη είναι μια υπομονάδα του πρωτεϊνικού συμπλόκου των καδερινινών που βοηθά στις διακυτταρικές συνδέσεις και εμπλέκεται στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt (MacDonald et al., 2009; Fu et al., 2011).

Η β-κατενίνη είναι μέλος του συμπλόκου των πρωτεϊνών που περιέχουν συνδέσμους προσκόλλησης (AJs) (Jamieson et al., 2012). Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης είναι απαραίτητοι για τη δημιουργία και διατήρηση των επιθηλιακών κυτταρικών στρωμάτων, ρυθμίζοντας την κυτταρική ανάπτυξη και την προσκόλληση μεταξύ κυττάρων (Yap et al., 1997). Η β-κατενίνη προσδένεται επίσης στον κυτταροσκελετό ακτίνης (Drees et al., 2005) και ενδέχεται να είναι υπεύθυνη για τη μετάδοση του σήματος αναστολής επαφής (Caveda et al., 1996), το οποίο προκαλεί την αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων μόλις ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του επιθηλίου (Kim et al., 2009β).

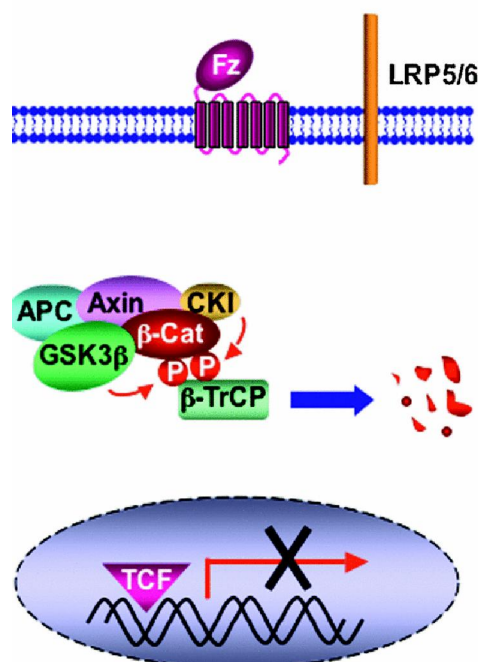
Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η β-κατενίνη παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες πτυχές της βιολογίας του ήπατος, όπως η ανάπτυξή του (τόσο εμβρυική όσο και μετέπειτα), η αναγέννησή του μετά από μερική εκτομή και η παθογένειά του σε περιπτώσεις καρκίνου (Thompson and Monga, 2007). Επιπλέον, μέσω του Wnt μονοπατιού, η β-κατενίνη βοηθά στη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων ή των iPS και στη διαδικασία επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων (Miki et al., 2011)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η β-κατενίνη αποτελεί τμήμα του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt (Εικόνα 1.15). Το μονοπάτι Wnt ενεργοποιείται με την πρόσδεση των Wnt πρωτεϊνών με τους υποδοχείς τους. Οι πρώτοι υποδοχείς που ανακαλύφθηκαν ήταν οι “frizzled” πρωτεΐνες (Fz) (He et al., 2004). Τότε, ο υποδοχέας του “dishevelled” (Dsh) επιστρατεύεται στη μεμβράνη. Η δράση της GSK3β αναστέλλεται από την ενεργοποίηση της Dsh από τη Fz (Magushak and Ressler, 2012). Εξαιτίας αυτού, η ποσότητα της β-κατενίνης αυξάνεται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζεται ακολούθως στον πυρήνα. Εκεί, μπορεί να δράσει σε συνδυασμό με τους παράγοντες TCF-1 και LEF-1, -3 και -4 (Fu et al., 2011), προς διαφοροποίηση διάφορων γονιδίων καρκινωμάτων. Ο ρόλος της στην περίπτωση αυτή δεν είναι ξεκάθαρος εάν οδηγεί στον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, δεδομένου του γεγονότος ότι μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι η δράση της β-κατενίνης οδηγούσε στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Widlund et al., 2002), ενώ πιο πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν το αντίθετο (Chien et al., 2009; Lucero et al., 2010).

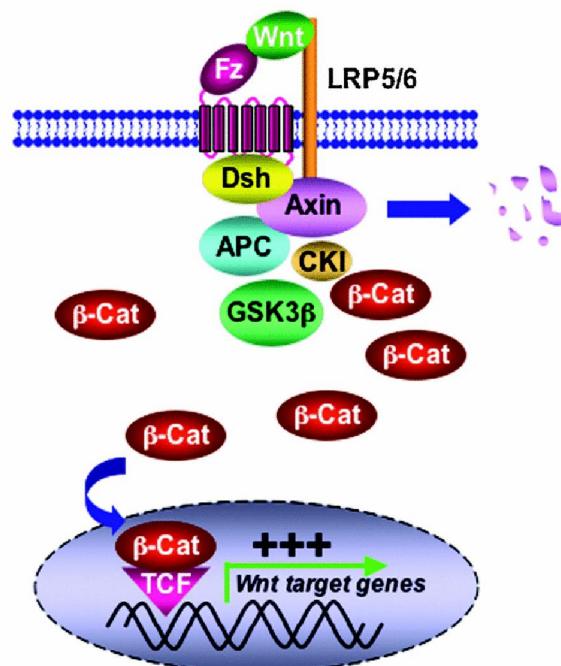
Απουσία του Wnt, η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται προαιρετικά από τη CK1α, πριν από την περαιτέρω φωσφορυλίωσή της από την κινάση GSK3β (Fu et al., 2011). Το σύμπλοκο συμπληρώνεται από την αξίνη, μια πρωτεΐνη ικρίωμα που συμπλέκεται με τη GSK3β και την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη APC, σχηματίζοντας ένα αποικοδομητικό σύμπλοκο (Hart et al., 1998). Η δημιουργία του παραπάνω συμπλόκου βοηθά στην εξαρτώμενη από την ουβικιτίνη πρωτεόλυση της β-κατενίνης, σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη β-TrCP, προκειμένου να διατηρηθούν χαμηλά τα ποσοστά της στο κυτταρόπλασμα (Hart et al., 1999).

Η β-κατενίνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί και από άλλες κινάσες όπως η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία παρεμποδίζει την ουβικιτυνυλίωσή της. Η μειωμένη ουβικιτυνυλίωση σχετίζεται με τη μειωμένη αποικοδόμησή της από το πρωτεόσωμα, που οδηγεί σε αύξηση της ποσότητάς της στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (Hino et al., 2005).

A- No canonical Wnt signal



B- Canonical Wnt signal



Εικόνα 1.15: Απλοποιημένη παράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt (He 2003- με τροποποιήσεις)

Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις της β-κατενίνης με άλλες πρωτεΐνες. Στο εσωτερικό των κυττάρων η β-κατενίνη μπορεί να βρεθεί συμπλεγμένη με καδερίνες, μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες (Zhurinsky et al., 2000). Η ικανότητα πρόσδεσης της β-κατενίνης με τους συνεργάτες της ρυθμίζεται από κινάσες της τυροσίνης (Lilien and Balsamo, 2005) και της σερίνης, όπως η GSK-3 (Castellone et al., 2005).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β-κατενίνη μπορεί να λειτουργήσει και ως ογκογονίδιο (Wang et al., 2008). Μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού ή η αυξημένη έκφραση της β-κατενίνης συναντώνται σε καρκίνους του παχέως εντέρου (Morin et al., 1997), των ωοθηκών (Davies et al., 1998), πιλοματριχώματος (Gat et al., 1998) και μεδουλοβλαστώματος (Zurawel et al., 1998). Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν την εμπλοκή της β-κατενίνης στην παθογένεια του καρκίνου του ήπατος (Thompson and Monga, 2007). Σε άτομα με καρκίνωμα των βασικών κυττάρων, έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή β-κατενίνης που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των σχετικών όγκων (Saldanha et al., 2004).

Η εμπλοκή της β-κατενίνης στην παθογένεια του καρκίνου, έχει να κάνει κυρίως με τη συσχέτισή της με το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt. Πιο συγκεκριμένα, η β-κατενίνη εμπλέκεται σε ένα κληρονομίσιμο σύνδρομο καρκίνου που καλείται οικογενής αδενωματώδης πολύπωση (FAP). Το σύνδρομο αυτό προκαλείται από μετάλλαξη στην πρωτεΐνη APC που προσδέεται με την β-κατενίνη. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε σχηματισμό πολυπόδων ορισμένοι από τους οποίους βαίνουν προς κακοήγη αδενοκαρκινώματα. Επιπλέον, η απενεργοποίηση λόγω μετάλλαξης του APC οδηγεί στην ακατάλληλη σταθεροποίηση της β-κατενίνης (Clevers, 2006). Πράγματι, κατασκευές που φέρουν το γονίδιο αναφοράς *Tcf*, το οποίο μεταγράφεται μόνο με την ενεργοποίηση του Wnt, φαίνονται να μεταγράφονται σε καρκινικά

κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *APC*, μέσω της συνεχούς δράσης των συμπλόκων ανάμεσα στη β-κατενίνη και το μέλος της TCF οικογένειας Tcf4 που εκφράζεται στο έντερο (Korinek et al., 1997). Σε σπάνιες περιπτώσεις καρκίνου του παχέως εντέρου όπου το *APC* δεν φέρει μεταλλάξεις, σημειακές μεταλλάξεις στη β-κατενίνη αφαιρούν το μοτίβο καταστροφής Ser/Thr που φέρει στο N-τελικό άκρο της (Clevers, 2006).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt δεν περιορίζονται μόνο στον καρκίνο του εντέρου. Χαρακτηριστικά, ογκογόνες μεταλλάξεις της β-κατενίνης πραγματοποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία συμπαγών όγκων, όπως του δέρματος ή του αιμοποιητικού συστήματος (Reya and Clevers, 2005).

Πρόσφατα, οι έρευνες έχουν στραφεί στις ικανότητες της β-κατενίνης να ρυθμίζει τα μονοπάτια της ενδοθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάπτωση και της μεσεγχυματικής προς ενδοθηλιακή μετάπτωση, δύο μονοπάτια που διασφαλίζουν τη βιωσιμότητα και μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων. Φαίνεται ότι η β-κατενίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσο για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Fu et al., 2011).

Ενώ πρόσφατα έχει μελετηθεί αρκετά η εμπλοκή της β-κατενίνης στο οξειδωτικό στρες, πολύ λίγες πληροφορίες είναι γνωστές μέχρι σήμερα για την εμπλοκή και την απόκρισή της σε θερμικό στρες.

Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το θερμικό στρες μπορεί να διαταρράξει τις διακυτταρικές συνδέσεις, προκαλώντας μείωση στην έκφραση της β-κατενίνης. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα Sertoli, που είναι υπεύθυνα για τη σπερματογένεση, ήπιο θερμικό στρες στους 43° C προκαλεί σημαντική μείωση στην έκφραση της β-κατενίνης και των υπόλοιπων μορίων που εμπλέκονται στους συνδέσμους προσκόλλησης. Αρχικά παρατηρείται μια μείωση στα ποσοστά του mRNA της β-κατενίνης στις 12 έως 24 ώρες μετά το θερμικό σοκ, ακολουθούμενη από μείωση και στην έκφραση της πρωτεΐνης 12 έως 24 ώρες αργότερα, δηλαδή 24 έως 48 ώρες μετά το θερμικό σοκ. Τα ποσοστά της πρωτεΐνης φάνηκαν να επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα 72 ώρες μετά το πέρας του θερμικού σοκ (Chen et al., 2008).

Ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR), μια σημαντική πρωτεΐνη για τη σπερματογένεση, φαίνεται να έχει ευεργετικές επιδράσεις στα επίπεδα της β-κατενίνης μετά από θερμικό σοκ, καθώς η υπερέκφρασή της δεν επιτρέπει τη μείωση των επιπέδων της β-κατενίνης μετά από θερμικό σοκ, ενώ η διαμόλυνση των κυττάρων με αδενοϊό που φέρει τον υποδοχέα AR οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της β-κατενίνης (Chen et al., 2008).

Σε σχέση με το οξειδωτικό στρες, η β-κατενίνη ενεπλάκη ως ένα ζωτικό μόριο στην άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες δρώντας ως συμπαράγοντα του μεταγραφικού παράγοντα FOXO. Με τον τρόπο αυτό, προστατεύει τα οστά από την απώλεια οστικής μάζας ως αποτέλεσμα αυξημένου οξειδωτικού στρες λόγω ROS που παράγονται με την πάροδο της ηλικίας. Επιπλέον, η ανταγωνιστική δράση του οξειδωτικού στρες στη δράση της β-κατενίνης μέσα στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, μπορεί να συνεισφέρει στη δημιουργία ασθενειών και παθήσεων που εμφανίζονται με την ηλικία όπως οστεοπόρωση, υπερλιπιδαιμία, στεφανιαία νόσο και ανοχή στην ινσουλίνη (Manolagas and Almeida, 2007). Αξιοσημείωτη είναι η εξελικτική διατήρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ β-κατενίνης και FOXO (Essers et al., 2005). Επιπλέον, η β-κατενίνη ρυθμίζει αρκετά καίρια μόρια που ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ (Thompson and Monga, 2007). Παρά τα παραπάνω, ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρούν οι ROS πάνω στη β-κατενίνη είναι ακόμη άγνωστος καθώς

υπάρχουν πολλές αντιφατικές αναφορές πάνω στο θέμα (Hoogeboom and Burgering, 2009).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία που να συνδέουν απευθείας τη β-κατενίνη με τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η μειωμένη έκφραση της β-κατενίνης οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση, όπως φάνηκε σε ασθενείς με καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος, όπου τα περιστατικά με μειωμένη έκφραση β-κατενίνης εμφανίζουν διπλάσια ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τους ασθενείς που εμφανίζουν φυσιολογική έκφραση. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο *APC*, σε συνδυασμό με πυρηνική εντόπιση της β-κατενίνης, οδηγούν σε υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (Kastritis et al., 2009).

Σε ενίσχυση όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει βρεθεί ότι η μειορρύθμιση της β-κατενίνης μέσω siRNA τεχνολογίας σε κύτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος είχε ως αποτέλεσμα την απόπτωση, την αναστολή της ανάπτυξης και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη G_0/G_1 φάση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η β-κατενίνη αποτελεί ένα καίριο μόριο για την εγκαθίδρυση και την ανάπτυξη καρκίνου και σχετίζεται με το βαθμό κακοήθειας (Liu et al., 2011).

Η επίδραση της Hsp70 στην p14^{ARF}/β-κατενίνη απόπτωση: Πρόσφατες έρευνες της ομάδας μας έχουν αποδείξει ότι υπάρχει συνεργασία μεταξύ Hsp70, p14^{ARF} και β-κατενίνης στο αποπτωτικό μονοπάτι που προκαλείται από θερμικό ή οξειδωτικό στρες (Damalas et al., 2011).

Έχει βρεθεί ότι η απόπτωση που προκαλείται λόγω οξειδωτικού ή θερμικού στρες ρυθμίζεται από την έκφραση της p14^{ARF}. Η πλειορρύθμιση της έκφρασης πρωτεϊνών που ενεργοποιούν την p14^{ARF}, όπως η β-κατενίνη, μπορεί να δράσει προστατευτικά έναντι της απόπτωσης. Πράγματι, η αποσιώπηση της p14^{ARF} οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της β-κατενίνης. Επιπλέον, η αποσιώπηση της β-κατενίνης καταργεί τον προστατευτικό ρόλο της καταστολής της απόπτωσης από την p14^{ARF}, καθιστώντας τα κύτταρα πιο ευαίσθητα. Τέλος, η αποσιώπηση της Hsp70, οδηγεί επίσης σε αύξηση της β-κατενίνης, ενώ φαίνεται να υπάρχει συνεργασία της Hsp70 με την p14^{ARF} στους πυρηνίσκους. Όλα τα παραπάνω συνάδουν σε μια λειτουργική συνεργασία μεταξύ των τριών πρωτεϊνών (Damalas et al., 2011).

Πιο συγκεκριμένα, η p14^{ARF} λειτουργεί πιθανά ως περισυλλέκτης της Hsp70 η οποία επάγεται λόγω στρες. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών επιτρέπει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση. Ωστόσο, απουσία της p14^{ARF}, η Hsp70 συγκεντρώνεται σε μικρότερο βαθμό στους πυρηνίσκους και το αυξημένο ελεύθερο κυτταροπλασματικό κλάσμα της θα μπορούσε να καταστείλει την εξαρτώμενη από την ουβικιτίνη αποικοδόμηση της β-κατενίνης, προωθώντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Damalas et al., 2011).

1.6. Παθήσεις της καρδιάς

Ανατομική της καρδιάς: Η καρδιά είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο σχήματος ανεστραμμένης τρίγωνης πυραμίδας. Αποτελεί την κεντρική κινητήρια δύναμη της κυκλοφορίας του αίματος. Περιβάλεται από το περικάρδιο, το οποίο τη στηρίζει σε συνδυασμό με τα μεγάλα αγγεία που εκφύονται από αυτή και καταλαμβάνει το λεγόμενο μέσο μεσοπνευμόνιο χώρο (Παπαδόπουλος, 1992).

Από ανατομικής σκοπιάς είναι ένα μονοφυές όργανο που αποτελείται από τέσσερις κοιλότητες: δύο κόλπους (αριστερό και δεξιό) και τις αντίστοιχες κοιλίες

που χωρίζονται εξωτερικά με τις υπάρχουσες αύλακες (στεφανιαία, πρόσθια και οπίσθια επιμήκη και μεσοκολπική) και εσωτερικά από το μεσοκολπικό και το μεσοκοιλιακό διάφραγμα (Παπαδόπουλος, 1992).

Ο κύριος ιστός της καρδιάς είναι το μυοκάρδιο, το οποίο συνδέεται με ένα ειδικό σύστημα μυικών ινών, το σύστημα αγωγής των διεγέρσεων, το οποίο αποτελεί τη μοναδική σύνδεση μεταξύ κόλπων και κοιλιών. Το μυοκάρδιο επενδύεται εσωτερικά από το ενδοκάρδιο και εξωτερικά από το επικάρδιο. Επίσης η καρδιά φέρει ινώδη σκελετό, ο οποίος είναι διάτρητος από τα κολποκοιλιακά και αρτηριακά στόμια (Παπαδόπουλος, 1992).

Το μυοκάρδιο αποτελείται από συγκυτιώδες δίκτυο γραμμωτών μυών, διαφορετικών μορφολογικά από τους σκελετικούς μύες και διαχωρίζεται στο μυοκάρδιο των κόλπων και των κοιλιών. Μεταξύ των μυικών ινών παρεμβάλλεται συνδετικός ιστός, αιμοφόρα αγγεία και νευρικά στοιχεία του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Επιπλέον, υπάρχει το αγωγό μυοκάρδιο που αποτελείται από ειδικά διαφοροποιημένες μυικές ίνες και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και αγωγή των διεγέρσεων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα μυοκύτταρα της καρδιάς παρουσιάζουν ρυθμική εκπόλωση και αναπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών τους που φέρεται από κύτταρο σε κύτταρο. Ο ρυθμός εκπόλωσης και αναπόλωσης είναι ταχύτερος στο φλεβόκομβο, ο οποίος αποτελεί και το βηματοδότη της καρδιάς (Παπαδόπουλος, 1992).

Το μυοκάρδιο εμφανίζει κάποιες χαρακτηριστικές ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες: αυτοματία (αυτόχθονη παραγωγή ερεθισμάτων), αγωγιμότητα (μεταφορά ερεθισμάτων στα γειτονικά κύτταρα), διεγερσιμότητα (ικανότητα αντίδρασης σε ένα ερέθισμα) και ανερεθιστότητα (περίοδος κατά την οποία το κύτταρο δεν είναι ικανό να αντιδράσει απόλυτα ή σχετικά σε ένα ερέθισμα) (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1992).

Η βιολογική αποστολή του μυοκαρδίου είναι να προωθεί το αίμα προς τα περιφερικά όργανα και να το επαναφέρει στην καρδιά. Η λειτουργία αυτή μπορεί να εξεταστεί από δύο όψεις: α) την αιμοδυναμική της κυκλοφορίας που εξετάζει τη λειτουργία της καρδιάς ως αντλίας, δηλαδή τις μεταβολές των καρδιαγγειακών πιέσεων, όγκων και ροής του αίματος κατά τη διάρκεια του καρδιακού κύκλου και β) τη μηχανική λειτουργία της καρδιάς ως μυός που περιλαμβάνει τις πολλαπλές μηχανικές μεταβολές που διέπουν τη σύσπαση και τη χάλαση του μυοκαρδίου (Κωλέττης, 1992).

Καρδιακή ανεπάρκεια: Η καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να οριστεί ως το κλινικό σύνδρομο που προέρχεται από την αδυναμία της καρδιάς να προμηθεύει επαρκή αιμάτωση στους περιφερικούς ιστούς κατά την ηρεμία, ή και κατά την άσκηση και συνοδεύεται από την αύξηση της διαστολικής πίεσης της αριστερής ή της δεξιάς κοιλίας. Είναι φανερό ότι στην πάθηση αυτή εμπλέκεται ένα φάσμα κυτταρικών ανωμαλιών που προηγούνται των κλινικών συμπτωμάτων. Το πιο σταθερό εύρημα στον απομονωμένο καρδιακό μυ στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι η έκπτωση της συσταλτικότητας, η οποία σε κυτταρικό επίπεδο προκαλείται από δομικές και βιοχημικές τροποποιήσεις που οδηγούν με τη σειρά τους στη συστολική και διαστολική δυσλειτουργία. Συνοπτικά, οι κυτταρικές ανωμαλίες που συνοδεύουν την καρδιακή ανεπάρκεια περιλαμβάνουν αλλαγές στη δομική οργάνωση των μυικών κυττάρων, αλλά και στους μηχανισμούς ρύθμισης των αντλιών ιόντων ασβεστίου και τις αλληλεπιδράσεις αυτών με τις πρωτεΐνες των μυικών ινιδίων (Λίμας και Λίμα, 1992β; Μπουντούλας και Γκελερής, 1992).

Αίτια της καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να είναι βαλβιδοπάθειες ή συγγενείς καρδιοπάθειες. Σπανιότερα μηχανικά αίτια είναι οι καταστάσεις που εμποδίζουν την

πλήρωση των κοιλιών, όπως υπερτροφική ή περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια. Άλλα μηχανικά αίτια μπορούν να θεωρηθούν η απότομη και μεγάλη αύξηση της αρτηριακής πίεσης, η υπερφόρτωση με υγρά που συμβαίνει κατά τη νεφρική ανεπάρκεια ή κατά την έντονη αρτηριοφλεβική επικοινωνία (Μπουντούλας και Γκελερής, 1992).

1.7. Η κυτταροστατική ουσία δοξορουβικίνη

Η δοξορουβικίνη είναι μια φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου. Είναι ένα αντιβιοτικό ανθρακυκλίνης που δρα παρεμβάλλοντας στο DNA (Reddy et al., 2011). Η πιο σοβαρή παρενέργεια της δοξορουβικίνης είναι η πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας που δύναται να απειλήσει τη ζωή του ασθενούς (Dogoshov et al., 1980). Η χρήση της δοξορουβικίνης είναι ευρεία κατά των καρκινωμάτων, καθώς χρησιμοποιείται συχνά στη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών, πολλών τύπων καρκίνου και σαρκωμάτων στους μαλακούς ιστούς (Reddy et al., 2011). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δοξορουβικίνη είναι μια ουσία φωτοευαίσθητη (Wood et al., 1980).

Η ιστορία της δοξορουβικίνης χρονολογείται στη δεκαετία του 1950, όταν μια ιταλική ερευνητική εταιρία ξεκίνησε μια προσπάθεια ανεύρεσης ενώσεων με αντινεοπλαστικές ιδιότητες από μικροοργανισμούς του εδάφους. Απομονώθηκε έτσι ένας νέος τύπος του *Streptomyces peucetius*, ο οποίος έδινε μια ερυθρά χρώση και παρήγαγε ένα αντιβιοτικό που είχε καλή δραστικότητα έναντι όγκων ποντικών. Το αντιβιοτικό αυτό ονομάστηκε αρχικά «daunomycin». Στα 1967 βρέθηκε ότι προκαλούσε μεταξύ άλλων και θανάσιμη καρδιακή τοξικότητα (Tan et al., 1967). Έρευνες σύντομα αποκάλυψαν ότι μικρές αλλαγές στη δομή της χημικής ένωσης οδηγούσαν σε μεταβολές στη βιολογική δραστικότητα. Μια μετάλλαξη σε ένα στέλεχος του *Streptomyces* με τη χρήση N-νιτροζο-N-μέθυλο-ουρεθάνης οδήγησε στην παραγωγή ενός νέου στελέχους (*Streptomyces peucetius* var. *cesius*) που παρήγαγε μια 14-υδρόξυλο παραλλαγή του ερυθρόχρωου αντιβιοτικού, το οποίο ονομάστηκε αρχικά αδριαμυκίνη (Arcamone et al., 1969) και αργότερα δοξορουβικίνη. Η δοξορουβικίνη επέδειξε καλύτερη δραστικότητα κατά των όγκων σε ποντίκια και ιδιαίτερα σε συμπαγείς όγκους, ενώ εμφανίζει υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη σε σχέση με άλλες ανθρακυκλίνες. Παρ' όλα αυτά, ενώ σε αρχικά στάδια δεν εμφανίζει παρενέργειες στη λειτουργία της καρδιάς, η καρδιοτοξικότητα εμφανίζεται αργότερα, έως και δέκα χρόνια, ως παράπλευρη παρενέργεια (Amadori, 2011).

Ο μηχανισμός δράσης της δοξορουβικίνης αφορά την παρεμβολή της στο DNA και την παρεμπόδιση της μακρομοριακής του βιοσύνθεσης που οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Η δοξορουβικίνη έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά απευθείας με την κυτταρική μεμβράνη και παρεμποδίζει τη δράση της DNA ελικάσης στο ξεδίπλωμα του DNA κατά την αντιγραφή. Ένας από τους κύριους στόχους της δοξορουβικίνης είναι το ένζυμο τοποϊσομεράση II. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου της τοποϊσομεράσης II με το DNA παρεμποδίζει την επανασυγκόληση της διπλής έλικας, σταματώντας την αντιγραφή και οδηγεί σε σχάσεις στο DNA που σχετίζονται με πρωτεΐνες (Fornari et al., 1994).

Οι οξείες παρενέργειες της χρήσης δοξορουβικίνης περιλαμβάνουν ναυτία, εμέτους και καρδιακές αρρυθμίες. Μπορεί επίσης να προκαλέσει ουδετεροπενία, όπως και πλήρη αλωπεκία. Μια πιο ήπια παρενέργεια αφορά τη χρώση των ούρων, τα οποία λαμβάνουν μια ήπια ερυθρά χρώση έως και 48 ώρες μετά τη χορήγηση, μέχρι την πλήρη αποικοδόμηση του φαρμάκου από τον οργανισμό. Εάν η συνολική δόση

δοξορουβικίνης ανέλθει στα 550 mg/m², αυξάνεται δραματικά ο κίνδυνος ανάπτυξης παρενεργειών στην καρδιά, όπως χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και τελικά θάνατο (Ortho Biotech, 2007). Η καρδιοτοξικότητα της δοξορουβικίνης χαρακτηρίζεται από μια δόσοεξαρτώμενη ελάττωση της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι ROS που γεννώνται από την αλληλεπίδραση της δοξορουβικίνης με το σίδηρο, μπορούν να βλάψουν τα μυοκαρδιοκύτταρα, προκαλώντας απώλεια των μυικών ινών και τη δημιουργία κυτταροπλασματικών κενотоπιών (Berthiaume and Wallace, 2007).

Η πιο σημαντική παρενέργεια της δοξορουβικίνης είναι η καρδιοτοξικότητα. Η έναρξή της μπορεί να καθυστερήσει μέχρι και 15 χρόνια μετά την παύση της χημειοθεραπείας. Οι διαφορές στο χρόνο έναρξης της καρδιομυοπάθειας μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης υποδεικνύουν την ύπαρξη διαφόρων μηχανισμών. Η καρδιομυοπάθεια αυτή συνδέεται ισχυρά με το καρδιακό οξειδωτικό στρες, όπως φανερώνει η ύπαρξη επαγόμενων από ROS βλαβών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η δοξορουβικίνη δεν επηρεάζει μόνο το μυοκάρδιο, αλλά και το ενδοκάρδιο (ενδοθηλιακός ιστός) (Octavia et al., 2012).

Η επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα διακρίνεται στην οξεία, την ημιοξεία και τη χρόνια. Η οξεία καρδιοτοξικότητα ξεκινά εντός 24 ωρών από την έγχυση, ενέχει ηχοκαρδιογραφικές ανωμαλίες και είναι συνήθως ασυμπτωματική, με αρκετά καλή πρόγνωση. Η ημιοξεία καρδιοτοξικότητα είναι σπάνια, εμφανίζεται αρκετές εβδομάδες ή μήνες (έως και 30) μετά την τελευταία δόση δοξορουβικίνης και πιο συχνά εμφανίζεται με τη μορφή μυοκαρδίτιδας ή περικαρδίτιδας (Octavia et al., 2012).

1.8. Αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τη δοξορουβικίνη και παράγοντες που εμπλέκονται

Η χορήγηση δοξορουβικίνης στα κύτταρα φαίνεται να προκαλεί διαφορετικές αντιδράσεις, αναλόγως της χορηγούμενης δόσης. Έτσι, μπορεί τα κύτταρα να οδηγηθούν σε φαινόμενα γήρανσης ακολουθούμενα από μιτωτική καταστροφή σε χαμηλές δόσεις. Εναλλακτικά, υψηλές δόσεις δοξορουβικίνης φαίνεται να οδηγούν σε απόπτωση. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί να υπάρχει ενεργοποίηση των κασπασών, των πρωτεϊνών Bax, Bak και μελών της οικογένειας BH3-only, αλλά και εξαγωγή του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, ενδεικτικά στοιχεία του μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης (Panaretakis et al., 2002; Eom et al., 2005).

p53: Η p53 αποτελεί μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *TP53* που βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17. Το πραγματικό της μοριακό βάρος είναι 43,7 kDa, αλλά σε SDS-PAGE εμφανίζεται ως πρωτεΐνη 53 kDa, λόγω του υψηλού αριθμού προλινών που φέρει και καθυστερούν τη μετακίνησή της εντός της πηκτής.

Η ανθρώπινη p53 αποτελείται από 393 αμινοξέα και χωρίζεται σε 7 περιοχές:

- α) μια όξινη αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD), υπεύθυνη για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων
- β) την περιοχή ενεργοποίησης 2 (AD2), σημαντική για την αποπτωτική δραστηριότητα
- γ) μια περιοχή πλούσια σε προλίνες
- δ) μια κεντρική περιοχή πρόσδεσης DNA (DBD)
- ε) μια περιοχή που φέρει σήματα πυρηνικού εντοπισμού
- στ) μια περιοχή ομο-ολιγομερισμού, υπεύθυνη για το σχηματισμό των τετραμερών ενεργών μορφών της p53 *in vivo*

ζ) μια C-τελική περιοχή, υπεύθυνη για τον έλεγχο πρόσδεσης του DNA στην κεντρική περιοχή.

Εμφανίζει αντικαρκινική δράση, εμπλέκεται στην απόπτωση, τη γενωμική σταθερότητα και την αναστολή της αγγειογένεσης. Ενεργοποιείται μετά από στρες, όπως βλάβες στο DNA, οξειδωτικό στρες, οσμωτικό σοκ, έλλειψη ριβονουκλεοτιδίων και απορρύθμιση ογκογονιδίων. Η ενεργοποίησή της πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης της N-τελικής περιοχής της.

BAX: Η BAX αποτελεί το πρώτο αναγνωρισμένο προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2. Προάγει την απόπτωση μέσω ανταγωνιστικής δράσης με την Bcl-2. Φέρει τις περιοχές BH1, BH2 και BH3 χαρακτηριστικές της οικογένειας των Bcl-2. Σε φυσιολογικές συνθήκες, εδράζεται στο κυτταρόπλασμα. Σε περίπτωση όμως αποπτωτικών σημάτων, αλλάζει η διαμόρφωσή της και εισέρχεται στην έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η μετακίνηση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, προκαλώντας την ενεργοποίηση των κασπασών. Η έκφραση της BAX πλειορρυθμίζεται από την p53, η οποία ρυθμίζει και τις αποπτωτικές της ιδιότητες.

Κασπάση-9: Η κασπάση-9 αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεασών κυστεΐνης και εμπλέκεται στην απόπτωση και την κατεργασία των κυτοκινών. Συντίθεται ως ένα πρόδρομο μόριο 46 kDa. Αποτελείται από τρεις περιοχές:

- α) μια N-τελική πρόδρομη περιοχή,
- β) μια μεγάλη υπομονάδα 20 kDa (p20)
- γ) μια μικρή υπομονάδα 10 kDa (p10).

Η ενεργοποίησή της πραγματοποιείται μετά από πρόσδεση του Araf-1 στη N-τελική περιοχή της, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός ενεργού τετραμερούς p20/p10. Η αρνητική ρύθμιση της δράσης της πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9 διασπά περαιτέρω τις υπόλοιπες κασπάσες καθοδικά στο αποπτωτικό μονοπάτι, δρώντας ως ενεργοποιητής του καταρράκτη των κασπασών (Kuida, 2000)

Κασπάση-3: Η κασπάση-3, όπως και η κασπάση-9 ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Συντίθεται ως ένα ανενεργό προ-ένζυμο το οποίο υφίσταται αυτο-πρωτεόλυση και/ή διάσπαση από άλλες κασπάσες (κασπάση 8, 9 και 10) ανοδικά του αποπτωτικού μονοπατιού στα κύτταρα που αποπίπτουν. Η διασπασμένη μορφή της κασπάσης-3 αποτελείται από μια μεγάλη (17kDa) και μια μικρή (12 kDa) υπομονάδα. Οι δύο αυτές υπομονάδες συνδέονται για να σχηματίσουν το ενεργό ένζυμο. Η ενεργός κασπάση-3 με τη σειρά της διασπά πρωτεολυτικά άλλες κασπάσες (6,7 και 9), καθώς και άλλα μόρια στα κύτταρα, όπως η PARP-1.

1.9. Η Hsp70 στις καρδιακές παθήσεις

Η οικογένεια των επαγόμενων από στρες Hsp70 πρωτεϊνών αποτελεί την πιο εκτεταμένα μελετημένη στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Τόσο πειραματικά, όσο και κλινικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη Hsp70 αποτελεί καίριο στοιχείο ενδογενών μονοπατιών, τα οποία περιορίζουν την έκταση της βλάβης στο μυοκάρδιο στην περίπτωση τραυματισμών λόγω πειραματικής ισχαιμίας-επανεγγύσης (Plumier et al., 1995) ή μετά από χειρουργική επέμβαση στην καρδιά (de Jong et al., 2009).

Είναι αναπόφευκτος ως ένα βαθμό ο ισχαιμικός τραυματισμός των καρδιομυοκυττάρων σε περιπτώσεις εγχειρήσεων ανοικτής καρδιάς. Οι αορτικές διασυνδέσεις και η καρδιοπνευμονική παράκαμψη προάγουν την ολική ισχαιμία του μυοκαρδίου, επηρεάζοντας την ακεραιότητα των κυτταροσκελετικών και των συστατικών πρωτεϊνών (de Jong et al., 2009).

Στην κλινική πράξη, εφαρμόζονται αρκετές προσεγγίσεις για την καθυστέρηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της ισχαιμίας, μεταξύ των οποίων είναι και η χρήση της Hsp70 που εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η Hsp70 προωθεί την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων, διατηρώντας υψηλά τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ουσιών και αναστέλλοντας τα προαποπτωτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των αποπτωτικών καταρρακτών που ελέγχονται από τις κασπάσες και τον Fas. Η ιδέα της προ-επώασης στο θερμικό σοκ ως ενίσχυση της καρδιακής λειτουργίας προ-ισχαιμικά απεδείχθη πρώτη φορά *in vivo* σε επίμυες οι οποίοι υπεβλήθησαν σε αυξημένη θερμοκρασία 24 ώρες πριν το ισχαιμικό επεισόδιο. Η προεπώαση είχε ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης δεικτών των βλαβών του μυοκαρδίου σε συνδυασμό με ταχύτερη ανάρρωση και βελτιωμένη συσταλτικότητα του καρδιακού ιστού. Αργότερα απεδείχθη και η αρνητική σχέση μεταξύ της ποσότητας της Hsp70 που εκφράζεται στα καρδιομυοκύτταρα και στο μέγεθος του εμφράγματος, ενώ αρκετές απόπειρες με διαγονιδιακά ζώα επιβεβαίωσαν ότι η Hsp70 παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του μυοκαρδίου σε πειραματικά μοντέλα, προστατεύοντας τα ποντίκια κατά τη διάρκεια σύντομου ισχαιμικού επεισοδίου, αλλά και ελαττώνοντας τη θνησιμότητα σε περίπτωση εμφράγματος μετά από εκτεταμένη ισχαιμία. Σε ένα σύστημα κουνελιών με βλάβες στο μυοκάρδιο λόγω ισχαιμίας-επανεγγύσης, απεδείχθη ότι η ενδο-μυοκαρδιακή ένεση με αδενοϊό που φέρει κατασκευή με την ανθρώπινη Hsp70 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά δύο φορές του μεγέθους του εμφράγματος σε σχέση με τα πειραματόζωα ελέγχου (Plumier et al., 1995). Έτσι, η αύξηση της έκφρασης της Hsp70 στον καρδιακό ιστό σε πειραματικά συστήματα, βελτίωσε σημαντικά τη διάσωσή του από τον κίνδυνο ισχαιμικού εμφράγματος σε συνδυασμό με τη βελτίωση της καρδιακής συσταλτικότητας μεθ-ισχαιμικά (de Jong et al., 2009).

Στον άνθρωπο, καινοτόμες μελέτες σε επεμβατικές περιπτώσεις καρδιάς έδειξαν ότι ακόμη και σε περιορισμένο χρονικό διάστημα το μυοκάρδιο αποκρίνεται στην ισχαιμία αυξάνοντας την έκφραση της Hsp70. Δείγματα από μυοκάρδιο έδειξαν αύξηση στη μεταγραφική έκφραση της Hsp70 αλλά και αύξηση στη ποσότητά της μετά το πέρας της τοποθέτησης μοσχεύματος σε επέμβαση παράκαμψης στένωσης της στεφανιαίας αρτηρίας. Μελέτες σε ασθενείς που υποβλήθησαν σε εγχείρηση ανοικτής καρδιάς έδειξαν ότι αυξήθηκαν τα επίπεδα της Hsp70 στις αορτικές διασυνδέσεις στο 40% των περιπτώσεων. Ασθενείς με υψηλά επίπεδα λειτουργικής Hsp70 στο μυοκάρδιο εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα βιοχημικών δεικτών μυοκαρδιακής βλάβης μετεγχειρητικά, ενώ ασθενείς στους οποίους δεν αυξήθηκε η μυοκαρδιακή έκφραση της Hsp70 περι-χειρουργικά, εμφάνισαν σχεδόν διπλάσια έκφραση των δεικτών αυτών μετεγχειρητικά. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την ιδέα ότι η ενδοκυττάρια Hsp70 προστατεύει το ανθρώπινο μυοκάρδιο από ισχαιμικές προσβολές. Κλείνοντας, φαίνεται πως οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες της Hsp70 σχετίζονται και με την ηλικία (de Jong et al., 2009).

Ο χρονικός ορίζοντας επαγωγής της Hsp70 επηρεάζει το βαθμό της λειτουργικής δράσης της ως μοριακού συνοδού σε περιπτώσεις ισχαιμίας και επανεγγύσης. Μερικές μελέτες ασχολήθηκαν ειδικά με την κινητική της αύξησης στην έκφραση της Hsp70 *in vitro*, αλλά και *in vivo*. Σε συστήματα επίμυος, αύξηση της θερμοκρασίας σε ολόκληρο το σώμα, οδήγησε στην επαγωγή της αύξησης της

Hsp70 μεταξύ 3 και 72 ωρών, ενώ η ευεργετική επίδραση της προ-επώασης στο μέγεθος του εμφράγματος μεθ-ισχαιμικά μεγιστοποιήθηκε στο χρόνο μεταξύ 48 και 72 ωρών. Επιπλέον, βρέθηκε αυξανόμενη συγκέντρωση των επιπέδων της Hsp70 κατά τη διάρκεια εγγείρησης ανοικτής καρδιάς, με αύξηση πάνω από δυο φορές μετά από 2 ώρες, παρόμοια με αυτή στα πειραματικά συστήματα. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι η προετοιμασία για ισχαιμία προχειρουργικά μπορεί να επάγει τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα της Hsp70. Πράγματι, δύο κύκλοι ισχαιμίας-επανεγγύσης ως προετοιμασία πριν από την αντικατάσταση βαλβίδων, βρέθηκε ότι μειώνει τις καρδιομυικές δομικές αλλοιώσεις και βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία μετεγχειρητικά. Τα στοιχεία αυτά συγκεντρωτικά δείχνουν ότι η Hsp70 στο ανθρώπινο μυοκάρδιο επάγεται μέσα σε μια σύντομη χρονική περίοδο μετά την έναρξη του ισχαιμικού επεισοδίου (de Jong et al., 2009).

1.10. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί: α) στο να ρίξει περαιτέρω φως στις προστατευτικές λειτουργίες της ανθρώπινης Hsp70 και β) να επιβεβαιώσει σε επίπεδο οργανισμού τη δράση της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια.

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αφενός μεν κυτταρικές σειρές αφετέρου δε Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια (Angelidis et al., 1996). Παράλληλα, μια άλλη ερευνητική ομάδα μελέτησε μεταξύ άλλων και μερικούς κοινούς στόχους που αφορούν το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί η δοξορουβικίνη, σε πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα (13 ημερών κύησης) από Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια και από ποντίκια άγριου τύπου (Zerikiotis et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι προστατευτικές λειτουργίες της ανθρώπινης Hsp70, αλλά και οι μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιεί για τις λειτουργίες αυτές.

Αρχικά, αποσαφηνίστηκε ο ρόλος μετακίνησης της Hsp70 στους πυρηνίσκους και το πυρηνόπλασμα μετά από συνθήκες στρες, ένα θέμα αδιευκρίνιστο από τη δεκαετία του 1980. Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν η Hsp70 εμπλέκεται στο μηχανισμό βλαβών του DNA που προκαλούνται από υπεροξειδίου του υδρογόνου και το θερμικό σοκ (Doulias et al., 2007; Kotoglou et al., 2009). Επιπλέον μελετήσαμε εάν η Hsp70 συνεντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα και τους πυρηνίσκους με την PARP-1 και την XRCC1 και εάν συνεργάζεται μαζί τους.

Άλλη μια πρωτεΐνη, η ογκοκατασταλτική p14^{ARF}, η οποία προστατεύει τα κύτταρα από κακοήθεις μετασχηματισμούς, λειτουργώντας ως αισθητήρας ογκογονικών σημάτων (Dimri et al., 2000; Berkovich et al., 2003), μελετήθηκε για το ρόλο που διαδραματίζει στη ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης στους παραπάνω τύπους στρες και εάν υπάρχει μια άμεση συσχέτιση της ποσότητας της p14^{ARF} με την απόπτωση που προκαλείται μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, εξετάστηκε εάν η απόπτωση αυτή ελέγχεται από την Hsp70 και εάν μετά από στρες υπάρχει συσχέτιση της Hsp70 με την p14^{ARF} και τη β-κατενίνη.

Δεδομένου ότι η δοξορουβικίνη αποτελεί ένα δυναμικό παράγοντα πρόκλησης καρδιακής ανεπάρκειας, μελετήθηκε εάν η Hsp70 δρα όντως προστατευτικά *in vivo* μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε ένα σύστημα ποντικών στους οποίους με τεχνικές γενετικής μηχανικής έχει υπερεκφραστεί σταθερά η Hsp70 (Plumier et al., 1995; Angelidis et al., 1996). Μελετήθηκε συγκριτικά η κλινική εικόνα των ποντικών χρησιμοποιώντας μια σειρά υπερηχοκαρδιογραφικών δεικτών, οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν με μια σειρά βιοχημικών τεχνικών σε καρδιακούς ιστούς που εξήχθησαν από ζώα αρνητικά και θετικά σε χορήγηση δοξορουβικίνης.

Επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση συγκεκριμένου αποπτωτικού μηχανισμού ο οποίος ρυθμίζεται από την Hsp70.

2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταροκαλλιέργεια ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

2.1.1. Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο κυτταροκαλλιέργειας, ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλοι οι χειρισμοί που περιλαμβάνουν κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής (AURA 2000 MAC – BIOAIR INSTRUMENTS S.R.L.). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific CO₂ Incubator, Model 311 – Forma Scientific Inc.) σταθερής θερμοκρασίας 37° C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες, τρυβλία ή πολυτρυβλία πολυστυρενίου (CELLSTAR® - Greiner Bio-one) μιας χρήσης. Ο μικροσκοπικός έλεγχος των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus IM – Olympus Optical Co. Ltd.). Η μακρόχρονη αποθήκευσή τους έγινε σε υγρό αζώτο (-192° C) με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω (ενότητα 2.1.4).

Για την περίπτωση των κυττάρων Sf9 που αναφέρονται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκε κλίβανος (Water Jacketed CO₂ Incubator – Precision Scientific Group) σταθερής υγρασίας και θερμοκρασίας 27° C χωρίς επιπλέον παροχή CO₂.

2.1.2. Κυτταρικές σειρές

Για τις πειραματικές ανάγκες της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές:

- HeLa κύτταρα (ATCC: CCL-2): Επιθηλιακά κύτταρα από ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα μήτρας.
- HeLa-siRNA-Hsp70 κύτταρα: HeLa κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η Hsp70 μέσω siRNA τεχνολογίας μετά από διαμόλυνση με το φορέα pSuper.
- HeLa-shp14ARF κύτταρα: HeLa κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η p14^{ARF} μετά από διαμόλυνση με το φορέα pRetro Super μέσω τεχνολογίας shRNA
- H1299 κύτταρα (ATCC: CRL-5803): Επιθηλιακά κύτταρα από ανθρώπινο καρκίνωμα του πνεύμονα που έχουν απομονωθεί από μετάσταση στους λεμφαδένες ενήλικου άρρενος ατόμου. Τα κύτταρα φέρουν ομόζυγη μερική διαγραφή του γονιδίου της p53 και δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη p53.
- H1299-shp14ARF κύτταρα: H1299 κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η p14^{ARF} μετά από διαμόλυνση με το φορέα pRetro Super μέσω τεχνολογίας shRNA.
- NARF2/E6 κύτταρα (προσφορά του Dr. Gordon Peters – London research Institute): Επιθηλιακά κύτταρα που επάγουν την p14^{ARF} μετά από επώαση με IPTG. Τα κύτταρα έχουν προκύψει μετά από διαμόλυνση με το φορέα pBabepuro-E6 σε κύτταρα NARF, τα οποία με τη σειρά τους έχουν προέλθει από τα κύτταρα οστεοσαρκώματος U-2 OS (ATCC: HTB-96) που φέρουν πολλές χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και αριθμούν πολλά υπερτριπλοειδή κύτταρα όσον αφορά το DNA τους.

- C2C12 κύτταρα (ATCC: CRL-1772): Μυοβλάστες ποντικού οι οποίοι διαφοροποιούνται ταχύτατα, δίνοντας συσταλτές μυικές ίνες και εκφράζουν χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των μυών.

2.1.3. Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας

2.1.3.1. Θρεπτικά μέσα

Για την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν διάφορα θρεπτικά μέσα, ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε κυτταρικής σειράς. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υλικό είναι το Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Biochrom AG #T043-10). Το θρεπτικό υλικό παρασκευάζεται με διάλυση σε 10 λίτρα ddH₂O σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, με ταυτόχρονη προσθήκη 3,7 g/l όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) και ρυθμίστηκε με τη βοήθεια pH-μέτρου (Consort C863 multi parameter analyzer) σε pH 7,4. Ακολούθως, προστέθηκαν 5,5 ml/l μίγματος αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης 100x (PAA #P11-010) και το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε σε διηθητική διάταξη (MILLIPORE) στην οποία τοποθετήθηκαν προφίλτρα γυάλινων ινών (MILLIPORE #AP1512450) και φίλτρα PVDF 0,22 μm (Durapore membrane filters – Millipore #GVWP14250), με τη βοήθεια αντλίας κενού (MILLIPORE #XX5522050). Στη συνέχεια, το έτοιμο θρεπτικό μέσο ελέγχθηκε μικροβιακά και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4°C.

Για την καλλιέργεια ειδικών κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά RPMI 1640 (Gibco #A10491) και Medium 199 (Gibco #31150) με την προσθήκη 1mM Na pyruvate (Gibco #11360-070).

2.1.3.2. Διάλυμα έκπλυσης με ιόντα φωσφορικών αλάτων (PBS)

Οι εκπλύσεις των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό ή από τις ουσίες με τις οποίες τυχόν επώαστηκαν, προκειμένου να ακολουθήσουμε διάφορα πρωτόκολλα επεξεργασίας τους, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS), ελλειμματικού σε ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται διαλύοντας 0,4% w/v NaCl, 0,01% w/v KCl, 0,072% w/v Na₂HPO₄ · 2H₂O, και 0,012% w/v KH₂PO₄. Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 7,3 με τη βοήθεια ορθο-φωσφορικού οξέος 85%, αποστειρώνεται για 30mins στους 121°C, σε αυτόκαυστο (Raypa steam sterilizer – R. Espinar S.L.) και αποθηκεύεται στους 4°C.

2.1.3.3 Ορός (FBS)

Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται πριν από τη χρήση του με ορό που έχει ληφθεί από αίμα εμβρύων βοοειδών (FBS – PAA #A15-043), ελεγμένο για ενδοτοξίνες και μυκόπλασμα, σε τελική συγκέντρωση 10%. Η προσθήκη του ορού είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού σε αυξητικούς παράγοντες αναγκαίους για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε ορισμένες κυτταρικές σειρές που είναι πιο ευαίσθητες, είναι επιβεβλημένη η θερμική απενεργοποίηση του ορού στους 55°C για 20 min, προκειμένου να αποδιαταχθούν ορισμένες τοξίνες που ενδεχομένως να διαταράζουν την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων.

2.1.3.4. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA

Η αποκόλληση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA 10x (Gibco #15400-054) 0.05%/0.02% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS ελλειμματικού σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , αραιωμένο σε συγκέντρωση 1x για χρήση. Η επίδραση με θρυψίνη (σε κατάλληλο χρόνο για την κάθε κυτταρική σειρά), βοηθά στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), προκειμένου να επιτυγχάνεται η δημιουργία μονοκύτταρου κυτταρικού εναιωρήματος.

2.1.4. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

Για τη μακροχρόνια αποθήκευση και συντήρηση των κυτταρικών σειρών ακολουθείται η διαδικασία αποθήκευσης σε υγρό άζωτο. Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS 1x. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης/EDTA 1x και τα κύτταρα επωάζονται μέχρι 5 min. Για τη διευκόλυνση της αποκόλλησης, μπορούν να εφαρμοστούν ελαφρά χτυπήματα στη βάση του σκεύους καλλιέργειας. Μετά την αποκόλλησή τους, συλλέγεται το 80% των κυττάρων από πλήρες ταπήτιο, σε θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος ψύξης, το οποίο αποτελείται από 90% v/v FBS και 10% v/v DMSO. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε κρυοφιαλίδιο ψύξης (cryovial) (Greiner Bio-one) του 1,5 ml, το οποίο μεταφέρεται αρχικά στους -70°C για τουλάχιστον 16 ώρες και στη συνέχεια σε δοχείο υγρού αζώτου (Taylor-Wharton) στους -192°C .

2.2 Καλλιέργεια βακτηρίων

2.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων

Η καλλιέργεια των βακτηρίων μπορεί να γίνει είτε σε υγρή, είτε σε στερεά μορφή. Αναλόγως του όγκου και της χρήσης για την οποία προορίζονται, οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιούνται μέσα σε βακτηριακά φυγοκεντρικά σωληνάρια των 10 ml (Aptaca), ή σε φυγοκεντρικά σωληνάρια Universal των 30 ml (Greiner - #201170) για καλλιέργειες μικρού όγκου, ή σε γυάλινες κωνικές φιάλες για μεγαλύτερου όγκου καλλιέργειες. Η ανάπτυξη πραγματοποιείται σε κλειστό θερμοστατημένο κλίβανο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (Model G25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific Co. Inc. U.S.A.) στους 37°C το πολύ για 24 hr, μέχρι τα βακτήρια να φτάσουν στο «plateau» της εκθετικής τους φάσης ανάπτυξης, ενώ βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση στις 200 rpm, προκειμένου να υπάρχει καλός αερισμός.

Στην περίπτωση στερεής καλλιέργειας, ενοφθαλμιάται μικρή ποσότητα υγρής καλλιέργειας σε βακτηριακό τρυβλίο Petri (BIBE) και απλώνεται στο στερεό μέσο ανάπτυξης με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur (Isolab Laborgärete GmbH - #I.084.01.002.250), η οποία πρωτίστως έχει πυρωθεί σε γκαζάκι ώστε να αποκτήσει σχήμα ελληνικού κεφαλαίου γράμματος «Γ». Το τρυβλίο ακολουθώς τοποθετείται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C (B40 – Memmert, West Germany) όπου αφήνεται με ανοικτό το πόμα μέχρι να στεγνώσει το υγρό θρεπτικό μέσο και να αποροφηθεί η καλλιέργεια στο στερεό θρεπτικό μέσο. Η ανάπτυξη πραγματοποιείται για 24 hr.

Σε κάθε περίπτωση, είναι επιβεβλημένη η χρήση στειρών συνθηκών καλλιέργειας, προκειμένου να εξασφαλιστεί η καθαρότητα της καλλιέργειας από επιμολύνσεις. Η επιλογή των κατάλληλων κλώνων εργασίας μπορεί να γίνει είτε με επιλογή με την κατάλληλη συγκέντρωση κάποιου αντιβιοτικού, ειδικού για γονίδιο ανθεκτικότητας, είτε με τη χρήση ουσιών ή γονιδίων οι οποίες δίνουν κάποιο χρώμα στις επιθυμητές αποικίες.

Η μακρόχρονη αποθήκευση των βακτηρίων πραγματοποιείται σε αποστειρωμένα σωληνάρια erpendorf στους -80°C , ενώ οι καλλιέργειες δύνανται να αποθηκευτούν για σύντομο χρονικό διάστημα και στους 4°C .

2.2.2. Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας βακτηρίων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, οι βακτηριακές καλλιέργειες μπορεί να είναι υγρές ή στερεού μορφής. Το βασικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται στην υγρή καλλιέργεια είναι το Luria Broth (LB) (1% w/v βακτηριακής τρυπτόνης (LAB M - #MC 5), 0.5% w/v εκχυλίσματος ζυμομύκητα (LAB M - #MC 1) και 1% w/v NaCl), ενώ στη στερεά καλλιέργεια χρησιμοποιούμε πάλι το θρεπτικό μέσον LB, με την περαιτέρω προσθήκη ενός πολυσακχαρίτη που εξάγεται από φύκη (άγαρ - LAB M - #MC 2), ο οποίος σε θερμοκρασία άνω των 55°C υγροποιείται, ενώ κάτω από τη θερμοκρασία αυτή πολυμερίζεται και στερεοποιείται, επιτρέποντας την επίστρωσή του σε τρυβλία Petri.

2.2.3. Αποθήκευση βακτηριακών καλλιεργείων

Για τη μακροχρόνια αποθήκευση και συντήρηση των βακτηριακών κυττάρων, παίρνουμε βακτήρια από φρέσκια καλλιέργεια και τη διαλυτοποιούμε σε διάλυμα με αποστειρωμένη γλυκερόλη (Riedel-de Haën - #33224). Το διάλυμα αυτό καλλιέργειας/γλυκερόλης (80%/20% v/v), τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf υπό στείρες συνθήκες και αποθηκεύεται στους -80°C .

2.3. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα θηλαστικών

Προκειμένου να απομονωθεί το συνολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από μονή στοιβάδα κυττάρων θηλαστικών σε τρυβλίο χωρητικότητας 10 ml (5 ml), αφαιρείται το θρεπτικό μέσον και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (5 ml), ανά έκπλυση, διαλύματος PBS. Συμπληρώνουμε το τρυβλίο με 7 ml (3 ml) διαλύματος PBS. Με ένα φύλλο σιλκόνης τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου, συλλέγονται σε αποστειρωμένα φυγοκεντρικά σωληνάκια των 10 ml και φυγοκεντρώνται στις 3.000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C (Sigma - #D-37520, Germany). Μετά τη φυγοκέντρηση αποχύνεται το υπερκείμενο, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε 1 ml PBS και μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια erpendorf, στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύντομη φυγοκέντρηση για 8 δευτερόλεπτα στις 11.000 rpm σε φυγόκεντρο erpendorf (Eppendorf Centrifuge 5417 C, Germany), σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το υπερκείμενο πλήρως με αναρρόφηση υπό κενό (στο στάδιο αυτό τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για σύντομο χρονικό διάστημα στους -80°C) και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300 μl (200 μl) διαλύματος RIPA (5% v/v Tris-HCl pH 7.5 1M, 3% v/v NaCl 5M, 1% v/v Triton-X-100 100%, 10% v/v sodium deoxycholate 10%, 1% v/v SDS 10%), στο οποίο προστίθενται αμέσως πριν τη χρήση 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin και 0.5 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin. Το εναιώρημα επωάζεται για 20 min στον πάγο. Στα πρώτα 10 min

διευκολύνεται η κυτταρική λύση περνώντας το εκχύλισμα από σύριγγα 1 ml (Kessler #SH.K01) μέσα από βελόνα 21x1½ G (UNOLOK single use needles – HMD Healthcare Limited, UK) και ανάδευση σε Vortex (K-550-GE – Scientific Industries Inc, USA). Για την τελική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, το εναιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων (Vibra Cell VCX 130PB – Sonics & Materials Inc, USA) όπου και εφαρμόζονται παλμοί των 30 sec στο 30% της ισχύος της κεφαλής, μέσα στον πάγο, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερθέρμανσή του. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα (14.800 rpm) για 20 min στους 4° C σε μικροφυγόκεντρο erpendorf. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα erpendorf, όπου επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης 5x (3,785% w/v Trizma base, 15% w/v SDS, 50% v/v γλυκερόλη 87%, 25% v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη), ρυθμισμένο σε pH 6.8 και εμπλουτισμένο με 0.5% w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και θερμαίνεται προς αποδιάταξη στους 100° C για 5 min σε θερμική συσκευή (heatblock) (Test Tube Heater SHT 10 – Stuart Scientific Co. Ltd, Great Britain).

2.4. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ιστούς

Για να εξάγουμε τις πρωτεΐνες από φρέσκο ιστό, κόβουμε την επιθυμητή ποσότητα ιστού και τη ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας (PLS 360-3 – KERN & Sohn GmbH, Germany). Στη συνέχεια, ομογενοποιούμε τον ιστό σε ομογενοποιητή με ιγδίο (Wheaton - #358005), μέσα σε διάλυμα ουρίας (Urea extraction buffer) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 M Urea, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 µg/ml λευπεπτίνη και 0.5 µg/ml πεπστατίνη), σε αναλογία 10 µl διαλύματος εκχύλισης για κάθε mg ιστού. Η λύση των ιστών που τυχόν δεν έχουν λυθεί ολοκληρώνεται με τη βοήθεια υπερηχοβολισμού για 30 sec, στο 30% της έντασης της κεφαλής. Τα στερεά υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 5 λεπτά στους 4° C. Το προκύπτον υπερκείμενο (καθαρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα), μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erpendorf και του προστίθεται διάλυμα φόρτωσης 5x.

2.5. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad protein assay)

Η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών έγινε με αξιοποίηση των αρχών της μεθόδου Bradford, κατά την οποία η ερυθρόχροη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, όταν προσδεθεί σε κάποια πρωτεΐνη, αλλάζει μέγιστο απορρόφησης από τα 460 nm στα 595 nm, δίνοντας ένα κυανό χρώμα, η ένταση του οποίου μπορεί να μετρηθεί σε φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος βασίζεται στον έμμεσο υπολογισμό της ποσότητας μιας άγνωστης πρωτεΐνης, συγκρίνοντας τις τιμές απορρόφησης στα 595 nm των αγνώστων δειγμάτων, με τις τιμές απορρόφησης προτύπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης (συνήθως βόειου αλβουμίνης – BSA), βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρίας.

Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για μικρές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, γίνεται παρασκευάζοντας διαδοχικές αραιώσεις BSA, από 1 µg/ml έως 25 µg/ml, σε ddH₂O. Τοποθετούμε 0.8 ml από το καθένα από τα πρότυπα δείγματα σε καθαρά σωληνάκια, καθώς και ένα ακόμα δείγμα με 0.8 ml ddH₂O, που θα αποτελέσει τον αρνητικό μάρτυρα (τυφλό) της φωτομέτρησης. Στη συνέχεια, τοποθετούμε σε όλα τα δείγματα 0.2 ml διαλύματος χρωστικής (Bio-Rad - #500-0006), αναδεύουμε ήπια, και επωάζουμε για τουλάχιστον 5 λεπτά. Ακολουθεί φωτομέτρηση (General Purpose

UV/Vis Spectrophotometer DU 520 - Beckman) στα 595 nm και με βάση τον αρνητικό μάρτυρα, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Η παρασκευή των προς υπολογισμό αγνώστων δειγμάτων γίνεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Διαλύουμε 10 μl από το δείγμα σε ddH₂O μέχρι όγκου 0.8 ml, προσθέτουμε τη χρωμογόνο χρωστική μέχρι τελικού όγκου 1 ml και επωάζουμε για τουλάχιστον 5 λεπτά. Όπως και στην περίπτωση της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιούμε αρνητικό μάρτυρα πριν από κάθε μέτρηση. Χρησιμοποιώντας στη συνέχεια την εξίσωση της καμπύλης προτύπων δειγμάτων που έχουμε ήδη κατασκευάσει, υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστά μας δείγματα με βάση τις τιμές απορρόφησης που πήραμε από το φασματοφωτόμετρο.

Καθώς η παραπάνω τεχνική αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, θα πρέπει να προσέχουμε κατά εκτέλεσή της να μην υπάρχουν τυχόν συσσωματώματα στα δείγματά μας (πρότυπα και άγνωστα), τα οποία ενέχουν τον κίνδυνο ψευδούς αύξησης της οπτικής πυκνότητας του δείγματος, όταν αυτό μετράται από τον ανιχνευτή του φωτομέτρου. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να φιλτράρεται το διάλυμα χρωστικής πριν τη χρήση, καθώς εμφανίζει την τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων με την πάροδο του χρόνου. Επίσης, τα πρωτεϊνικά δείγματά μας θα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από αδιάλυτα σωματίδια (μεμβράνες κ.λπ). Τέλος, η φωτομέτρηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί το πολύ μέσα σε 30 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος χρωστικής στα δείγματα, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός μεγάλων συσσωματωμάτων χρωστικής-πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να δώσουν για μια ακόμη φορά ψευδώς μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα.

2.6. Άλλες μέθοδοι υπολογισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα

Πέραν της μεθόδου Bradford, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα, με υπολογιστικές μεθόδους, οι οποίες όμως είναι προσεγγιστικές κατά κύριο λόγο και βασίζονται εν πολλοίς στην ύπαρξη προτύπου γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, για έμμεσο υπολογισμό της συγκέντρωσης στα άγνωστα δείγματα. Ο υπολογισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μετρώντας την ένταση του χρώματος μετά από χρώση της πηκτής ή του φύλλου νιτροκυτταρίνης (μετά από μεταφορά σε αυτό των πρωτεϊνών) με τον τρόπο που θα αναφερθεί παρακάτω (ενότητα 2.13), ή τον αριθμό των “pixels” που καταλαμβάνει μια ζώνη μετά από ανοσοαποτύπωση και φωτογράφιση σε υπολογιστή.

Οι μέθοδοι αυτές, λόγω της προσεγγιστικότητάς τους δεν χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, αλλά κυρίως για έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων στην πηκτή, δηλαδή τη διαβεβαίωση ότι έχουμε την ίδια ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα, προκειμένου να μπορούμε να τα συγκρίνουμε.

2.7. Συμπύκνωση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ (TCA precipitation)

Για τη μείωση του όγκου ενός δείγματος προκειμένου να γίνει πιο συμπυκνωμένο σε πρωτεΐνες ακολουθήσαμε τη διαδικασία συμπύκνωσης με τριχλωροξικό οξύ.

Σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί διάλυμα φόρτωσης προσθέτουμε τόσο τριχλωροξικό οξύ (Ferak - #01 576), μέχρι αυτό να αραιωθεί στο

25% και αφήνουμε το δείγμα για επώαση σε παγόνερο στους 4° C. Μετά το πέρας του χρόνου, φυγοκεντρούμε σε πλήρη ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο erppendorf για 1 min στους 4° C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, αναδιαλύουμε το ίζημα σε κρύα ακετόνη (Riedel-de Haën - #32201) και αναδεύουμε ισχυρά σε vortex προκειμένου να καθαρίσει η ακετόνη την περίσσεια του TCA που τυχόν έχει μείνει στο δείγμα. Επαναφυγοκεντρούμε ακολούθως σε μικροφυγόκεντρο για 5 min σε πλήρη ταχύτητα στους 4° C, απομακρύνουμε εκ νέου το υπερκείμενο και ξηραίνουμε τα υπολείμματα της ακετόνης σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (Speedvac Concentrator SVC100H – Savant Instruments Inc, NY) για όση ώρα χρειαστεί. Τελειώνοντας, αναδιαλύουμε το εναπομείναν ίζημα (συμπυκνωμένες πρωτεΐνες) στον επιθυμητό όγκο διαλύματος φόρτωσης 1x, πιπετάροντας αρκετές φορές, καθώς το ίζημα είναι αρκετά συμπαγές.

Επειδή μερικές φορές το διάλυμα φόρτωσης μπορεί να αλλάξει pH εξαιτίας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία και να αποκτήσει πορτοκαλί χρώμα, αντί του σύνηθους κυανού χρώματος, επαναφέρουμε το pH στο σωστό επίπεδο εισάγοντας στο δείγμα την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Tris 1 M, το οποίο δεν έχει pH-μετρηθεί.

2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (Laemmli, 1970). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων σχηματίζεται κενό με τη βοήθεια ειδικών διαχωριστικών (spacers) μεταβλητού πάχους (συνήθως 1 mm) (Bio-Rad - #1652932), ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε. Στο διάμεσο του κενού αυτού στοιβάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο μέρη:

- i) την πηκτή επιστοίβαξης (ddH₂O, 17% v/v Acrylamide mix (30% w/v acrylamide – Sigma – #A8887 και 0.8% w/v methylene-bis-acrylamide – Fluka - #66667), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% w/v SDS, 1% w/v APS, 0.1% v/v TEMED) με μεγάλο μέγεθος πόρων
- ii) την πηκτή διαχωρισμού, με μεταβλητή τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου από 6% έως 15% και μικρότερο μέγεθος πόρων. Για τις περισσότερες πρωτεΐνες χρησιμοποιούμε πηκτή με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 10% (ddH₂O, 33% v/v Acrylamide mix, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% w/v SDS, 1% w/v APS, 0.1% v/v 0.04% v/v TEMED), ενώ για μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες χρησιμοποιούμε πηκτή με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 15% (ddH₂O, 50% v/v Acrylamide mix, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% w/v SDS, 1% w/v APS, 0.04% v/v TEMED)

Τα δύο τελευταία συστατικά της πηκτής (ammonium persulfate – Sigma #A3678, TEMED – Sigma #T8133) επιταχύνουν τον πολυμερισμό της. Ο πολυμερισμός επιταχύνεται επιπλέον με τοποθέτηση της διάταξης σε θερμοκρασία 37° C.

Η φόρτωση της επιθυμητής ποσότητας των δειγμάτων στην πηκτή γίνεται με σύριγγα Hamilton 50 μl (#705N) μετά από θέρμανσή τους όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 60 mAmp (120 mAmp στην περίπτωση που θα τρέξουμε ταυτόχρονα δύο πηκτές), ή στα 100 V, για περίπου δύο ώρες σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer – 1,414% w/v glycine, 0.302% w/v Trizma base και 0.1% w/v SDS).

2.9. Μεταφορά πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αποσυναρμολογούμε τη διάταξη στην οποία αυτή πραγματοποιήθηκε και οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman - #10 401 196), με τον τρόπο που θα αναφερθεί αμέσως ακολούθως.

Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς (0.58% w/v Tris, 0.292% w/v γλυκίνη και 20% v/v μεθανόλη) προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι πρωτεΐνες και να αποφευχθεί η διάχυσή τους εντός της πηκτής. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και 4 κομμάτια ανά πηκτή διηθητικού χαρτιού whatman 3 mm (#3030 917) διαστάσεων 8.4 cm x 5.5 cm (οι διαστάσεις της πηκτής – mini gel – που χρησιμοποιούμε), καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης ιδίων διαστάσεων ανά πηκτή, το οποίο πρέπει να παραμείνει εντός του διαλύματος για 10 min προκειμένου να ενυδατωθεί επαρκώς. Ακολούθως, τοποθετούμε τα παραπάνω στην κάθοδο συσκευής ημίξηρης μεταφοράς (Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell – Bio-Rad, U.S.A.) με την εξής σειρά: 2 φύλλα whatman, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πηκτή πολυακρυλαμιδίου, 2 φύλλα whatman. Πριν να τοποθετηθεί η άνοδος της συσκευής πάνω από τη διάταξη, διώχνουμε τυχόν φυσαλίδες που ενδέχεται να παρεμποδίσουν την απρόσκοπτη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή προς τη μεμβράνη. Διαβράχουμε και τα δύο ηλεκτρόδια με το διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό (PowerPac HC – Bio-Rad, Singapore) στα 15 V για 30 min.

Στην περίπτωση που έχουμε πολύ μικρή ποσότητα πρωτεΐνης που θέλουμε να ελέγξουμε, επειδή η ημίξηρη μέθοδος μεταφοράς έχει απώλειες, χρησιμοποιούμε την υγρή μέθοδο μεταφοράς. Το διάλυμα μεταφοράς είναι κι εδώ το ίδιο, όπως και οι διαστάσεις των φύλλων whatman, της πηκτής και της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, εφόσον βέβαια ομιλούμε για την περίπτωση mini-gel, αλλά και η διάταξη των επιμέρους τμημάτων. Διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι σε κάθε στάδιο της μεταφοράς όλα τα επιμέρους στοιχεία παραμένουν εμβαπτισμένα στο διάλυμα μεταφοράς, αυξάνεται η ένταση του ρεύματος στα 200 mA για χρόνο 45 min, ενώ το διάλυμα μεταφοράς εντός της συσκευής (Criterion Blotter – Bio-Rad) αναδεύεται διαρκώς σε μαγνητικό αναδευτήρα (MR 0 – Heidolph, Germany) προκειμένου να κατανέμεται ομοιόμορφα η θερμότητα που δημιουργείται λόγω της αυξημένης έντασης ρεύματος και ψύχεται προκειμένου να μην αυξηθεί ανεξέλεγκτα η θερμοκρασία του.

2.10. Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με χρωστική coomassie blue

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, πριν (εάν δεν επιθυμούμε περαιτέρω ανάλυση των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση) ή και μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης, οι πρωτεΐνες που έχουν διατρέξει την πηκτή γίνονται ορατές μετά από χρώση σε διάλυμα coomassie brilliant blue (0.25% w/v coomassie brilliant blue G250 (Fluka - #27815), 9.2% v/v οξικό οξύ, διάλυμα μεθανόλης 50%) για τουλάχιστον 2 ώρες.

Επειδή η παραμονή στο διάλυμα χρώσης βάφει ολόκληρη την πηκτή, είναι απαραίτητος ο αποχρωματισμός της, προκειμένου να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών, οι οποίες παραμένουν χρωματισμένες. Ο αποχρωματισμός πραγματοποιείται σε διάλυμα αποχρωματισμού 25% v/v μεθανόλης – 7% v/v οξικού οξέως υπό ολονύκτια ανάδευση (περιστροφικός αναδευτήρας RO 2 – Gerhardt, Germany). Μετά την πάροδο 2 ωρών στο διάλυμα αποχρωματισμού, προκειμένου να

επιταχυνθεί η διαδικασία, μπορεί να πραγματοποιηθεί αλλαγή του διαλύματος αποχρωματισμού, με την προσθήκη απορροφητικού χαρτιού, το οποίο τραβάει την περίσσεια της χρωστικής.

2.11. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στο φύλλο νιτροκυτταρίνης, η μεμβράνη μεταφέρεται σε 3% w/v φρέσκου διαλύματος μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη (Carnation, Non fat dry milk, Nestle, Switzerland), διαλυμένου σε PBS 1x (διάλυμα μπλοκαρίσματος – blocking buffer) όπου και παραμένει υπό ολονύκτια ανάδευση στους 4° C προκειμένου να καλυφθούν οι θέσεις της μεμβράνης στις οποίες δεν υπάρχουν πρωτεΐνες και θα μπορούσαν να δώσουν μη ειδικές συνδέσεις κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης. Πιο σύντομα, η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε 10% διάλυμα γάλακτος σε PBS 1x, όπου παραμένει η μεμβράνη υπό ανάδευση για 60 min.

Ακολούθως, η μεμβράνη εκπλένεται 2 φορές με PBS 1x. Η διάρκεια της κάθε έκπλυσης είναι 5 min, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος μπλοκαρίσματος.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η επώαση με το επιθυμητό πρωτεΐον αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, στην κατάλληλη αραίωση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη 3% w/v διάλυματος BSA σε PBS 1x. Αναλόγως του τίτλου του αντισώματος, αλλά και της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης εντός του δείγματος, μπορούμε να επώασουμε για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ή στους 4° C υπό ολονύκτια ανάδευση.

Προκειμένου να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη η περίσσεια του πρωτεΐοντος αντισώματος, το οποίο δεν προσδέθηκε με την πρωτεΐνη, εκπλένεται η μεμβράνη υπό ανάδευση 2 φορές με διάλυμα 0.05% v/v Tween 20 σε PBS 1x, για 5 λεπτά κάθε φορά και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Η επώαση πραγματοποιείται μέσα σε διάλυμα 2.5% w/v μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη, διαλυμένου σε PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί 60 min. Το δευτερογενές αντίσωμα, φέρει συζευγμένη την υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP), η οποία μετά από αντίδραση με υπεροξειδίο του υδρογόνου δίνει πράσινο φθορισμό, λόγω αντίδρασης χημειοφωταύγειας.

Στην παράγραφο αυτή παρατίθεται μια λίστα με τα αντισώματα (πρωτεύοντα και δευτερεύοντα – συζευγμένα με HRP), που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την επαγόμενη Hsp70: (Enzo Life Sciences - #ADI-SPA-810, κλώνος C92F3A-5), αραίωση 1:5000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη συνεχώς εκφραζόμενη Hsc70: (Stressgen - #SPA-815, κλώνος 1B5), αραίωση 1:5000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα από κύτταρα υβριδώματος που αναγνωρίζει τα τελευταία 15 αμινοξέα του C-τελικού άκρου της ανθρώπινης p14^{ARF} (ευγενική προσφορά της Dr. Karen Vousden – The Beatson Institute for Cancer Research, UK), αραίωση 1:1000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη β-κατενίνη: (BD Transduction Laboratories - # 610154, κλώνος 14), αραίωση 1:2000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ασκίτες ποντικού που αναγνωρίζει την α-τουμπουλίνη: (Sigma - #T5168, κλώνος B-5-1-2), αραίωση 1:5000

- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ασκίτες ποντικού που αναγνωρίζει τη β-ακτίνη: (Sigma - #A5441, κλώνος AC-15), αραιώση 1:5000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την ενεργό μορφή της κασπάσης-3: (BD Pharmingen - #559565, κλώνος C92-605), αραιώση 1:500
- Δευτερογενές αντίσωμα από κατσίκα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες ποντικού, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Goat anti-mouse IgG H+L HRP conjugated): (Pierce - #31430), αραιώση 1:10000
- Δευτερογενές αντίσωμα από κατσίκα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κουνελιού, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Goat anti-rabbit IgG H+L HRP conjugated): (Pierce Biotechnology - #31460), αραιώση 1:3000 έως 1:8000
- Δευτερογενές αντίσωμα από γάιδαρο ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κατσίκας, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Donkey anti-goat IgG H+L HRP conjugated): (Jackson Immunoresearch - #705-035-003), αραιώση 1:12000
- Δευτερογενές αντίσωμα από κατσίκα, ειδικό για ανοσοσφαιρίνες επίμους, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Goat anti-rat IgG H+L HRP conjugated): (Pierce Biotechnology - #31470), αραιώση 1:10000

2.12. Εμφάνιση των αντιγόνων με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)

Μετά και την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη εκπλένεται 2 φορές όπως και προηγούμενα με διάλυμα 0.05% v/v Tween 20/PBS 1x και ακολουθεί η εφαρμογή της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, προκειμένου να εμφανισθούν οι ζώνες των επιθυμητών πρωτεϊνών. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αυτή που συνιστάται από την κατασκευάστρια εταιρία στο φύλλο οδηγιών του αντιδραστηρίου ECL (Thermo Scientific - #34080).

Η μέθοδος ECL είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP) σε συνθήκες ανοσοαποτύπωσης. Η ικανότητα ανίχνευσης ενός αντιγόνου με τη μέθοδο αυτή αγγίζει την τάξη του πικογραμμαρίου.

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ανάμιξη ίσων ποσοτήτων δύο αντιδραστηρίων, ενός υπεροξειδίου και ενός ενισχυτή σήματος. Το μίγμα των δύο αυτών αντιδραστηρίων αποχύνεται ομοιόμορφα πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επώάζεται για 5 min, οπότε και πραγματοποιείται η αντίδραση χημειοφωταύγειας μεταξύ του υπεροξειδίου και της HRP. Ακολούθως, αποστραγγίζεται η περίσσεια του μίγματος ECL και τοποθετείται η μεμβράνη στην ειδική τράπεζα που φέρει η συσκευή εμφάνισης (Molecular Imager ChemiDOC XRS Imaging System – Bio-Rad, USA).

Ο ανιχνευτής του μηχανήματος εμφάνισης ρυθμίζεται σε πρώτο βήμα στη μέγιστη ευαισθησία, οπότε και μπορεί να ανιχνεύσει το φθορισμό που δίνει η χημειοφωταύγεια. Σαν δεύτερο βήμα, καθορίζουμε τον τρόπο εμφάνισης, ο οποίος μπορεί να είναι αυτόματος, οπότε η εμφάνιση σταματά μόλις ο ανιχνευτής αντιληφθεί κορεσμό του σήματος. Υπάρχει και η δυνατότητα ρυθμιζόμενης εμφάνισης, είτε καθορίζοντας εξαρχής τον επιθυμητό χρόνο λήψης της φωτογραφίας από το σύστημα, είτε ρυθμίζοντας επιθυμητό χρόνο έναρξης και λήξης της έκθεσης και καθορίζοντας τον αριθμό των φωτογραφιών που επιθυμούμε να λάβει το σύστημα, επιτρέποντας έτσι τη λήψη διαδοχικών χρονικών εικόνων, με τις οποίες μπορούμε να ελέγξουμε

τον τρόπο που εξελίσσεται η χημειοφωταύγεια με την πάροδο του χρόνου που έχουμε θέσει.

Μετά το πέρας της εμφάνισης, η μεμβράνη επανεκπλένεται από το ECL με Tween 20, όπως και πριν και είτε φυλάσσεται για μελλοντική χρήση σε PBS 1x στους 4° C, είτε επωάζεται με νέο αντίσωμα (reprobing).

2.13. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με Ponceau S

Προκειμένου να ελέγξουμε εάν έχει πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στο φύλλο νιτροκυτταρίνης, μπορούμε να βάψουμε τη μεμβράνη με διάλυμα Ponceau S (Sigma – P3504) (2% w/v Ponceau S, 50% v/v TCA και 30% w/v θειο-σαλικυλικό οξύ - Sigma #S3147). Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής έναντι άλλων τεχνικών χρώσης της μεμβράνης έγκειται στην ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της μεμβράνης, καθώς η χρωστική απομακρύνεται πλήρως από τη μεμβράνη μετά από πλύσεις με PBS 1x.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο και εμβαπτίζεται μέσα σε διάλυμα ponceau, όπου και παραμένει υπό ανάδευση για 5 min. Αφού ολοκληρωθεί η χρώση της μεμβράνης, η χρωστική επιστρέφεται στο δοχείο της και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται με σταδιακό αποχρωματισμό αυτής με τη χρήση δις-απεσταγμένου νερού μέχρι του επιθυμητού βαθμού αποχρωματισμού. Ο πλήρης αποχρωματισμός επιτυγχάνεται όπως προαναφέρθηκε με διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης υπό ανάδευση με PBS 1x.

2.14. Μη αποδιατακτική ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Non-denaturing immunoprecipitation)

Προκειμένου να ελέγξουμε τυχόν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις εξεταζόμενες πρωτεΐνες, χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της ανοσοκαθίζησης.

Λαμβάνεται το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα όπως αναφέρθηκε προηγουμένα από κύτταρα που έχουν φτάσει σε 100% πληρότητα σε τρυβλίο 10 cm. Στο εκχύλισμα αυτό προσθέτουμε 20 μl σφαιριδίων σεφαρόζης (GE Healthcare - #17-0618-01), που φέρουν στην επιφάνειά τους συζευγμένη πρωτεΐνη G και αφήνεται υπό ανακίνηση (Rotary Shaker ABT-4 – SBS Instruments S.A., Spain) στους 4° C για 2 ώρες, προκειμένου να εξαλειφθεί η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που θα μπορούσαν δυνητικά να προσδεθούν μη ειδικά στην πρωτεΐνη G (προ-προσρόφηση κυτταρικού εκχυλίσματος). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2.500 rpm, στους 4° C για 5 min.

Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προστίθεται ποσότητα 1 μg ειδικού αντισώματος έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης διαλυμένου σε BSA (1 mg/ml) για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Το δείγμα επωάζεται ολονύκτια υπό ανακίνηση, στους 4° C. Ακολούθως προστίθενται 20 μl εναιωρήματος σφαιριδίων σεφαρόζης/πρωτεΐνης G και η επώαση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για επιπλέον 2 hr. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2.500 rpm, στους 4° C για 5 min. Το υπερκείμενο (μη δεσμευμένη πρωτεΐνη) συλλέγεται, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για τον τελικό προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που δεσμεύτηκε στο αντίσωμα. Το ίζημα υφίσταται 3 διαδοχικές εκπλύσεις με 1 ml διαλύματος RIPA κάθε φορά και κάτω από τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, όπως και προηγουμένως, προκειμένου να απομακρυνθεί η ποσότητα του ασύζευκτου αντισώματος. Μετά το τέλος των εκπλύσεων, το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα επαναιωρείται σε 40 μl διαλύματος φόρτωσης πυκνότητας 1,5x και υφίσταται

βρασμό στους 100° C και ισχυρή ανάδευση ώστε να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια σεφαρόζης.

Πριν από τη φόρτωση του δείγματος στην πηκτή, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 5 sec σε μικροφυγόκεντρο erppendorf έτσι ώστε να ιζηματοποιηθούν πάλι τα σφαιρίδια τα οποία μπορούν να παρεμποδίσουν την ομαλή ροή των πρωτεϊνών εντός της πηκτής και να μείνουν στο υπερκείμενο οι πρωτεΐνες.

2.15. Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σε κυτταρικό παρασκεύασμα (Indirect cell immunofluorescence)

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των εξεταζομένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Στην τεχνική αυτή, κύτταρα τοποθετούνται πάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες 2x2 cm (Deltalab - #D102222) εντός τρυβλίου διαμέτρου 3.5 cm, σε πυκνότητα 100.000 κύτταρα/καλυπτρίδα και αφήνονται να πολλαπλασιαστούν για μία ημέρα.

Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος PBS 1x. Κατόπιν τα κύτταρα μονιμοποιούνται για 10 min σε διάλυμα 2% w/v παραφορμαλδεΐδης (Riedel-de Haën - #16005) σε PBS 1x, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μονιμοποίησή τους, τα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα PBS 1x και επωάζονται με παγωμένη καθαρή μεθανόλη για 5 min στους -20° C προκειμένου να ανοίξουν πόροι στην πυρηνική μεμβράνη. Ακολουθεί ξανά έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS 1x και επώαση αυτών με διάλυμα 3% w/v BSA σε PBS 1x για 60 mins σε θερμοκρασία δωματίου, για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.

Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες επωάζονται με κατάλληλη αραίωση του ειδικού αντισώματος, έναντι της πρωτεΐνης που εξετάζουμε, σε διάλυμα 1% w/v BSA σε PBS 1x, για 60 min στους 37° C σε ατμόσφαιρα με υγρασία, προκειμένου να μη στεγνώσει το παρασκεύασμα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-Hsp70 (1:200) και anti-p14^{ARF} (1:200).

Ακολουθεί ξανά έκπλυση των καλυπτρίδων 3 φορές με διάλυμα PBS 1x και επώαση αυτών με κατάλληλη αραίωση του δευτερογενούς αντισώματος, ειδικού έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους προέλευσης του πρώτου αντισώματος και συγκεκριμένα anti-mouse IgG συζευγμένο με ισοθιοκυανιλική φλουοροσκεΐνη (FITC) (Sigma - #F5897) για πράσινο φθορισμό σε αραίωση 1:400 ή Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG (Invitrogen - #A11036) για κόκκινο φθορισμό σε αραίωση 1:100. Η επώαση του αντισώματος γίνεται υπό τις ίδιες συνθήκες και στα ίδια διαλύματα όπως και το πρωτεύον αντίσωμα.

Τέλος οι καλυπτρίδες εκπλένονται όπως και πριν με διάλυμα PBS 1x, μεταφέρονται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Isolab Laborgeräte) οι οποίες έχουν εμποτιστεί με μια σταγόνα Vectashield (Vector Laboratories - #H-1000) προκειμένου να αποφευχθεί το ξεθώριασμα του χρώματος και ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS SPE – Leica Microsystems, Germany).

2.16. Έμμεσος ανοσοφθορισμός ιστών και χρώση πυρηνικού DNA

Εκτός από τα ζωντανά κύτταρα, ανοσοφθορισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε κρυοτομές ιστών. Στην προκειμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε καρδιακό ιστό για τη μελέτη ενεργοποίησης της p53 μέσω φωσφορυλίωσης, αλλά και χρώση του πυρηνικού DNA. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Cell Signaling, με ορισμένες τροποποιήσεις, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο.

Αρχικά, ξεπλένουμε τις καλυπτρίδες 3 φορές από 5 min με TBS (50 mM Tris και 150 mM NaCl pH 7.6). Μονιμοποιούμε τις τομές με επώαση σε 4% w/v παραφορμαλδεϋδη σε TBS για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Εκπλένουμε όπως και πριν και καθιστούμε περατές τις μεμβράνες με επώαση σε παγωμένη μεθανόλη στους -20° C για 5 min. Επαναλαμβάνουμε την έκπλυση και μπλοκάρουμε τις τομές για 60 min στους 37° C με τη βοήθεια 3% w/v BSA σε TBS, με την προσθήκη 1 mg/ml RNAάσης A. Ακολούθως επωάζουμε ολονύκτια στους 4° C με το πρωτεΐν αντισώμα (phospho-p53 (Ser15) – Cell Signaling - #9284), σε αραιώση 1:400 σε TBS. Εκπλένουμε την περίσσεια του αντισώματος όπως και προηγούμενα και προσθέτουμε το δεύτερογενές αντίσωμα (Alexa Fluor 568 – Invitrogen #A11036), που δίνει κόκκινη χρώση, σε αραιώση 1:100 σε TBS, παράλληλα με τη χρωστική SYBR Green I (Sigma - #S9430), που βάφει το δίκλωνο DNA πράσινο, σε αραιώση 1:500000 και επωάζουμε για 2 ώρες. Εκπλένουμε εκ νέου 3 φορές από 5 min, απομακρύνουμε την περίσσεια υγρασίας και καλύπτουμε τις κεχρωσμένες τομές με καλυπτρίδες, στις οποίες έχουμε ρίξει Vectashield για να αποφύγουμε το ξεθώριασμα των χρωμάτων. Τα δείγματα είναι έτοιμα για άμεση παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο, ή μπορούμε να τα αποθηκεύσουμε στους -30° C για μελλοντική παρατήρηση.

2.17. Συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal microscopy)

Η πρώτη σύλληψη της συνεστιακής μικροσκοπίας πραγματοποιήθηκε το 1953 και έλαβε πατέντα το 1957. Ο πρωτεργάτης της ιδέας αυτής ήταν ο Marvin Minsky. Η συνεστιακή μικροσκοπία ανιχνεύει δομές συλλέγοντας φως από ένα μοναδικό εστιακό πλάνο του δείγματος, αποκλείοντας τις δέσμες φωτός που είναι εκτός εστίασης, σε αντίθεση με το συμβατικό ευρέου πεδίου μικροσκοπίου φθορισμού, στο οποίο ολόκληρο το δείγμα φωτίζεται ταυτόχρονα από την πηγή φωτός, δίνοντας το λεγόμενο θόρυβο (Kehrel, 1999).

Στο συνεστιακό σύστημα σημειακής ανίχνευσης, οι φακοί του μικροσκοπίου εστιάζουν τη δέσμη του λέιζερ σε ένα σημείο πάνω στο δείγμα σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή (εστιακό σημείο). Το λέιζερ μετακινείται ταχύτατα από σημείο σε σημείο για να παράγει την τελική εικόνα. Τόσο η φωτεινή δέσμη λόγω φθορισμού, όσο και το ανακλώμενο φως από το δείγμα επιστρέφουν και περνούν μέσα από τον αντικειμενικό φακό (Kehrel, 1999).

Το μικροσκόπιο και τα οπτικά συστήματα της μονάδας σάρωσης εστιάζουν το φθορίζον φως από το εστιακό σημείο σε ένα δεύτερο σημείο που καλείται συνεστιακό σημείο. Η οπή του διαφράγματος που βρίσκεται στο συνεστιακό σημείο επιτρέπει να περάσει το φως από το εστιακό σημείο προς τον ανιχνευτή. Οποιοδήποτε φως εκπέμπεται εκτός του εστιακού σημείου απορρίπτεται από την οπή (Kehrel, 1999).

Όπως και στα συμβατικά μικροσκόπια φθορισμού, χρησιμοποιείται ένας μόνο φακός τόσο ως συγκεντρωτικός, όσο και ως αντικειμενικός, απαλοίφοντας την ανάγκη του ακριβούς ταιριάσματος και ομο-προσανατολισμού των δύο φακών. Μια

ευθυγραμμισμένη, πολωμένη δέσμη λέιζερ από μια οπή ανακλάται από ένα διχρωμικό κάτοπτρο προς το οπίσθιο μέρος του αντικειμενικού φακού και εστιάζεται στο δείγμα. Το ανακλωμένο ή εκπεμπόμενο, μεγαλύτερου μήκους κύματος φθορίζον φως που επιστρέφει από το δείγμα, διέρχεται ξανά από τον ίδιο φακό. Η φωτεινή δέσμη εστιάζεται σε ένα μικρό διάφραγμα προκειμένου να απαλοιφεί το μη εστιασμένο φως (φως το οποίο προέρχεται από περιοχές του δείγματος πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης). Το πάχος της οπτικής τομής εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως η μεταβλητή διάμετρος του διαφράγματος. Οι εστιασμένες πληροφορίες από κάθε σημείο του δείγματος καταγράφονται από ένα φωτοευαίσθητο ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστή) που βρίσκεται πίσω από τη συνεστιακή οπή και το αναλογικό σήμα που προκύπτει ψηφιοποιείται και αποστέλλεται σε έναν υπολογιστή (Kehrel, 1999).

Μέχρι 4 ανιχνευτές παρέχουν την ταυτόχρονη συλλογή πολλαπλών σημάτων με επακόλουθη συνδυασμένη απεικόνιση. Εφόσον η ακτίνα επηρεάζει ταυτόχρονα όλους τους ανιχνευτές, οι ανασκευασμένες εικόνες συνδέονται τέλεια μεταξύ τους. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη παρατήρηση δύο ή και περισσότερων φθοριοχρωμάτων (Kehrel, 1999).

Για να ανοίξουμε το συνεστιακό μικροσκόπιο, προκειμένου να παρακολουθήσουμε κάποιο δείγμα πρέπει να ακολουθήσουμε την εξής διαδικασία:

- Ανοίγουμε τον ενσωματωμένο διακόπτη του μικροσκοπίου για τη φωτεινή πηγή και τη χειροκίνητη εστίαση.
- Ανοίγουμε την εξωτερική πηγή για τη λάμπα του υπεριώδους φωτός
- Ανοίγουμε το διακόπτη ψύξης του λέιζερ
- Γυρνάμε το κλειδί έναρξης του λέιζερ
- Ανοίγουμε το διακόπτη των ηλεκτρονικών
- Ανοίγουμε τις οθόνες και τον υπολογιστή
- Ξεκινάμε το λογισμικό του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Για την παρατήρηση δειγμάτων, θα πρέπει να προετοιμάσουμε τις ρυθμίσεις του μικροσκοπίου μέσα από το λογισμικό. Συγκεκριμένα, από την επιλογή “beam” ρυθμίζουμε το μήκος κύματος σάρωσης στο “FITC/TRITC”, ρυθμίζουμε το φακό στο 63x, το μέγεθος της εικόνας στο 512x512 pixels, τον άξονα σάρωσης στο xyz, τη μεγέθυνση στο 1 και το διάφραγμα στο “Airy 1”.

Για να φωτογραφήσουμε το δείγμα, βάζουμε λάδι στον επιλεγμένο φακό, τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα αντεστραμμένη στην ειδική θέση του μικροσκοπίου και περιστρέφουμε το δίσκο στο φίλτρο που θέλουμε (FITC, TRITC κ.λπ). Παρατηρούμε το δείγμα και τραβάμε το έμβολο που στέλνει τη δέσμη στον ανιχνευτή για φωτογράφιση. Παράλληλα, περιστρέφουμε το δίσκο στη θέση “scan”. Ρυθμίζουμε τα όρια φωτογράφισης από το “z-position” και τσεκάρουμε το “begin” για την αρχή των τομών και το “end” για το πέρας. Ρυθμίζουμε την ένταση του λέιζερ από το διακόπτη έτσι ώστε η ένδειξη να δείχνει στο «παρά τέταρτο» και από τα PMT 2 και 3 αυξάνουμε ή μειώνουμε την ένταση του κάθε λέιζερ (πράσινο και κόκκινο αντίστοιχα). Για να έχουμε πιο ευκρινείς εικόνες, ρυθμίζουμε το “averaging” από 4 έως 8. Με τον τρόπο αυτό καθορίζουμε πόσες φορές θα φωτογραφηθεί η κάθε τομή, έτσι ώστε να έχουμε όσο το δυνατό μέγιστο αριθμό πληροφοριών. Από τη ρύθμιση “section” ρυθμίζουμε το πάχος της τομής στα 0.35 μm και φωτογραφίζουμε πατώντας το κουμπί “series” στο λογισμικό για διαδοχικές τομές ή το κουμπί “single scan” για μεμονωμένη φωτογραφία.

Θα πρέπει να προσέξουμε, καθώς το μικροσκόπιο έχει ορισμένους περιορισμούς στη λειτουργία του. Συγκεκριμένα, δεν πρέπει να δουλεύει πάνω από 10 ώρες ημερησίως. Επιπλέον, εάν ανοιχτεί το σύστημα, θα πρέπει να παραμείνει ανοικτό για τουλάχιστον 3 ώρες. Τέλος, μετά το κλείσιμο του συστήματος, οι

ανεμιστήρες του εξαερισμού θα πρέπει να παραμείνουν ανοικτοί για τουλάχιστον 30 λεπτά.

2.18. Απομόνωση πυρηνίσκων σε βαθμίδωση σακχαρόζης

Για την απομόνωση των πυρηνίσκων, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Scherl et al., 2002, με τις κατάλληλες τροποποιήσεις όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο για τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες.

Συλλέγουμε τα κύτταρα από 4 τρυβλία των 10 cm πληρότητας 80% σε παγωμένο PBS 1x και τα φυγοκεντρούμε στα 500 g για 5 min. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1.5 ml υποτονικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl και 1 mM MgCl₂) και αφήνονται στον πάγο για 30 min προκειμένου να υποστούν οσμωτική λύση. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε δείγμα μίγμα αναστολέων πρωτεόλυσης (1 μg πεπστατίνη A (Sigma - #P5318), 1 μg λευπεπτίνη (Sigma - #L2023), 1 mM PMSF (Sigma - #P7626) και η λύση υποβοηθάται με την προσθήκη 0.004% v/v Nonidet P-40 (NP40) (Roche Applied Science - #11754599001) και ομογενοποίηση (RZR 0 – Heidolph, Germany). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1.200 g για 3 min και οι πυρήνες (ίζημα) επαναιωρούνται σε 500 μl διαλύματος 0.25 M σακχαρόζης με περιεκτικότητα 10 mM MgCl₂, ενώ το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Οι πυρήνες καθαρίζονται, περνώντας τους από 500 μl διαλύματος 0.88 M σακχαρόζης με περιεκτικότητα 0.05 μM MgCl₂, αφού φυγοκεντρηθούν στα 1.200 g για 10 min. Οι καθαροί πυρήνες επαναιωρούνται σε 250 μl διαλύματος 0.34 M σακχαρόζης περιεκτικότητας 0.05 mM σε MgCl₂, με την προσθήκη 2 U απυράσης (Sigma - #A6410) και η πυρηνική μεμβράνη τους διασπάται με τρία σετ υπέρηχων των 30 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις του 1 min για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του δείγματος. Το διάλυμα που προκύπτει μετά τους υπέρηχους, το περνάμε από ένα στρώμα 250 μl διαλύματος 0.88 M σακχαρόζης, περιεκτικότητας 0.05 μM σε MgCl₂ φυγοκεντρώντας στα 2.000 g για 20 min, ώστε να καθαριστούν οι πυρηνίσκοι από το πυρηνόπλασμα.

Το υπερκείμενο (πυρηνόπλασμα) απορρίπτεται, ενώ οι καθαροί πυρηνίσκοι (ίζημα) φυλάσσονται για περαιτέρω ανάλυση.

2.19. Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων πυρηνίσκων σε πηκτή αγαρόζης (Nucleolar Comet Assay, NCA)

Η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω, αποτελεί τροποποίηση της τεχνικής ανίχνευσης κομητών (comet assay) σε ολόκληρα κύτταρα (Collins et al., 1995), προσαρμοσμένη για τη χρησιμοποίηση πυρηνίσκων.

Οι πυρηνίσκοι που απομονώθηκαν με τον τρόπο που αναφέρθηκε στην παραπάνω ενότητα (2.18) επαναιωρούνται σε 100 μl 1.5% w/v αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (L.M.P. Agarose) (Invitrogen - #155517-014) σε PBS, pH 7.4, στους 37° C. Τα δείγματα με την αγαρόζη τοποθετούνται με πιπέτα επάνω σε αντικειμενοφόρο που έχει επικαλυφθεί με μια στρώση 1% w/v αγαρόζης κανονικού σημείου τήξεως σε PBS και αμέσως τοποθετούμε από πάνω μια καλυπτρίδα χωρίς να την πιέσουμε.

Για να στρώσουμε τις αντικειμενοφόρους το διάλυμα κανονικής αγαρόζης θερμαίνεται σε ποτηράκι ζέσεως και το ύψος του όγκου του διαλύματος φροντίζουμε να είναι ίσο με το ύψος της καλυπτρίδας, έτσι ώστε όταν βουτήξουμε την αντικειμενοφόρο μέσα στο διάλυμα της κανονικής αγαρόζης να σχηματιστεί μια

πλάκα διαστάσεων ίδιων με αυτές της καλυπτρίδας. Σκουπίζουμε το κάτω μέρος των αντικειμενοφόρων και αφήνουμε να στεγνώσουν καλά. Το όλο σύνολο αφήνεται στους 4° C για 10 min και στη συνέχεια αφαιρούνται οι καλυπτρίδες προσεκτικά και εμβαπτίζονται σε διάλυμα λύσης (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris και 1% v/v Triton X-100) που έχει ρυθμιστεί σε pH 10, στους 4° C για 60 min, προκειμένου να απομακρυνθούν οι κυτταρικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια το σύνολο πλένεται τρεις φορές με ψυχρό PBS pH 7.4 από 5 λεπτά η πλήση και τοποθετείται στο δοχείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής που φέρει φρέσκο ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (unwinding buffer - 0.3 M NaOH και 1 mM Na₂EDTA σε pH>13). Αφήνουμε για 40 min στους 4° C, στο σκοτάδι, γιατί το φως μπορεί να προκαλέσει φωτόλυση του DNA. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται με την ίδια φορά πάνω στη συσκευή.

Ηλεκτροφορούμε με το ίδιο διάλυμα στα 300 mA για 30 min σε θερμοκρασία 4° C, προσέχοντας κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η θερμοκρασία να μην ξεπεράσει τους 15° C.

Ακολούθως, οι αντικειμενοφόροι με τα δείγματα πλένονται με ψυχρό PBS pH 7.4 όπως και προηγούμενα, βάφονται με 50 μl DAPI (5 μg/ml σε PBS) και ξεπλένονται μία φορά για 5 mins σε ψυχρό PBS pH 7.4. Τελικώς, τα δείγματα παρατηρούνται στο φωτόμετρο στα 350 nm και αναλύονται οι ουρές που προκύπτουν κατά την ηλεκτροφόρηση, προκειμένου να αποκαλυφθεί το μέγεθός τους.

2.20. Διαδικασία δημιουργίας επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Competent cells)

Εμβολιάζουμε 50 ml βακτηριακής καλλιέργειας σε 20 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου καλλιέργειας βακτηρίων LB χωρίς αμικιλίνη κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Αφήνουμε την καλλιέργεια να αναπτυχθεί υπό ανάδευση στις 200 rpm σε θερμοκρασία 37° C σε τροχιακό επωαστήρα (Model G25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific Co. Inc, U.S.A.), έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έχει τιμή $A^{600} = 0.5 - 0.6$ (περίπου 2 ώρες). Μοιράζουμε το διάλυμα των 20 ml σε δύο φυγοκεντρικά σωληνάκια των 10 ml υπό άσηπτες συνθήκες. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 2 ml διαλύματος CaCl₂ (60 mM CaCl₂, 15% v/v γλυκερόλη, 10 mM PIPES) για κάθε σωληνάκι. Φυγοκεντρούμε στις 3.500rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε και πάλι τα κύτταρα σε 2 ml διαλύματος CaCl₂ για κάθε σωληνάκι. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 3.500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε διάλυμα CaCl₂ κατάλληλου όγκου ανάλογα με τον αριθμό των κλασμάτων (aliquots) που θέλουμε να δημιουργήσουμε μοιράζοντας τα κύτταρα (κάθε aliquot έχει όγκο 100 μl). Τέλος αποθηκεύουμε τα κλάσματα των επιδεκτικών κυττάρων στους -80° C.

2.21. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Τοποθετούμε τα κλάσματα με τα επιδεκτικά κύτταρα από τους -80° C που βρίσκονται αποθηκευμένα όπως αναφέρθηκε προηγούμενα (ενότητα 2.20) στον πάγο για να ξεπαγώσουν αργά. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 100 μl από κάθε κλάσμα σε

φυγοκεντρικό σωληνάκι των 10 ml και προσθέτουμε 1 µg πλασμιδίου. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι προκειμένου να μην καταστραφούν τα κύτταρα των οποίων οι κυτταρικές μεμβράνες είναι χαλαρές. Επωάζουμε για 30 min στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42° C σε υδατόλουτρο (U3/8 – Julabo Labortechnik, Germany), για καλύτερη κατανομή της θερμοκρασίας, για 2min, προκειμένου να εισέλθει το πλασμιδιακό DNA στον πυρήνα. Έπειτα τοποθετούμε στον πάγο για 1 min και στη συνέχεια προσθέτουμε 1 ml διαλύματος LB σε κάθε δείγμα το οποίο και αναδεύουμε ήπια με το χέρι. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 37° C σε υδατόλουτρο για 1 ώρα για να κλείσουν οι κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και να αναπτυχθούν τα βακτήρια. Κατόπιν απλώνουμε κάποια ποσότητα κυττάρων από το κάθε δείγμα (συνήθως 25-100 µl) σε τρυβλία με άγαρ (LB με την προσθήκη 15 g/l άγαρ) που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα από το κατάλληλο αντιβιοτικό αναλόγως του δείκτη επιλογής του πλασμιδιακού φορέα και επωάζουμε ολονύκτια σε κλίβανο στους 37° C έχοντας τα τρυβλία ανάποδα. Εάν επιθυμούμε να έχουμε αρνητικό μάρτυρα, τότε σε κάποιο δείγμα αντί για πλασμίδιο προσθέτουμε 1 µl ddH₂O.

2.22. Αλκαλική λύση βακτηρίων για εξαγωγή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep)

Μεταφέρουμε, υπό ασηπτικές συνθήκες, από κάθε τρυβλίο με άγαρ όπου έχουν αναπτυχθεί βακτηριακοί κλώνοι, μοναδιαίες αποικίες και εμβολιάζουμε την κάθε μια χωριστά σε 3 ml θρεπτικού μέσου LB, που περιέχει αντιβιοτικό σε κατάλληλη ποσότητα, σε σωληνάκι των 10 ml. Αφήνουμε την καλλιέργεια να αναπτυχθεί ολονύκτια υπό ανάδευση στις 200 rpm σε θερμοκρασία 37° C σε τροχιακό επωαστήρα. Τα τρυβλία από τα οποία λήφθησαν οι βακτηριακοί κλώνοι αποθηκεύονται στους 4° C, μέχρι να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του επιθυμητού πλασμιδιακού φορέα στις αποικίες που πήραμε και στη συνέχεια να αποθηκευτούν.

Από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια, παίρνουμε 1.5 ml και το τοποθετούμε σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια erpendorf των 2 ml. Η εναπομείνουσα καλλιέργεια μπορεί να αποθηκευτεί στους 4° C. Φυγοκεντρούμε για 2 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα (βακτηριακά κύτταρα) σε 100 µl Solution I (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl pH 8 και 10 mM EDTA pH 8), προσθέτουμε άμεσα 200 µl Solution II (200 mM NaOH και 1% v/v SDS) και αναμιγνύουμε. Τέλος, προσθέτουμε 150 µl Solution III (2.5 M NaAc pH 4.8) και αναστρέφουμε τα σωληνάκια προκειμένου να αναμιχθούν καλά τα διαλύματα. Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf και προσθέτουμε σε ίσους όγκους φαινόλη και διάλυμα χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) μέχρις όγκου 1 ml. Αναδεύουμε ισχυρά στο vortex επειδή τα διαλύματα δεν αναμιγνύονται εύκολα και κατόπιν φυγοκεντρούμε για 2 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να σχηματιστούν καθαρά οι δύο φάσεις. Η πάνω (υδατική) φάση που περιέχει το DNA μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι, ενώ η οργανική φάση (μεμβράνες, πρωτεΐνες) απορρίπτεται. Προκειμένου να καθαριστεί το DNA, στο σωληνάκι με την υδατική φάση προστίθενται 500 µl ισοπροπανόλης, αναμιγνύονται τα διαλύματα και αφήνεται το σωληνάκι σε ηρεμία για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να καθιζάνει το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα (DNA) επαναιωρείται σε διάλυμα 70% v/v παγωμένης αιθανόλης για περαιτέρω καθαρισμό. Αναδεύουμε το διάλυμα εκ νέου ισχυρά, φυγοκεντρούμε για 5 min στις

13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεκτικά γιατί το DNA μπορεί να μην είναι ορατό εντός της αιθανόλης και ξηραίνουμε το ίζημα σε μικροφυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Επαναιωρούμε το καθαρό πλέον DNA σε 15 μl TE (10 μM Tris-HCl pH 7.4 και 1 mM EDTA) και προσθέτουμε 0.4 U RNAάση. Αφήνουμε να δράσει η RNAάση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύουμε στους 4° C.

Η επιβεβαίωση του κάθε πλασμιδίου γίνεται με πέψη με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης.

2.23. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi prep)

Στην περίπτωση που επιθυμούμε να εξάγουμε μεγαλύτερη ποσότητα DNA από βακτήρια και επιθυμούμε το DNA αυτό να έχει μεγαλύτερη καθαρότητα, ακολουθούμε τη διαδικασία απομόνωσης σε μεσαία κλίμακα, που πραγματοποιείται με το kit Nucleobond PC 100 (Macherey-Nagel - #740 573), με βάση της οδηγίες της εταιρίας και μικρές τροποποιήσεις όπου αυτό κριθεί απαραίτητο.

Συγκεκριμένα, στο στάδιο καθαρισμού του DNA από τις μεμβράνες, εάν το διάλυμα είναι καθαρό μετά τη φυγοκέντρηση στο βήμα 4a, το βήμα του φιλτραρίσματος μπορεί να παραληφθεί. Επιπλέον, στο στάδιο της κατακρίμνησης και μετά την προσθήκη ισοπροπανόλης, αναδεύουμε ισχυρά σε vortex. Τελειώνοντας, ο τελικός καθαρισμός του DNA πραγματοποιείται για καλύτερο αποτέλεσμα σε 100% αιθανόλη, αντί για 70% αιθανόλη που συνιστάται από την εταιρία.

2.24. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα

Για τον έλεγχο του μεγέθους ενός πλασμιδιακού φορέα μετά από κάποια αντίδραση προσθήκης ή αφαίρεσης τμήματός του γνωστού μεγέθους, είναι απαραίτητος ο έλεγχος με πέψη με κάποιο περιοριστικό ένζυμο. Η επιλογή του ενζύμου γίνεται με βάση την αλληλουχία του φορέα και συνήθως, χρησιμοποιούμε ένζυμα που κόβουν το DNA σε ένα μόνο σημείο, προκειμένου να σχηματιστεί ένα ευθύγραμμο τμήμα DNA, το οποίο θα ελεγχθεί ως προς το μέγεθός του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, έχοντας σαν μάρτυρα ένα διάλυμα πρότυπων ζωνών DNA. Κατά την πέψη, εάν αυτό είναι δυνατό, μπορούμε να πραγματοποιήσουμε δύο διαφορετικές αντιδράσεις, με διαφορετικά ένζυμα, που κόβουν σε μονή θέση, έτσι ώστε να είμαστε βέβαιοι για το ορθόν του αποτελέσματος.

Για την πέψη, χρειαζόμαστε τουλάχιστον 1 μg DNA, το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο σε ποσότητα 10 U/μg DNA, BSA 1x, διάλυμα αντίδρασης του περιοριστικού ενζύμου 1x, το οποίο θα εξασφαλίζει και την 100% δραστηριότητα του ενζύμου, ddH₂O για την συμπλήρωση του επιθυμητού όγκου και σε ορισμένα ένζυμα MgCl₂.

Αφού αναμίξουμε όλα τα απαραίτητα υλικά σε ένα σωληνάκι eppendorf, εισάγουμε τελευταίο το DNA και τοποθετούμε το μίγμα στους 37° C για τουλάχιστον 2 ώρες μέχρι να δράσει το ένζυμο.

Ορισμένα ένζυμα, λόγω απομόνωσης από οργανισμούς με ιδιαίτερες θερμοκρασιακές απαιτήσεις, δρουν βέλτιστα σε θερμοκρασίες διαφορετικές των 37° C.

2.25. Εισαγωγή εξωγενούς DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα

Οι διαδικασίες που θα περιγραφούν παρακάτω αφορούν στη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια λιπιδίων. Διαμόλυνση είναι η εισαγωγή ξένου προς το γένωμα των κυττάρων DNA, προκειμένου τα κύτταρα να αποκτήσουν κάποιες επιθυμητές ιδιότητες τις οποίες δε φέρουν τα πατρικά κύτταρα στα οποία πραγματοποιείται η διαμόλυνση.

2.25.1. Συνδιαμόλυνση HeLa κυττάρων με πλασμιδιακό DNA για αποσιώπηση της Hsp70 μέσω της τεχνολογίας siRNA (Co-transfection)

Η συνδιαμόλυνση είναι μια τεχνική που εφαρμόζεται στην περίπτωση που το πλασμίδιο που θέλουμε να εισάγουμε στα κύτταρα (εν προκειμένω ο φορέας για την αποσιώπηση της Hsp70 pSuper), δε φέρει κάποιο δείκτη επιλογής, οπότε μαζί με το φορέα αυτό, εισάγουμε στα κύτταρα και ένα δεύτερο φορέα (pTk), ο οποίος φέρει δείκτη επιλογής (υδρομυκίνη) και υπάρχει πιθανότητα να εισέλθει κάποιο αντίγραφο του σε συνδυασμό με τον επιθυμητό φορέα, οπότε κατά την επιλογή με το κατάλληλο αντιβιοτικό θα έχουμε τελικά στο κύτταρο και τους δύο φορείς και συνεπώς και την ιδιότητα που θέλουμε να εισάγουμε στο κύτταρο.

Την προηγούμενη ημέρα πριν από τη διαμόλυνση, σπέρνουμε σε τρυβλίο 6 cm 8×10^5 κύτταρα και τα αφήνουμε να αναπτυχθούν σε πληρότητα 40 – 80%. Την ημέρα της διαμόλυνσης διαλύουμε 3 μg από το πλασμιδιακό DNA του ενδιαφέροντός μας σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ορό και αντιβιοτικό σε αναλογία 3:1 φορέα για το siRNA (pSuper-siRNA Hsp70) προς φορέα που περιέχει το δείκτη επιλογής (pTK-Hyg). Ο τελικός όγκος του μίγματος αυτού θα πρέπει να είναι 150 μl . Αναμιγνύουμε καλά και φυγοκεντρούμε για να καθιζάνουν τυχόν σταγονίδια από τα τοιχώματα του σωλήνα. Προσθέτουμε στο μίγμα του DNA 25 μl από το αντιδραστήριο των λιπιδίων (Polyfect Transfection Reagent – Qiagen #301105) και αναμιγνύουμε πιπετάροντας 5 φορές ή αναδεύοντας σε vortex. Επωάζουμε το μίγμα λιπιδίων – DNA σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min προκειμένου να σχηματιστούν σύμπλοκα αυτών.

Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των άνωθι αναφερόμενων συμπλόκων, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο όπου θα πραγματοποιήσουμε τη διαμόλυνση, εκπλένουμε τα κύτταρα με 4 ml PBS και προσθέτουμε 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (με αντιβιοτικά και ορό).

Μετά την παρέλευση των 10 min, προσθέτουμε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στο σωληνάκι που περιέχει το μίγμα αντίδρασης με τα σύμπλοκα. Αναδεύουμε πιπετάροντας 1-2 φορές και μεταφέρουμε το σύνολο στο τρυβλίο, το οποίο και ανακινούμε ελαφρά για την ίση κατανομή των συμπλόκων. Επωάζουμε τα κύτταρα για 48 ώρες προκειμένου να έχουμε επαρκή έκφραση της επιθυμητής ιδιότητας και στη συνέχεια ξεκινάμε την επιλογή των κλώνων με υδρομυκίνη B (InvivoGen #ant-hg-1), σε κατάλληλη συγκέντρωση για τουλάχιστον 17 ημέρες.

Για τον έλεγχο της ορθής διαμόλυνσης στα τρυβλία, χρησιμοποιούμε αρνητικό μάρτυρα, στον οποίο αντί για DNA, εισάγουμε 1 μl ddH₂O κατά τη διαδικασία σχηματισμού των συμπλόκων με τα λιπίδια.

Η χρήση του θρεπτικού μέσου χωρίς ορό και αντιβιοτικά είναι επιβεβλημένη, καθώς αυτά επηρεάζουν τη διαδικασία σχηματισμού των συμπλόκων και δίνουν πιο χαμηλή τελική απόδοση στη διαμόλυνση.

2.25.2. Διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων για την αποσιώπηση έκφρασης της p14^{ARF} μέσω της τεχνολογίας short-hairpin RNA (shRNA)

Στην περίπτωση αυτή διαμόλυνσης, χρησιμοποιήσαμε το φορέα pRetro-Super-p14ARF, που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, σε καρκινικά κύτταρα HeLa και H1299, προς αποσιώπηση της p14^{ARF}. Η ύπαρξη του γονιδίου ανθεκτικότητας μας διευκολύνει στη διαμόλυνση, καθώς δε χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε δεύτερο φορέα, που να φέρει γονίδιο για επιλογή, όπως στην ενότητα 2.25.1. Η διαδικασία διαμόλυνσης στην περίπτωση αυτή είναι ακριβώς η ίδια με τη διαδικασία συνδιαμόλυνσης, με μοναδική διαφορά την ύπαρξη και χρήση ενός μόνο φορέα διαμόλυνσης, οπότε και χρησιμοποιούμε 3 μg από αυτόν εξ ολοκλήρου για τη διαμόλυνση.

2.25.3. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με Stealth select RNAi pool για αποσιώπηση της β-κατενίνης

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, προβήκαμε σε αποσιώπηση της β-κατενίνης σε HeLa κύτταρα, μέσω διαμόλυνσης με αλληλουχία Stealth select RNAi (Invitrogen), με τη χρήση λιπιδίων Lipofectamine 2000 (Invitrogen - #11668-019), βάσει του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρίας για πολυτροβλία 6 θέσεων. Η αρχή της διαδικασίας είναι παρόμοια με προηγούμενα, με τη διαφορά ότι φορέας και αλληλουχία RNAi θα πρέπει να αναμιχθούν μεταξύ τους πριν να αναμιχθούν στη συνέχεια με τα λιπίδια.

2.26. Κυτταρομετρία ροής

Το κυτταρόμετρο ροής είναι ένα όργανο που ρίχνει φως στα κύτταρα (ή σε άλλα σωματίδια), τα οποία ρέουν μεμονωμένα μέσω πίεσης μέσα από μια κυψελίδα και μπροστά από μια πηγή φωτός που προέρχεται από κάποιο λέιζερ. Στη συνέχεια, το φως αυτό λαμβάνεται από μια διάταξη, η οποία ανιχνεύει και συσχετίζει τα σήματα, ταξινομώντας τα με βάση κάποιες ιδιότητες για τις οποίες έχει ρυθμιστεί ο ανιχνευτής (μέγεθος, κοκκίωση, ένταση φθορισμού) και ακολούθως, μας δίνει μέσω ειδικού λογισμικού το αποτέλεσμα, σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Givan, 2004).

2.26.1. Μελέτη της απόπτωσης και της έκφρασης της Hsp70 σε HeLa κύτταρα

Για την ανάλυση της έκφρασης της Hsp70 στους κυτταρικούς κλώνους που κατασκευάστηκαν μέσω siRNA τεχνολογίας χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (Partec CyFlow ML). Για την ανίχνευση της Hsp70 στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Dressel et al., 1998. Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa ή HeLa-siRNA-Hsp70 πλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 1% w/v παραφορμαλδεύδης σε PBS σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml και επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας ποσότητα 1.5 μg μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού για την επαγόμενη Hsp70.

Με κυτταρομετρία ροής αναλύθηκε και η απόπτωση των κυττάρων HeLa-siRNA-Hsp70 που δεν εκφράζουν Hsp70 σε σύγκριση με τα πατρικά κύτταρα HeLa.

Συγκεκριμένα κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 πυκνότητας 1×10^6 κύτταρα/ml, αφού εκτέθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30, 60 και 90 λεπτά σε θνησιγόνο θερμικό σοκ στους 45°C και επανήλθαν για 90 λεπτά στους 37°C , επώαστηκαν σε 30 $\mu\text{g/ml}$ χρωστικής Hoechst 33342 (Fluka - #14533) για 60 λεπτά και αναλύθηκαν με κατάλληλο πρόγραμμα (Partec FloMax software) για την απόπτωση που εμφάνιζαν εμμέσως, μέσω υπολογισμού του ποσοστού των υποδιπλοειδών κυττάρων που μετρήθηκαν στην sub-G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.

2.26.2. Μελέτη της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa, H1299 και NARF2

Με κυτταρομετρία ροής αναλύθηκε επίσης και η απόπτωση των κυττάρων HeLa και των κλώνων τους που έφεραν αποσιώπηση της p14^{ARF} και της β-κατενίνης, των H1299 και των αντίστοιχων κλώνων τους που έφεραν αποσιώπηση της p14^{ARF}, καθώς και των κυττάρων NARF2, μετά από θνησιγενές θερμικό σοκ στους 45°C για 90 min, με επαναφορά στους 37°C για 90 min, αλλά και μετά από ισχυρό οξειδωτικό στρες με 1mM H_2O_2 για 60 min με επαναφορά για 24 ώρες. Τα κύτταρα, αφού μονιμοποιήθηκαν σε 80% v/v παγωμένης αιθανόλης, επώαστηκαν για χρώση των πυρήνων τους με 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidium Iodide (PI) (Sigma - #P4170) για 30 min στους 37°C και αναλύθηκαν σε κυτταρόμετρο ροής, υπολογίζοντας τα υποδιπλοειδή κύτταρα, ή τον αριθμό των κυττάρων που ανήκαν σε υποπληθυσμό διαφορετικό από αυτόν στον οποίο ανήκαν τα κύτταρα ελέγχου.

2.27. Έλεγχος έκφρασης της β-κατενίνης μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)

Για να ελέγξουμε τα επίπεδα του mRNA της β-κατενίνης σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299 που έφεραν αποσιώπηση της p14^{ARF} και των αντίστοιχων πατρικών κυττάρων από τα οποία προήλθαν, μετά από θερμικό και οξειδωτικό στρες, πραγματοποιήσαμε μια τεχνική ημι-ποσοτικής πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση. Το mRNA που μας ενδιέφερε (β-κατενίνη), ενισχύθηκε ταυτόχρονα με το μεγαλύτερο σε μέγεθος mRNA της GAPDH ως mRNA αναφοράς, που εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά ως γονίδιο κυτταρικής οικονομίας.

Για την πραγματοποίηση της RT-PCR απομονώθηκε RNA με τη βοήθεια του RNeasy Mini Kit (Qiagen - #74104), με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθως, 5 μg απομονωμένου RNA χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση cDNA για τα γονίδια ενδιαφέροντος χρησιμοποιώντας oligo-dT εκκινητές (Invitrogen - # 18418-020) και μια αντίστροφη μεταγραφάση από τον ιό Moloney (M-MLV reverse transcriptase) (Invitrogen - # 28025-013), με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για την β-κατενίνη χρησιμοποιήθηκαν δύο σετ εκκινητών,

- Σετ A: πρόσθιος εκκινητής: 5'-GCCATTACAACCTCTCCACAAC-3'
ανάστροφος εκκινητής: 5'-GATAGCACCTTCAGCACTCTG-3'
- Σετ B: πρόσθιος εκκινητής: 5'-GGTGGTATAGAGGCTCTTGTG-3'
ανάστροφος εκκινητής: 5'-CTGAAGTAGTCGTGGAATGGC-3'

που δίνουν προϊόντα μήκους 281 και 291 ζευγών βάσεων αντίστοιχα. Για την GAPDH οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

- Πρόσθιος εκκινητής: 5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTG-3'
- Ανάστροφος εκκινητής: 5'-CGACGCCTGCTTCACCACCT-3',

με προϊόν μήκους 439 ζευγών βάσεων.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 30 μ l σε διάλυμα περιεκτικότητας 10 μ M Tris-HCl pH 8.8, 50 μ M KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% v/v Triton X-100, 200 μ M από κάθε dNTP (Promega - #U12XA, όπου X \rightarrow 0,1,2,3) και 30 μ M από κάθε εκκινητή για τη β -κατενίνη, 20 μ M για τον εκκινητή της GAPDH, 5 μ l από τη cDNA βιβλιοθήκη για το κάθε mRNA που μας ενδιαφέρει και 1 U Taq DNA πολυμεράσης (HyTest Ltd - #7T1). Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης είχε ως εξής:

- Αρχική αποδιάταξη (πριν την προσθήκη της Taq πολυμεράσης): 2 min/95° C
- Αποδιάταξη: 1 min/95° C
- Υβριδοποίηση: 1 min/58° C
- Επιμήκυνση: 1 min/72° C
- Τελική επιμήκυνση: 10 min/72° C.

Η αντίδραση επαναλήφθηκε για 25 κύκλους και τα τελικά προϊόντα ελέγχθησαν ως προς το ορθό μέγεθος σε 2% w/v πηκτή αγαρόζης με περιεκτικότητα 5 ng/ml βρωμιούχο αιθίδιο (BioRad - #161-0433).

2.28. Μέτρηση ικανότητας μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων από τη β -κατενίνης μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης (Luciferase assay)

Ο έλεγχος της ικανότητας της β -κατενίνης να ενεργοποιήσει μεταγραφικά άλλα γονίδια σε κύτταρα HeLa και H1299 μετά από θερμικό και οξειδωτικό στρες πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο (Junior – EG&G Berthold, Germany), χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό σύστημα (Promega - #E4030) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, κύτταρα που είχαν υποστεί διαμόλυνση με τον τεχνητό υποκινητή της β -κατενίνης (TopFlash) και κύτταρα που είχαν υποστεί διαμόλυνση με ένα αρνητικά επικρατές γονίδιο αναφοράς, υποβλήθηκαν σε θερμικό και οξειδωτικό στρες στις συνθήκες που έχουν αναφερθεί και παραπάνω (ενότητα 2.26.2).

Στα κύτταρα αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσον και εκπλύθηκαν με ίσο όγκο PBS 1x. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης, αποκολλήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα eppendorf. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση στα 12.000 g και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα.

Σε νέο σωλήνα που περιέχει 100 μ l αντιδραστηρίου αναφοράς λουσιφεράσης μεταφέρουμε 20 μ l κυτταρικού εκχυλίσματος, αναμιγνύουμε ήπια και μετράμε την ένταση του φθορισμού.

Για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα φθορισμού, τόσο τα εκχυλίσματα, όσο και τα διαλύματα θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.

2.29. Πειραματόζωα

Για τις ανάγκες των πειραμάτων μελέτης της επίδρασης της δοξορουβικίνης στην καρδιά, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια των στελεχών CBAx57B1/6, τόσο αγρίου τύπου (F1/F1) (EKEBE Φλέμινγκ), όσο και διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg), τα οποία υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70 και δημιουργήθηκαν στο Ινστιτούτο Παστέρ Αθηνών με τη βοήθεια του καθηγητή Γ. Κόλλια όπως έχει ήδη περιγραφεί (Plumier et

al., 1995; Angelidis et al, 1996). Για όλα τα πρωτόκολλα που έχουν σχέση με τα πειραματόζωα, έχει ληφθεί σχετική άδεια μετά από κατάθεσή τους στην κτηνιατρική υπηρεσία της Νομαρχίας Ιωαννίνων.

2.29.1. Συντήρηση πειραματοζώων

Προκειμένου να διατηρηθεί υγιής ο πληθυσμός των πειραματοζώων, χρειάζονται κάποιες ενέργειες για τη συντήρησή του. Συγκεκριμένα, τα κλουβιά θα πρέπει να καθαρίζονται και να αλλάζονται δύο φορές την εβδομάδα. Επιπλέον, θα πρέπει να προστίθεται τροφή και νερό όποτε είναι απαραίτητο, ενώ κάθε δύο μέρες θα πρέπει να τοποθετείται στο κλουβί φρέσκο πόσιμο νερό.

Σημαντικό είναι να αποφεύγεται ο υπερπληθυσμός μέσα σε κάθε κλουβί, διότι οδηγεί σε φαινόμενα επιθετικότητας και κανιβαλισμού, που ενέχουν σοβαρούς κινδύνους πρόκλησης ασθενειών λόγω μολύνσεων από τις πηλές. Λόγω μεγαλύτερης επιθετικότητας στα αρσενικά άτομα, καλό είναι να μην υπερβαίνουν τα 3 άτομα ανά κλουβί, ενώ στα θηλυκά, ο αριθμός αυτός μπορεί να ανέλθει στα 4 άτομα ανά κλουβί.

2.29.2. Αναπαραγωγή πειραματοζώων

Για τη διατήρηση σταθερού πληθυσμού, ικανού να καλύψει τις τυχόν πειραματικές ανάγκες και δεδομένου ότι κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούμε αρσενικά ποντίκια, θα πρέπει ανά τακτά χρονικά διαστήματα να υποβάλουμε τον πληθυσμό σε αναπαραγωγή.

Δύο ημέρες πριν από την αναπαραγωγή, ένα αρσενικό τοποθετείται σε ένα άδειο κλουβί, προκειμένου να εγκληματιστεί στο χώρο. Κατόπιν, τοποθετούνται στο κλουβί δύο θηλυκά άτομα και αφήνονται σε ηρεμία. Δέκα ημέρες μετά την τοποθέτηση των θηλυκών ατόμων, αφαιρείται το αρσενικό. Η κύηση διαρκεί περίπου τρεις εβδομάδες, δίνοντας 6-7 νεογνά ανά γέννα περίπου. Η μητέρες παραμένουν στο κλουβί με τα νεογνά για 3 εβδομάδες περίπου, μέχρι να ολοκληρωθεί ο θηλασμός. Κατόπιν, απομακρύνονται οι μητέρες από το κλουβί και τα νεογνά αφήνονται να μεγαλώσουν για 2 ακόμη εβδομάδες, οπότε και γίνεται ο διαχωρισμός των αρσενικών από τα θηλυκά άτομα. Σημαντικό είναι να μην καθυστερήσει πολύ ο διαχωρισμός αυτός, καθώς τα ποντίκια ωριμάζουν γεννητικά σε 3 μήνες και υπάρχει κίνδυνος επιπλέον κηύσεων. Επίσης, τα αρσενικά άτομα (πατέρες) θα πρέπει να μην παραμένουν στα κλουβιά μετά τη γέννα, καθώς μπορεί να πνίξουν τα νεογνά, ενώ υπάρχει η πιθανότητα να καταστήσουν εκ νέου έγκυα τα θηλυκά άτομα.

Στην περίπτωση αποτυχημένης κύησης (μικρός ή ανύπαρκτος αριθμός απογόνων), μπορούμε να ξαναβάλουμε τα ποντίκια να αναπαραχθούν άμεσα, ειδικά στην περίπτωση που στην αναπαραγωγή θα χρησιμοποιηθούν νεαρά άτομα. Αποτυχημένη κύηση, μπορεί επίσης να συμβεί εάν τα άτομα που θα χρησιμοποιηθούν στην αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερα των 18 μηνών.

2.29.3. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού DNA από ιστούς ποντικών

Για την απομόνωση DNA από ποντικούς, κόψαμε ουρές από τα ζώα που μας ενδιέφεραν και χρησιμοποιήσαμε το DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen - #69505) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνοπτικά, χρησιμοποιούμε μέχρι 25 mg ιστού, τον οποίο λύνουμε ολονύκτια παρουσία πρωτεΐνάσης K στους 55° C υπό ανάδευση. Προσθέτουμε αιθανόλη για τον

καθαρισμό του DNA και περνάμε το εχύλισμα από στήλη καθαρισμού. Εκεί, κατακρατείται μόνο το DNA, ενώ απορρίπτονται όλα τα υπόλοιπα μακρομόρια του ιστού. Η στήλη εκπλένεται στη συνέχεια με διάφορα διαλύματα και εκλούεται το DNA, το οποίο φωτομετράται για να εξακριβωθεί η πυκνότητά του. Ακολούθως, αποθηκεύεται στους 4° C και είναι έτοιμο για χρήση.

2.29.4. Επιβεβαίωση ομοζυγωτίας για το διαγονίδιο της Hsp70 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Για την ταυτοποίηση των ποντικών ως προς την ύπαρξη ή μη του διαγονιδίου της ανθρώπινης Hsp70, αλλά και τη διαπίστωση της ομοζυγωτίας ως προς το διαγονίδιο, εφαρμόστηκε ποσοτική PCR στα DNA που απομονώθηκαν από τις ουρές των ποντικών.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

- 5' *IVS-TRG* (40-μερής):

5'-TTTATGGTAATAACGCGCCGGCCCGGCTTCCTTTATCCC-3'

- 3' *HSP70-TRG* (39-μερής):

5'-TACGCCTCGGCGATCTCCTTCATCTTGGTCAGCACCATG-3'

Για την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε 1 μg απομονωμένου γενωμικού DNA, 500 ng από τον κάθε εκκινητή, 200 mM DNTPs, 1x διάλυμα αντίδρασης Taq πολυμεράσης, 2 mM MgCl₂, 2.5 U Taq πολυμεράση και συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 μl με δις-αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο ddH₂O.

Σαν θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν 100 ng από το φορέα pHβ-arg-Hsp70, που φέρει το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 υπό τον υποκινητή της α-ακτίνης.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του προϊόντος, ξεκινάμε την αντίδραση με μια αρχική αποδιάταξη στους 94° C/4min, μετά το πέρας των οποίων τοποθετείται στην αντίδραση η Taq πολυμεράση. Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης έχει ως εξής:

- Αποδιάταξη: 1.5 min/94° C
- Υβριδοποίηση: 1 min/71° C
- Επιμήκυνση: 2 min/72° C,

το οποίο επαναλαμβάνεται για 50 κύκλους. Στο τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72° C για 7 λεπτά, προκειμένου να κλείσουν όλα τα κενά και να μην υπάρχουν μονόκλιωνα DNAs.

Η αντίδραση αναμένεται να δώσει προϊόν της τάξης των 600 ζευγών βάσεων περίπου. Τα ομόζυγα F1/F1 ζώα δεν θα πρέπει να φέρουν προϊόν, τα ομόζυγα Tg/Tg ζώα θα φέρουν έντονα τη διαγνωστική ζώνη στα 600 ζεύγη βάσεων, ενώ τα ετερόζυγα F1/Tg φέρουν μια λιγότερο έντονη ζώνη στα 600 ζεύγη βάσεων, όταν τρέξουμε τα προϊόντα της PCR σε πηκτή 1.5% w/v αγαρόζης σε TBE.

2.29.5. Πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας

Για την πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας στα ποντίκια χρησιμοποιήθηκε η αντινεοπλαστική ουσία δοξορουβικίνη (Pharmachemie BV, Netherlands), η οποία κατά τη χορήγησή της είναι γνωστό ότι προκαλεί τέτοιου είδους επιπλοκές που μπορεί να οδηγήσουν και στο θάνατο (Tan et al., 1967).

Η χορήγηση της δοξορουβικίνης πραγματοποιήθηκε κατά διαλείποντα τρόπο ενδοπεριτοναϊκά σε ένα χρονικό ορίζοντα 10 εβδομάδων. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκαν 4 δόσεις των 3 mg/kg ανά εβδομάδα, ακολουθούμενες από 2 εβδομάδες ανάπαυλας με χορήγηση στη συνέχεια άλλων 4 δόσεων ίδιας συγκέντρωσης. Το σκεύασμα αραιώθηκε με φυσιολογικό ορό (0.9% w/v NaCl). Για τον αποκλεισμό

πιθανού ενδεχομένου παρενεργειών στην καρδιακή λειτουργία από το φυσιολογικό ορό, δημιουργήθηκε μια ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγήθηκε ισόποση δόση σε NaCl, όπως στην ομάδα της καρδιακής ανεπάρκειας.

2.29.6. Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη των ποντικών

Για τη μελέτη της καρδιακής λειτουργίας των ποντικών πραγματοποιήθηκε διαθωρακική ηχοκαρδιογραφία με τη βοήθεια υπερηχογράφου (VIVIDi – GE Healthcare, USA) που φέρει κεφαλή συχνότητας 11.5 MHz, ειδική για νεογνά.

Προκειμένου να αποφευχθεί η αναστάτωση των ζώων, αναισθητοποιήθηκαν με τη βοήθεια 100 mg/kg υδροχλωρικής κεταμίνης (εμπορική ονομασία: Ketalar – Pfizer) και διατηρήθηκαν σε θερμαινόμενη επιφάνεια για τη λήψη M-mode εικόνων 2 διαστάσεων στο άκρο των θηλοειδών μυών. Χρησιμοποιώντας τις εικόνες αυτές, μετρήθηκε τελοδιαστολικά το πάχος του πρόσθιου (AWTd) και οπίσθιου καρδιακού τοιχώματος (PWTd), αλλά και η διάμετρος της αριστερής κοιλίας τελοδιαστολικά (LVDd) και τελοσυστολικά (LVDs), μετρώντας συμβατικά τις αντίστοιχες αποστάσεις. Όλες οι παράμετροι μετρήθηκαν σε τρεις τουλάχιστον καρδιακούς κύκλους.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η βράχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων με τον τύπο $[(LVDd-LVDs)/LVDd] \times 100$, η μάζα της αριστερής κοιλίας ως $[1.05 \times \{PWTd + AWTd + LVDd\}^3 - (LVDd)^3]$, η οποία αντιστοιχίστηκε με το αντίστοιχο σωματικό βάρος κάθε ζώου, ενώ ο ρυθμός πάχυνσης των τοιχωμάτων προς την ακτίνα της καρδιάς (R/H ratio), υπολογίστηκε με τον τύπο $2 \times (LVDd/PWTd)$ και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης δυσμενούς αναδιαμόρφωσης.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε μονοσήμαντη δοκιμή ANOVA με μετάπειτα ανάλυση Bonferroni, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα ζώα αναφοράς, ενώ χρησιμοποιήθηκε και ασύζευκτο t-test για τις μετέπειτα συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου. Για τον υπολογισμό της θνητότητας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χ^2 .

2.29.7. Λήψη και συντήρηση ιστών

Μετά το πέρας των 10 εβδομάδων χορήγησης δοξορουβικίνης, αλλά και σε διαστήματα 4 και 6 εβδομάδων, ορισμένα ποντίκια (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) τόσο της ομάδας ελέγχου, όσο και της ομάδας καρδιακής ανεπάρκειας, αναισθητοποιήθηκαν, μελετήθηκαν υπερηχογραφικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (ενότητα 2.29.6.) και ακολούθως θανατώθηκαν για τη λήψη της καρδιάς τους.

Τα ζώα ξυρίστηκαν στο ύψος του στέρνου, μέχρι και το ύψος της κοιλιακής χώρας. Ακολούθως, από το ύψος της κοιλιάς και ανερχόμενοι προς το στέρνο, πραγματοποιήθηκε τομή για τη διάνοιξη του δέρματος. Στη συνέχεια, τραβώντας με λαβίδα το στέρνο, ανοίχθηκε τομή δεξιά και αριστερά του θώρακα, προκειμένου να αποκαλυφθεί το εσωτερικό της θωρακικής κοιλότητας. Προκειμένου να εκπλυθεί η καρδιά από το αίμα, πραγματοποιήθηκε μικρή τομή στο ύψος του αριστερού κόλπου προκειμένου να υπάρχει δίοδος διαφυγής του αίματος και εγχύθηκε μέσω της δεξιάς κοιλίας παγωμένο PBS μέχρι να εκπλυθεί η καρδιά όσο το δυνατόν καλύτερα. Ακολούθως, αποκόπηκε η καρδιά, εμβαπτίστηκε μέσα σε παγωμένο PBS για εκ νέου έκπλυση και αποθηκεύτηκε άμεσα σε υλικό ψύξης Tissue-TEK O.C.T. Compound (Miles Inc, USA), στους -80°C για μελλοντική χρήση σε κρυοτομές, ή υποβλήθηκε άμεσα σε λύση για πρωτεϊνικό εκχύλισμα, με τον τρόπο που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα (2.4), μετά από ζύγιση. Ένα ποσοστό από τους ιστούς,

τοποθετήθηκε άμεσα σε αποστειρωμένα σωληνάκια errendorf και αποθηκεύτηκε στους -80°C χωρίς να υποστεί κάποια κατεργασία, για μελλοντική χρήση.

2.30. Κρυτομές ιστών

Προκειμένου πάρουμε τομές από παγωμένους ιστούς, ακολουθούμε τα εξής βήματα: ανοίγουμε τον κρυτόμο (CM1850 UV – Leica Biosystems, Germany) και τον ρυθμίζουμε στην επιθυμητή θερμοκρασία με βάση τη σκληρότητα του ιστού (η πλειοψηφία των ιστών κόβεται στους -25°C). Ο θάλαμος αποστειρώνεται με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους φωτός για 15 min. Αφού κατεβεί η θερμοκρασία εντός του θαλάμου, τοποθετούμε τον ιστό που έχουμε ήδη παγώσει πάνω στον ειδικό δίσκο κοπής και τον στερεώνουμε με τη βοήθεια O.C.T freezing compound στην ειδική θέση ταχείας ψύξης του κρυτόμου. Αφού στερεοποιηθεί, τοποθετούμε το δίσκο στην ειδική θέση που κινείται παλινδρομικά με τη βοήθεια χειροκίνητης μανιβέλας. Κάθε στροφή, φέρει το δείγμα πιο κοντά στη λεπίδα κοπής κατά μια τάξη μεγέθους που ρυθμίζεται από διακόπτη (συνήθως 5 μm). Υπάρχει επίσης και μηχανική μετακίνηση του δείγματος με έμβολο, μέχρι το σημείο που θα ακουμπήσει σχεδόν τη λεπίδα κοπής.

Αφού ακουμπήσει το δείγμα στη λεπίδα κοπής, κόβουμε μερικές τομές, μέχρι να αποκαλυφθεί ο ιστός από το μέσο ψύξης. Ακολουθώντας, κατεβάζουμε το γυαλί που επιτρέπει την ευθυγράμμιση της τομής στη συσκευή και κόβουμε όσες τομές επιθυμούμε. Οι τομές τοποθετούνται πάνω σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες (Menzel-Gläzer Superfrost Ultra Plus) (Thermo Scientific - #J4800AMNZ) και ακολουθώντας βάζονται με τα επιθυμητά αντισώματα ή χρωστικές, ή αποθηκεύονται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

2.31. Απομόνωση κυττάρων μυοκαρδίου από ποντίκια με τη μέθοδο ταχείας προσκόλλησης

Για την απομόνωση καρδιομυοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ταχείας προσκόλλησης (Mitcheson et al., 1998), με τροποποιήσεις, όπου αυτό ήταν απαραίτητο.

Αποστειρώνουμε τα υλικά που θα χρησιμοποιήσουμε, προς αποφυγή μόλυνσεων στην καλλιέργεια. Παράλληλα, επιστρώνουμε τον επιθυμητό αριθμό τρυβλίων με 1 ml 0.2% w/v ζελατίνη (Serva - #22151) και τα αφήνουμε σε εστία νηματικής ροής για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, αποστειρώνουμε το εσωτερικό των σωληνώσεων της περισταλτικής αντλίας (2120 Varioprepex II Pump - LKB Bromma, Sweden) που θα χρησιμοποιήσουμε με 70% v/v αιθανόλη και εκπλένουμε με ddH₂O.

Τοποθετούμε το ποντίκι του ενδιαφέροντός μας μέσα στην εστία νηματικής ροής και εάν είναι δυνατό, το αποστειρώνουμε για 5 λεπτά. Θανατώνουμε το ποντίκι με θραύση του νωτιαίου μυελού στο ύψος του αυχένα και σκουπίζουμε την κοιλιακή επιφάνεια που θα ανοίξουμε με 70% v/v αιθανόλη. Ανοίγουμε χειρουργικά το ποντίκι, όπως έχει αναφερθεί (ενότητα 2.29.7) και αφαιρούμε την καρδιά.

Εκπλένουμε την καρδιά σε διάλυμα Ca 750 μM (300 ml διαλύματος A pH 7.3 (130 mM NaCl, 23 mM HEPES, 21 mM γλυκόζη, 5 mM MgCl₂, 5 mM πυροσωφορικό νάτριο, 4.5 mM KCl και 1 mM NaH₂PO₄) και 750 μM Ca) προθερμασμένο στους 37°C .

Συνδέουμε την έξοδο της περισταλτικής αντλίας με την αορτή, με τη βοήθεια βελόνας 27x $\frac{1}{2}$ G και πραγματοποιούμε έγχυση εντός της καρδιάς με τον απαιτούμενο όγκο 750 μM διαλύματος ασβεστίου για χρόνο 2 λεπτών, σε θερμοκρασία 37°C .

(Κατά τη χρήση της αντλίας θα πρέπει να προσέχουμε έτσι ώστε να μην περάσουν φυσαλίδες εντός του μυοκαρδίου και εμποδίσουν την σωστή έκπλυση του αίματος).

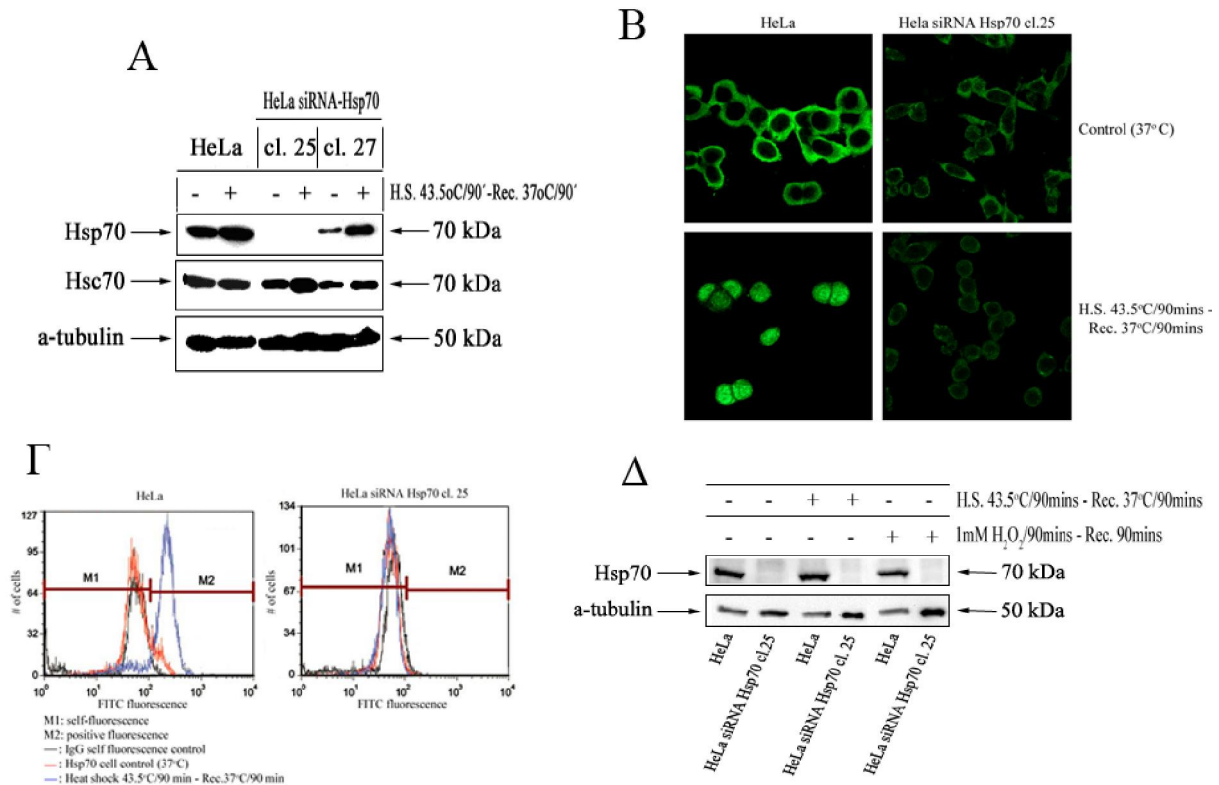
Ακολούθως, αλλάζουμε το διάλυμα σε Ca free+EGTA (300 ml διαλύματος A και 3.3 μM EGTA) και συνεχίζουμε την έγχυση για άλλα 5 λεπτά. Εκπλένουμε με τον απαραίτητο ενζυμικό διαλύματος (80 ml διαλύματος A, 100 μM Ca, 1 mg/ml κολλαγενάση, 0.002% v/v τρυψίνη/EDTA) για 14 λεπτά στους 37° C. Στο στάδιο αυτό, αρχίζει η πέψη του ιστού από τα ένζυμα. Μόλις το διάλυμα που εξέρχεται από την καρδιά είναι πιο ιξώδες και θολό, τότε ανακυκλώνουμε το διάλυμα και το επαναδιοχετεύουμε στην καρδιά μέχρι το πέρας του επιθυμητού χρόνου.

Μετά το πέρας της ενζυμικής πέψης, εκπλένουμε το ενζυμικό διάλυμα με διάλυμα Ca 100 μM (220 ml διαλύματος A και 100 μM Ca) στους 37° C για 5 λεπτά. Κατόπιν, αποσυνδέεται η αντλία και η καρδιά τοποθετείται μέσα σε αποστειρωμένο Petri, όπου καθαρίζεται από τυχόν υπολείματα λιπώδους ιστού. Ακολούθως, κόβεται η καρδιά σε μικρά κομμάτια με τη βοήθεια ψαλιδιού μέσα σε διάλυμα Ca 100 μM και την αφήνουμε σε αναδευτικό επωαστήρα στους 37° C για 10 λεπτά, προκειμένου να αποσπαστούν πλήρως τα χαλαρωμένα από τα ένζυμα κύτταρα. Το προκύπτον εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 50 g για 1 λεπτό, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml διαλύματος Ca 500 μM , ακολουθούμενο από νέα φυγοκέντρηση και επαναιώρηση του ιζήματος σε διάλυμα ασβεστίου 1 mM. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση, εκπλένεται το ίζημα σε 4% w/v BSA σε PBS 1x και το τελικό ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό μέσο Medium-199 και επιστρώνεται στα τρυβλία που έχουν επιστρωθεί με ζελατίνη. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να αλλάζεται κάθε 2-3 ημέρες, ενώ το Ca βοηθά στη διατήρηση του καρδιακού τόνου στα κύτταρα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Hsp70 & Λειτουργίες της

3.1. Γονιδιακή αποσιώπηση της Hsp70 σε HeLa κύτταρα



Εικόνα 3.1.: Γονιδιακή αποσιώπηση της Hsp70 σε HeLa κύτταρα.

A) Κύτταρα HeLa υποβλήθηκαν σε siRNA ειδικό για την Hsp70. Η αλληλουχία του siRNA επιλέχθηκε μέσω της βάσης δεδομένων Oligoengine. Οι κυτταρικοί κλώνοι που λήφθηκαν μετά από επιλογή με 200μg/ml του αντιβιοτικού γυρομυκίνη ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση με ειδικό για την Hsp70 αντίσωμα ως προς την έκφραση της Hsp70 πριν και μετά από θερμικό σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά με επαναφορά στους 37° C για 90 λεπτά. Η ειδικότητα του siRNA επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την Hsc70, καθώς οι δύο πρωτεΐνες διαφέρουν μόλις κατά δύο νουκλεοτίδια. Στις ακόλουθες μελέτες χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος 25 ο οποίος φέρει 100% αποσιώπηση της Hsp70.

B) Κύτταρα HeLa (αριστερά ένθετα) και κύτταρα HeLa siRNA Hsp70 cl. 25 (δεξιά ένθετα), αναλύθηκαν με ανοσοφθορισμό με ειδικό για την Hsp70 αντίσωμα υπό φυσιολογικές συνθήκες (επάνω ένθετα) και μετά από θερμικό σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά και επαναφορά στους 37° C για 90 λεπτά (κάτω ένθετα) για την έκφραση και την εντόπιση της Hsp70, μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Γ) Κύτταρα HeLa (αριστερά) και HeLa siRNA Hsp70 cl.25 (δεξιά) που υπέστησαν ή όχι θερμικό σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά με επαναφορά στους 37° C για 90 λεπτά, ελέγχθηκαν για την επαγωγή της Hsp70, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Μετρήθηκε ο φθορισμός της Hsp70 σε κάθε περίπτωση και ακολούθως μελετήθηκε η επαγωγή συγκρίνοντας τις καμπύλες φθορισμού, αφαιρώντας ανά περίπτωση τον αυτοφθορισμό που προέρχεται από το δευτερογενές αντίσωμα (μαύρη καμπύλη).

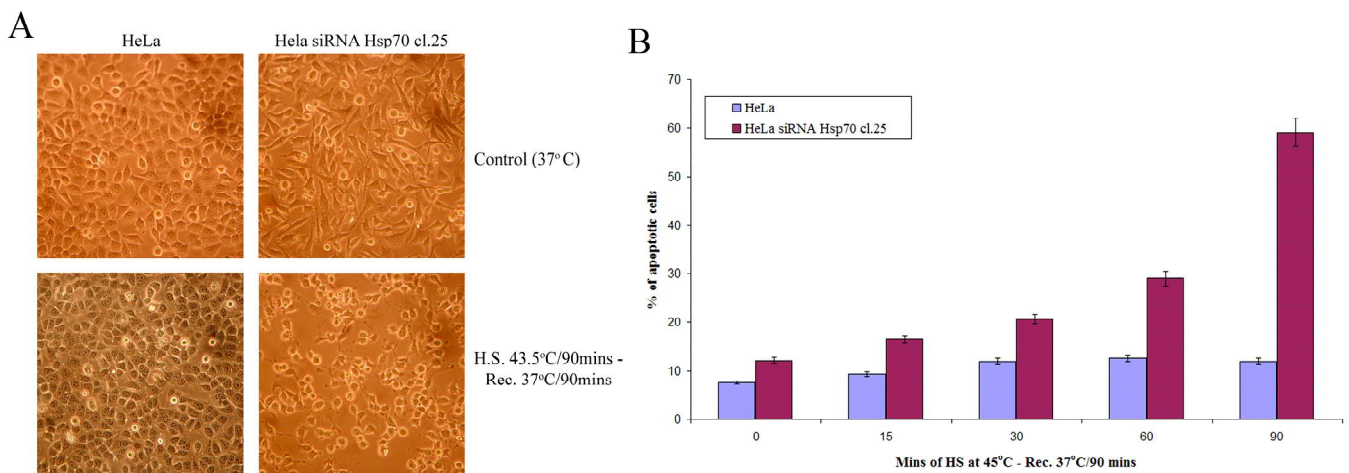
Δ) Κύτταρα HeLa και κύτταρα HeLa siRNA Hsp70 cl. 25 εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά με επαναφορά στους 37° C για 90 λεπτά, αλλά και σε ισχυρό οξειδωτικό στρες σε 1mM H₂O₂ για 90 λεπτά με επαναφορά για 90 λεπτά μετά από προσθήκη φράσκου θρεπτικού μέσου, προκειμένου να ελεγχθεί η αποσιώπηση της Hsp70 και μετά από άλλους τύπους στρες, αλλά και να επιβεβαιωθεί η αδυναμία επαγωγής της μετά από αποσιώπηση σε συνθήκες στρες.

Η διαμόλυνση κυττάρων HeLa έγινε με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω (ενότητα 2.25.1) με το πλασμίδιο pSUPER που έφερε ειδικά siRNAs για την πρωτεΐνη Hsp70. Η αλληλουχία των siRNA επιλέχθηκε από τη βάση δεδομένων της Oligoengine και η επιλογή των σταθερά μετασηματισμένων κλώνων έγινε με το αντιβιοτικό υγρομυκίνη. Με τρεις διαφορετικές τεχνικές, western blotting-ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής, αποδείχθηκε η γονιδιακή αποσιώπηση της Hsp70 (Εικόνα 3.1).

Ακόμη και μετά από θερμικό σοκ, οπότε στα πατρικά κύτταρα επάγεται η έκφρασή της και αυξάνεται η ενδοκυττάρια ποσότητά της, στον κλώνο 25 η απουσία της Hsp70 είναι συνεχής (Εικόνα 3.1Α,Γ). Το ίδιο παρατηρείται και υπό την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου (Εικόνα 3.1Δ). Για την παρουσία έκφρασης της Hsp70 χρησιμοποιήθηκε ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει μόνο την επαγόμενη Hsp70 (Ενότητα 2.11).

3.2. Η απουσία της Hsp70 στα HeLa κύτταρα προκαλεί θερμοευαισθησία και αυξημένη αποπτωτικότητα

Σε επόμενο βήμα, μελετήθηκε η θερμοευαισθησία και η αποπτωτικότητα των κυττάρων στα οποία απουσιάζει η Hsp70 (κλώνος 25). Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα από τα οποία έλειπε η Hsp70 είχαν μεγαλύτερη θερμοευαισθησία από τα πατρικά HeLa κύτταρα (Εικόνα 3.2Α). Επιπλέον, μελετήθηκε και η αποπτωτικότητα που παρουσιάζουν μετά από θερμικό σοκ και αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται η Hsp70 (κλώνος 25) παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόπτωση (Εικόνα 3.2Β).



Εικόνα 3.2: Η απουσία της Hsp70 στα HeLa κύτταρα προσδίδει αυξημένη θερμοευαισθησία και αποπτωτικότητα.

Α) Κύτταρα HeLa και HeLa siRNA Hsp70 cl. 25 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 43.5° C με επαναφορά στους 37° C για 90 λεπτά και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης προκειμένου να ελεγχθεί η αποκόλλησή τους από το ταπήτιο ως αποτέλεσμα της απόπτωσής τους λόγω αυξημένης θερμοκρασίας.

Β) Κύτταρα HeLa και HeLa siRNA Hsp70 cl.25 μελετήθηκαν ως προς την απόπτωσή τους μετά από χρώση με Hoechst 33342, αφού εκτέθηκαν σε ισχυρό θερμικό σοκ στους 45° C για 15, 30, 60 και 90 λεπτά. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής, μετρώντας τα υποδιπλοειδή κύτταρα. Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων δείχνει μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση της απόπτωσης με την αύξηση του χρόνου του θερμικού σοκ στα κύτταρα HeLa siRNA Hsp70, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απουσία της Hsp70 προσδίδει αυξημένη αποπτωτικότητα στα κύτταρα αυτά.

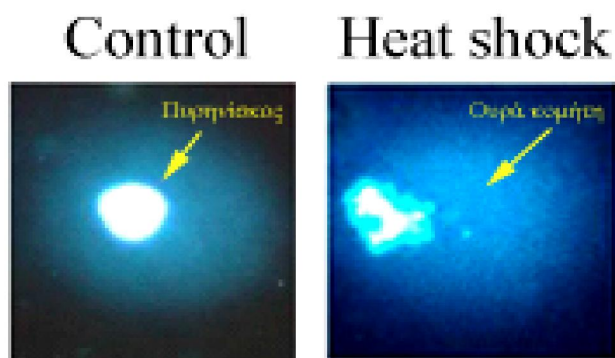
Η απόπτωση από την έκθεση στο θερμικό σοκ είναι χρονοεξαρτώμενη, όπως φαίνεται από την αύξηση των ποσοστών των υποδιπλοειδών κυττάρων (φάση sub-G1) με την αύξηση του χρόνου του θερμικού σοκ, ιδίως στην περίπτωση των 90 λεπτών (Πίνακας 3.1).

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις, σε συνδυασμό και με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα (Samali and Cotter, 1996) επιβεβαιώνουν ότι η Hsp70 αποτελεί ένα βασικό μέλος της αντι-αποπτωτικής διαδικασίας που σχετίζεται με τη θερμότητα. Κύτταρα στα οποία απουσιάζει η Hsp70, παρουσιάζουν έντονη αποπτωτική ενεργότητα που προκαλείται από τη θερμότητα. Παρά ταύτα όμως, λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό και τη δράση της θερμότητας κατά τη συσσώρευση της Hsp70 στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους.

Χρόνος (min) Φάση κυτ. κύκλου	HeLa					HeLa siRNA-Hsp70 cl.25				
	0	15	30	60	90	0	15	30	60	90
G0/G1	49.87%	46.73%	47.01%	44.93%	40.56%	39.57%	39.98%	36.24%	32.16%	18.55%
G2/M	17.31%	19.78%	19.39%	21.52%	22.96%	14.18%	18.21%	15.11%	14.17%	7.38%
S	19.02%	16.85%	16.19%	16.57%	16.71%	22.27%	19.72%	23.57%	18.61%	11.85%
subG1 (αποπτωτικά)	7.53%	9.38%	11.94%	12.57%	11.91%	12.10%	16.54%	20.75%	29.04%	59.13%

Πίνακας 3.1: Κατανομή των κυττάρων HeLa και HeLa siRNA Hsp70 cl.25 στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από θερμικό πλήγμα στους 45° C για διάφορους χρόνους, όπως αυτοί αναγράφονται στον πίνακα και επαναφορά τους στους 37° C για 90 λεπτά. Η ανάλυση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με Hoechst 33342, με άμεσο ενδιαφέρον τη μέτρηση των υποδιπλοειδών (αποπτωτικών κυττάρων) στη sub-G1 φάση, για κάθε κυτταρικό πληθυσμό.

Στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι η Hsp70 φαίνεται να συμμετέχει στο μονοπάτι που σχετίζεται με το σχηματισμό σημειακών θραύσεων στο DNA (Kotoglou et al, 2009). Για να επιβεβαιώσουμε τον ισχυρισμό αυτό, τροποποιήσαμε μια τεχνική ανίχνευσης DNA θραύσεων (comet assay) και την προσαρμόσαμε για χρήση σε πυρηνίσκους. Η τεχνική αυτή ονομάστηκε NCA (nucleolar comet assay) (ενότητα 2.19, Υλικά - Μέθοδοι) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Nucleolar comet assay (Kotoglou et al., 2009).

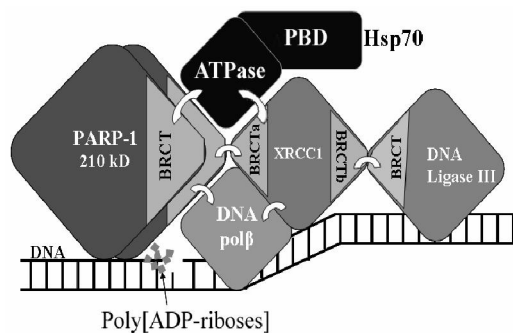
Απομονωμένοι καθαροί πυρηνίσκοι από κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες (αριστερά) ή μετά από θερμικό σοκ (45° C/90 min – Rec. 90 min/37° C) (δεξιά), υποβλήθηκαν σε μια τροποποιημένη comet assay όπου φαίνεται καθαρά η διάρρηξή τους και η σχηματιζόμενη ουρά που οφείλεται στις σημειακές θραύσεις του DNA μετά από θερμικό σοκ.

Παρά το πλήθος των ερευνών πάνω στην εμπλοκή της Hsp70 στην απόπτωση (Mosser et al., 1997; Nylandsted et al., 2000; Gurbuxani et al., 2003; Ran et al., 2004; Stankiewicz et al., 2005), ο ακριβής της ρόλος στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο εξακολουθούσε να είναι ασαφής. Εκμεταλλευόμενοι το συνεστιακό μικροσκόπιο και την τεχνική του διπλού ανοσοφθορισμού αποδείχθηκε ότι η Hsp70 συνεντοπίζεται με

πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μοριακές μηχανές επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Μεταξύ αυτών ήταν η PARP-1 και η XRCC1.

Με την χρήση μη αποδιατακτικών ανοσοκαθιζήσεων και ανοσοαποτυπώσεις με anti-Hsp70, anti-XRCC1, ή anti-PARP-1 αντισώματα, αποδείχθηκε ότι η Hsp70 προσδένει την PARP-1 και την XRCC1, δηλαδή ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ και των τριών πρωτεϊνών (Kotoglou et al., 2009).

Βασισμένοι σε προηγούμενα δεδομένα σχετικά με τις συνδέσεις της XRCC1 με άλλα επιδιορθωτικά μόρια και συγκεκριμένα με την PARP-1 (Masson et al., 1998), την DNA λιγάση III (Nash et al., 1997) και τη DNA πολυμεράση β (Caldecott et al., 1996), μπορούμε να υποθέσουμε ότι η Hsp70 είναι ενδεχομένως ένα μόριο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση των σημειακών θραύσεων του DNA. Η ύπαρξη πληθώρας σημειακών θραύσεων στο DNA, στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους μετά από θερμικό σοκ, οδηγούν το κύτταρο στην επαγωγή της σύνθεσης μεγάλου αριθμού μορίων της Hsp70, τα οποία οδηγούνται στο στόχο τους (σημειακή θραύση), που πιθανά μπορεί να είναι ριβοσωμικό DNA, μιτοχονδριακό DNA, ή πυρηνοπλάσματικό DNA, τα οποία έχουν υποστεί βλάβες. Συνεπώς, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η Hsp70 συσσωρεύεται στις περιοχές όπου υπάρχουν βλάβες στο DNA προκειμένου να στρατολογήσει τα μόρια των μηχανών επιδιόρθωσης του DNA, επιταχύνοντας έτσι το προστατευτικό αυτό φαινόμενο. Ένα προτεινόμενο μοντέλο της δράσης της Hsp70 φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Υποθετικό μοντέλο σύνδεσης της Hsp70 στα μέλη του συστήματος BER. Η Hsp70 συνδέεται στις περιοχές BRCT της PARP-1 και ίσως και της XRCC1, καθοδηγώντας ενδεχομένως τη συγκρότηση του επιδιορθωτικού μηχανισμού των σημειακών θραύσεων μέσω πολυ-ADP-ριβοζυλίωσης από την PARP-1, αλλά και τη μοριακή μηχανή του συστήματος BER

Με την χρήση καθαρισμένων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε το προτεινόμενο μοντέλο και αποδείχθηκε επιπλέον ότι η Hsp70 συνδέεται στην BRCT δομή της PARP-1. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν πολύ σημαντικό, καθώς BRCT περιοχές περιέχουν στη δομή τους κάποιες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, όπως η XRCC1 (Ginberg et al., 2011), η DNA λιγάση III (Caldecott, 2003), αλλά και το ογκογονίδιο BRCA-1 (Taylor et al., 2002) που είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού.

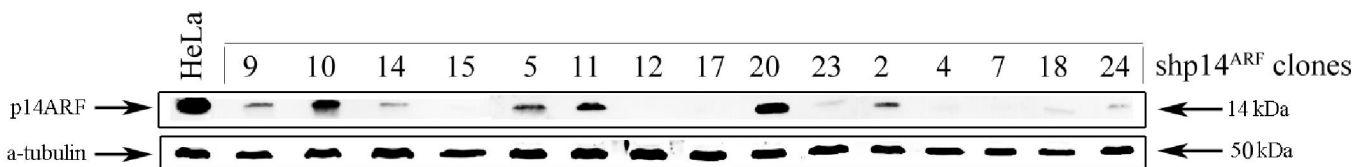
Έτσι, η Hsp70 προσδένει τόσο την PARP-1, όσο και την XRCC1 και ίσως να στρατολογεί τα μόρια αυτά στις περιοχές του DNA όπου υπάρχουν σημειακές θραύσεις, κατασκευάζοντας έτσι μια μοριακή μηχανή επιδιόρθωσης. Δεδομένου του γεγονότος ότι η Hsp70 δεν αποτελεί μια DNA συνδέουσα πρωτεΐνη, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι δε συμμετέχει άμεσα στις μηχανές επιδιόρθωσης με απευθείας σύνδεση στις σημειακές θραύσεις, αλλά έμμεσα, συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης που συμμετέχουν στις μηχανές αυτές. Πιο συγκεκριμένα, η Hsp70 ίσως να αλληλεπιδρά με την PARP-1, βοηθώντας τον ομο-διμερισμό της, συμμετέχοντας παράλληλα στη στρατολόγηση των υπόλοιπων επιδιορθωτικών πρωτεϊνών, με τις οποίες συνδέεται στην BRCT περιοχή τους, ώστε να τις κατευθύνει πάνω στο στόχο τους, που είναι οι σημειακές θραύσεις (Εικόνα 3.4).

3.3. Επιλογή κυτταρικών κλώνων για την αποσιώπηση της p14^{ARF} σε HeLa κύτταρα

Άλλη μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μετά από ογκογονικό στρες, είναι η p14^{ARF}, η οποία εδράζεται εντός των πυρηνίσκων υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και υπό συνθήκες στρες, όπως συμβαίνει και με την Hsp70. Εύλογο είναι να αναρωτηθεί κανείς εάν οι δύο αυτές πρωτεΐνες συνεργάζονται υπό συνθήκες στρες, δεδομένου του συνεντοπισμού τους στο ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα.

Για τα πειράματα που ακολουθούν, διαμολύνθηκαν κύτταρα HeLa με το πλασμίδιο pRetroSuper-shp14ARF, το οποίο προκαλεί αποσιώπηση της πρωτεΐνης p14^{ARF}, μέσω τεχνολογίας “short-hairpin RNA”. Οι σταθερά μετασχηματισμένοι κλώνοι που προέκυψαν μετά από επιλογή με το αντιβιοτικό υδρομυκίνη Β, λύθηκαν προκειμένου να ληφθεί το ολικό κυτταρικό τους εκχύλισμα και ελέγχθησαν ως προς την έκφραση της p14^{ARF} με ανοσοαποτύπωση με ειδικό για την p14^{ARF} αντίσωμα (Εικόνα 3.5).

Κατά τον έλεγχο, προέκυψαν αρκετοί κλώνοι με υψηλά ποσοστά αποσιώπησης, εκ των οποίων επιλέξαμε τελικά για τα πειράματά μας τον κλώνο 12, ο οποίος εμφανίζει σχεδόν 100% αποσιώπηση.

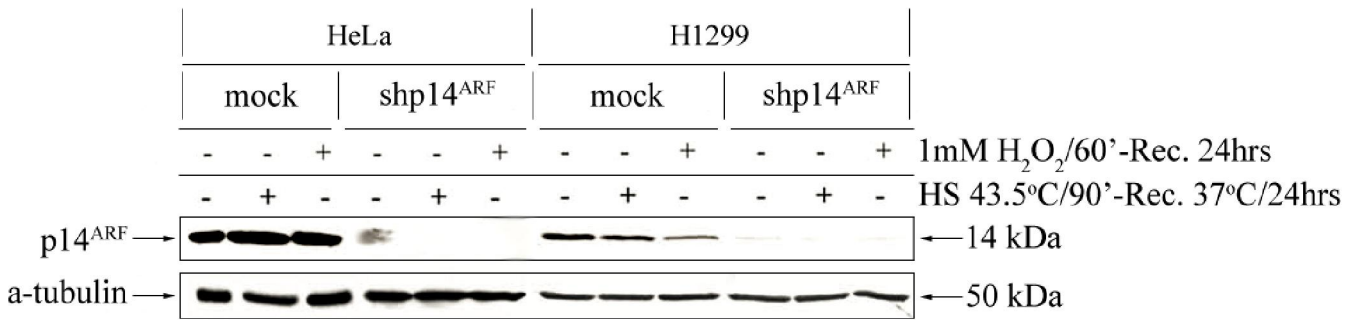


Εικόνα 3.5. Επιλογή σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων που φέρουν αποσιώπηση στην p14^{ARF}. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το φορέα pRetroSuper-shp14ARF. Μετά από επιλογή με το αντιβιοτικό υδρομυκίνη Β λήφθηκαν 15 σταθερά μετασχηματισμένοι κλώνοι. Από τους κλώνους αυτούς εξήχθη ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα και ελέγχθησαν ως προς την έκφραση της p14^{ARF}, μετά από SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 15% και ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την p14^{ARF} και ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-τουμπουλίνη, ως δείκτη ισοφόρτωσης. Ως καλύτερος κλώνος, επιλέχθηκε ο κλώνος 12, ο οποίος και θα χρησιμοποιηθεί εφεξής στα παρακάτω πειράματα.

3.4. Μελέτη έκφρασης της p14^{ARF} σε συνθήκες στρες

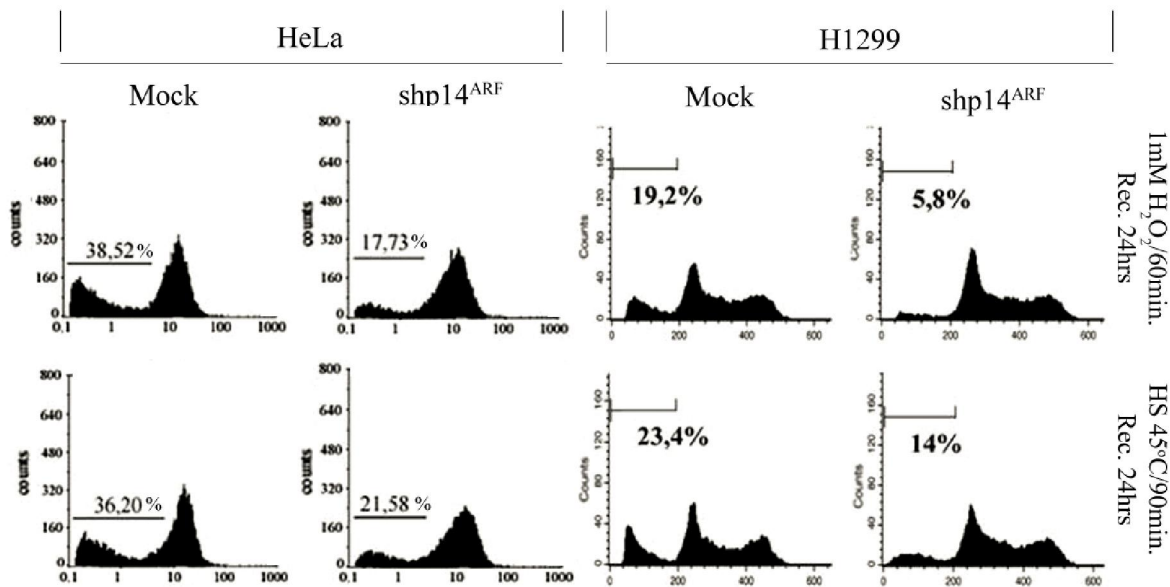
Χρησιμοποιώντας τα κύτταρα HeLa shp14ARF, αλλά και κύτταρα H1299 shp14ARF, καθώς και τα πατρικά τους κύτταρα HeLa και H1299, στα οποία η p53 είναι είτε ανενεργός, είτε δεν εκφράζεται αντίστοιχα, θελήσαμε να δούμε την επίδραση δύο κοινών τύπων στρες, του θερμικού και του οξειδωτικού, στην έκφραση της p14^{ARF}. Για το λόγο αυτό, τα παραπάνω κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά με επακόλουθη επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, ή οξειδωτικό σοκ με επώαση σε 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά με ανάνηψη για 24 ώρες, ελέγχοντας την έκφρασή της p14^{ARF} και υπό φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 3.6).

Παρατηρήσαμε ότι κανένα από τα στρες που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στην ενδοκυτταρική ποσότητα της p14^{ARF}, τουλάχιστον για τα HeLa κύτταρα, ενώ στα H1299, παρατηρήθηκε μια μείωση στην ποσότητά της μετά από στρες, ιδίως στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες (Εικόνα 3.16). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η παρουσία της p14^{ARF} στα κύτταρα δεν εξαρτάται από το στρες.



Εικόνα 3.6. Η επίδραση του θερμικού και οξειδωτικού στρες στην έκφραση της p14^{ARF}. Κύτταρα HeLa, H1299 και οι αντίστοιχοι κλώνοι τους που φέρουν αποσιώπηση της p14^{ARF}, υποβλήθηκαν σε θερμικό πλήγμα (43.5° C/90 min) με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, ή ισχυρό οξειδωτικό πλήγμα, επωάζοντάς τα σε 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά με μετέπειτα ανάνηψη για 24 ώρες. Στη συνέχεια, λήφθηκε το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμά τους, υποβλήθηκε σε SDS-PAGE και ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα η έκφραση της p14^{ARF} και η ισοφόρτωση των δειγμάτων με ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-τουμπουλίνη.

3.5. Μελέτες της επίδρασης της p14^{ARF} στην απόπτωση HeLa και H1299 κυττάρων μετά από στρες μέσω κυτταρομετρίας ροής



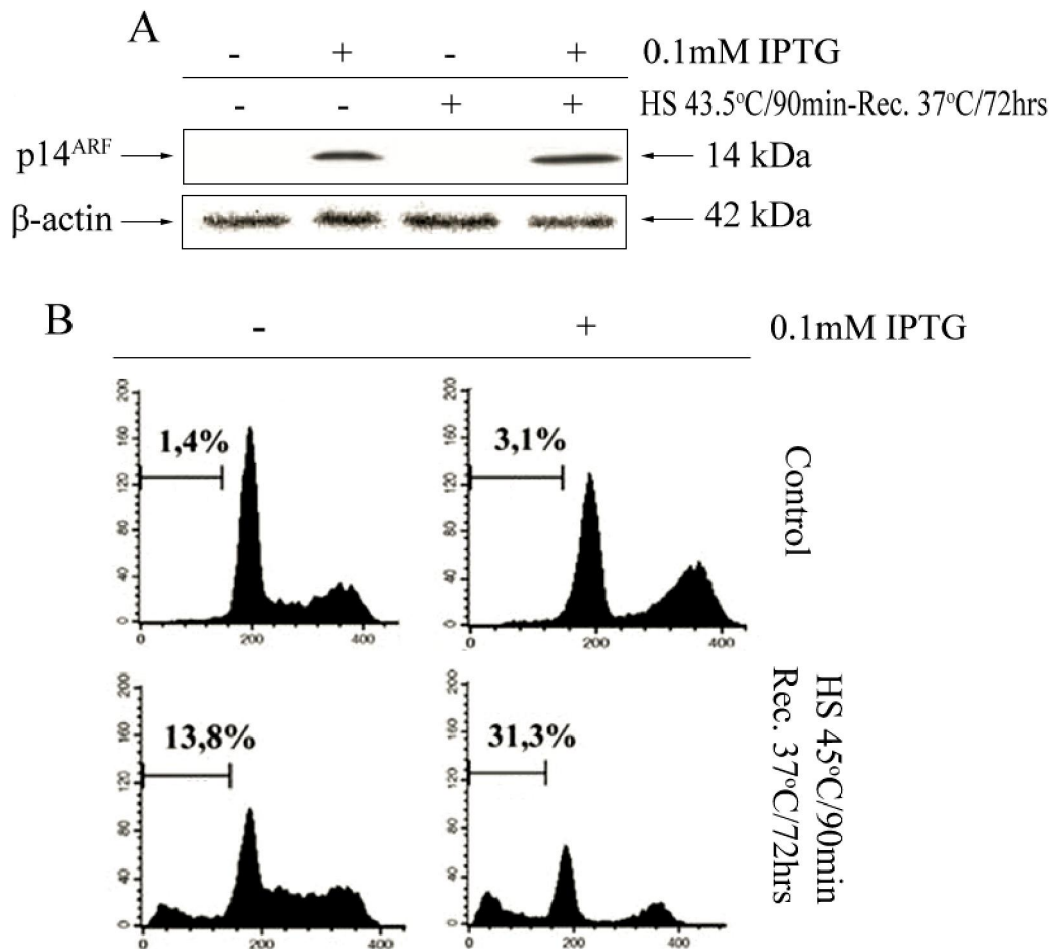
Εικόνα 3.7. Μελέτη της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa και H1299 μετά από θερμικό και οξειδωτικό στρες. Κύτταρα HeLa, H1299 και οι αντίστοιχοι κλώνοι τους που φέρουν αποσιώπηση της p14^{ARF} μέσω shRNA τεχνολογίας υποβλήθηκαν σε θερμικό πλήγμα (45° C/90 λεπτά) με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, ή σε οξειδωτικό στρες, επωάζοντάς τα σε 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά με ανάνηψη για 24 ώρες. Τα κύτταρα ακολούθως εξετάστηκαν για την απόπτωσή τους με τη βοήθεια κυτταρομέτρου ροής, μετά από χρώση με 50 µg/ml Propidium Iodide μετρώντας τους διαφοροποιημένους πληθυσμούς (HeLa κύτταρα), ή τα υποδιπλοειδή κύτταρα (H1299 κύτταρα).

Γνωρίζοντας πλέον ότι το στρες δεν επηρεάζει την κατάσταση της p14^{ARF}, θελήσαμε να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζει η p14^{ARF} στην

απόπτωση μετά από στρες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν, όπως και παραπάνω, οι κυτταρικές σειρές HeLa και H1299 και οι αντίστοιχες σταθερά μετασχηματισμένες σειρές που φέρουν αποσιώπηση της $p14^{ARF}$. Οι σειρές αυτές υποβλήθηκαν σε θνησιγενές θερμικό σοκ στους $45^{\circ}C$ για 90 λεπτά με επαναφορά στους $37^{\circ}C$ για 24 ώρες, ή σε ισχυρό οξειδωτικό σοκ με επώαση των κυττάρων σε 1 mM υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) για 60 λεπτά, με επακόλουθη ανάνηψη για 24 ώρες και εξετάστηκαν ως προς την απόπτωσή τους σε κυτταρόμετρο ροής μετά από χρώση με “propidium iodide”.

Τόσο μετά από θερμικό, όσο και μετά από οξειδωτικό σοκ, παρατηρήσαμε μια αισθητή μείωση στα επίπεδα των αποπτωτικών κυττάρων στην περίπτωση αποσιώπησης της $p14^{ARF}$ και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.7), γεγονός που υποδηλώνει ότι η οφειλόμενη σε θερμικό ή οξειδωτικό σοκ απόπτωση εξαρτάται από την παρουσία της $p14^{ARF}$.

3.6. Η απουσία της $p14^{ARF}$ εξασθενεί την αποπτωτική απόκριση των κυττάρων μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες



Εικόνα 3.8. Επιβεβαίωση συσχέτισης $p14^{ARF}$ -απόπτωσης με την κυτταρική σειρά NARF2.

A: Κύτταρα NARF2 υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες θερμικού σοκ ($43.5^{\circ}C/90$ λεπτά – επαναφορά $37^{\circ}C/72$ ώρες), πριν και μετά την προσθήκη IPTG, ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση της $p14^{ARF}$ με ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την $p14^{ARF}$ και τη β -ακτίνη ως μάρτυρα ισοφόρτωσης.

B: Κύτταρα NARF2 σε φυσιολογικές συνθήκες ή μετά από θερμικό πλήγμα στους $45^{\circ}C$ για 90 λεπτά με επαναφορά στους $37^{\circ}C$ για 72 ώρες, πριν και μετά την προσθήκη IPTG, μελετήθηκαν ως προς την αποπτωτικότητα τους σε κυτταρόμετρο ροής, μετά από χρώση με propidium iodide.

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της συσχέτισης της απόπτωσης με την p14^{ARF}, χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά NARF2. Πρόκειται για μια κυτταρική σειρά που προέρχεται από την κυτταρική σειρά U2OS, η οποία εκφράζει την αγρίου τύπου p53 και στην οποία η έκφραση της p14^{ARF} πυροδοτείται από την παρουσία IPTG (Εικόνα 3.8A). Τα κύτταρα αυτά ελέγχθησαν με ανοσοαποτύπωση ως προς την έκφραση της p14^{ARF}, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα, υπό φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες θερμικού σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά, με επαναφορά στους 37° C για 72 ώρες πριν και μετά την προσθήκη 0.1 mM IPTG, ενώ ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά τη β-ακτίνη (Εικόνα 3.8A). Παράλληλα, η κυτταρική αυτή σειρά ελέγχθηκε ως προς την απόπτωση που παρουσίαζε υπό φυσιολογικές συνθήκες, ή μετά από ακραίο θερμικό σοκ στους 45° C για 90 λεπτά και επαναφορά στους 37° C για 24 και 72 ώρες, πριν και μετά την προσθήκη IPTG με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, μετά από χρώση με PI, καταμετρώντας τα υποδιπλοειδή κύτταρα (Εικόνα 3.8B).

Παρατηρήσαμε ότι και σε αυτή την κυτταρική σειρά το θερμικό σοκ δε μεταβάλλει σημαντικά την έκφραση της p14^{ARF} μετά από την επαγωγή της με IPTG (Εικόνα 3.8A). Όσον αφορά στα πειράματα που έγιναν με την κυτταρομετρία ροής, στις 24 ώρες επαναφοράς μετά το θερμικό σοκ, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην απόπτωση (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), πιθανά εξαιτίας της ενεργοποίησης του άξονα p14^{ARF}-p53, που οδηγεί σε στάση του κυτταρικού κύκλου. Μετά από 72 ώρες επαναφοράς όμως, η αποπτωτικότητα των κυττάρων στα οποία είχε ενεργοποιηθεί μέσω IPTG η p14^{ARF} ήταν σημαντικά μεγαλύτερη (Εικόνα 3.8B).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις τρεις κυτταρικές σειρές, οδηγούμαστε στο σημαντικό συμπέρασμα ότι η απόπτωση μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την παρουσία της p14^{ARF} και συγκεκριμένα, η απουσία της p14^{ARF} προσδίδει ανθεκτικότητα από την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα μετά από θερμικό ή οξειδωτικό σοκ και μάλιστα η παρατηρούμενη απόπτωση είναι ανεξάρτητη από την p53, όπως μαρτυρούν οι κυτταρικές σειρές HeLa και H1299, οι οποίες όπως έχει ήδη αναφερθεί, εμφανίζουν μη λειτουργική, ή δεν εκφράζουν καθόλου την p53.

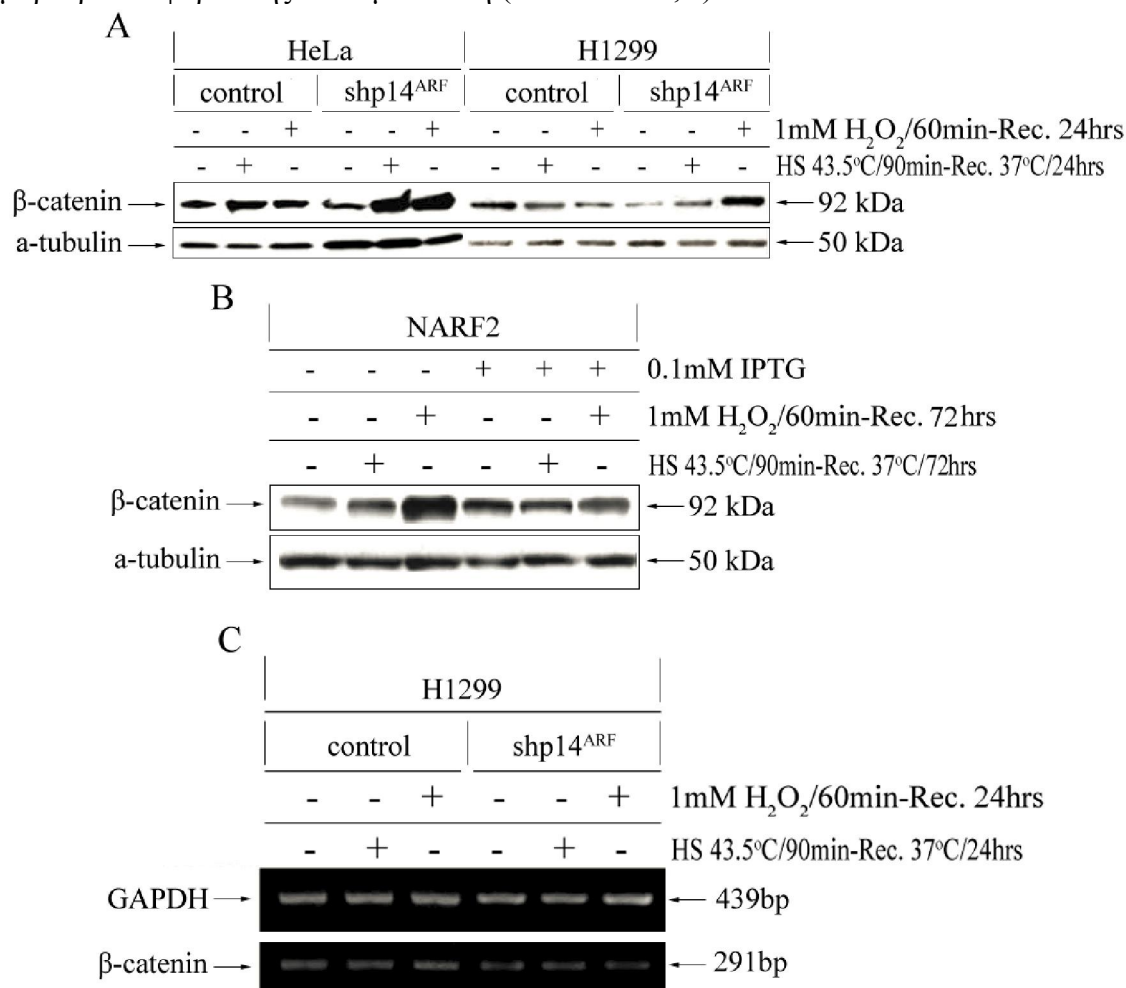
3.7. Έλεγχος έκφρασης της β-κατενίνης μετά από στρες σε καρκινικά κύτταρα

Έχοντας ως δεδομένη την ελάττωση των επιπέδων της απόπτωσης απουσία της p14^{ARF}, υποθέσαμε ότι υπό συνθήκες θερμικού και οξειδωτικού στρες, η p14^{ARF} θα μπορούσε να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση ενός παράγοντα επιβίωσης, ο οποίος θα ήταν και υπεύθυνος για τη μειωμένη απόπτωση στους κυτταρικούς κλώνους που φέρουν αποσιώπηση της p14^{ARF}. Ο παράγοντας αυτός θα μπορούσε να αποτελεί ενεργοποιητή της έκφρασης της p14^{ARF}, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη έκφρασή της στα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε (HeLa, H1299, NARF2).

Ερευνώντας τη σχετική βιβλιογραφία, διαπιστώσαμε ότι μια τέτοια πρωτεΐνη θα μπορούσε δυνητικά να αποτελεί η β-κατενίνη, μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη με μεταγραφική ενεργότητα που δρα πιθανά ως επαγωγέας της p14^{ARF} (Saegusa et al., 2006) και υπερεκφράζεται συχνά σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων (Kotsinas et al., 2002), όπως και τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε στις μελέτες μας.

Για τη διερεύνηση της ορθότητας της υπόθεσής μας, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα HeLa, H1299 και τους αντίστοιχους κλώνους τους που φέρουν αποσιώπηση της p14^{ARF}, καθώς και κύτταρα NARF2 πριν και μετά τη χορήγηση IPTG. Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ (43.5° C για 90 λεπτά) με

επαναφορά 72 ωρών στους 37° C για την κυτταρική σειρά NARF2 και 24 ωρών για τις άλλες κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, οι κυτταρικές σειρές επωάστηκαν σε 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά, με χρόνους ανάνηψης ίδιους με το θερμικό σοκ για την κάθε κυτταρική σειρά. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν για να πάρουμε το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα και ελέγχθησαν για την έκφραση της β-κατενίνης, μετά από SDS-PAGE, μέσω ανοσοαποτύπωσης με ειδικά αντισώματα για τη β-κατενίνη και το μάρτυρα ισοφόρτωσης α-τουμπουλίνη (Εικόνα 3.9A,B).



Εικόνα 3.9. Τα επίπεδα της β-κατενίνης αυξάνονται μετά από στρες, απουσία της p14^{ARF}.

A: Κύτταρα HeLa, H1299 και οι σταθερά μετασηματισμένοι κλώνοι τους που δεν εκφράζουν την p14^{ARF}, υποβλήθηκαν σε θερμικό στρες στους 43.5° C για 90 λεπτά, με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, ή επωάστηκαν με 1mM H₂O₂ για 60 λεπτά, με ανάνηψη 24 ωρών, λύθηκαν για να λάβουμε το ολικό πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα και ελέγχθησαν ως προς την έκφραση της β-κατενίνης με ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα μετά από SDS-PAGE, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα ισοφόρτωσης ειδικό αντίσωμα για την α-τουμπουλίνη.

B: Το ίδιο επαναλήφθηκε σε κύτταρα NARF2 πριν και μετά την προσθήκη IPTG.

C: Κύτταρα H1299 και ο κλώνος τους που φέρει αποσιώπηση της p14^{ARF} υποβλήθηκαν σε θερμικό και οξειδωτικό στρες όπως στο ένθετο A και ελέγχθησαν ως προς την έκφραση της β-κατενίνης με έλεγχο μέσω RT-PCR και μάρτυρα ισοφόρτωσης την πρωτεΐνη GAPDH.

Σε συμφωνία ως προς την αρχική μας υπόθεση, παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα

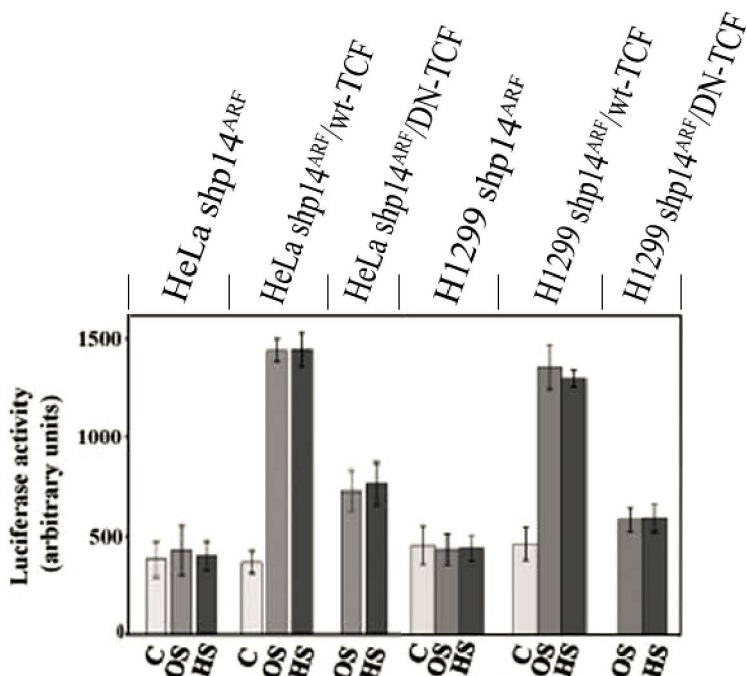
της β-κατενίνης αυξήθηκαν σημαντικά μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες στους κλώνους των HeLa και H1299 όπου είχε αποσιωπηθεί η p14^{ARF} (Εικόνα 3.9A), όπως και στα κύτταρα NARF2 τα οποία δεν είχαν επωαστεί με IPTG (Εικόνα 3.9B). Αντιθέτως, στα κύτταρα τα οποία εκφράζουν την p14^{ARF} σε υψηλά επίπεδα (πατρικά HeLa και H1299 και NARF2 κύτταρα μετά από επώαση με IPTG), κανένας τύπος στρες δεν μετέβαλλε, ή ελάττωσε ελάχιστα τα επίπεδα της β-κατενίνης (Εικόνα 3.9A,B).

Ακολουθώς, θελήσαμε να εξετάσουμε την έκφραση της β-κατενίνης μετά από στρες σε επίπεδο mRNA. Για το λόγο αυτό, κύτταρα H1299 και ο σταθερά μετασχηματισμένος κλώνος τους που δεν εκφράζει την p14^{ARF} υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό και θερμικό στρες, όπως αναφέρθηκε σε παραπάνω παράγραφο και ακολούθησε λύση τους για λήψη RNA που θα χρησιμοποιούνταν ως εκμαγείο για την παραγωγή cDNA, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Ενότητα 2.27) και έλεγχος με RT-PCR. Ως μάρτυρας για τον έλεγχο της ποσότητας του DNA που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση, πραγματοποιήθηκε RT-PCR με υποκινητές ειδικούς για το mRNA του γονιδίου της GAPDH, που είναι μια πρωτεΐνη κυτταρικής οικονομίας. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν ως προς το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Εικόνα 3.9C).

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά από RT-PCR, μας υπέδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της β-κατενίνης παρέμειναν σταθερά σε συνθήκες στρες σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε φυσιολογικές συνθήκες στα κύτταρα στα οποία απουσίαζε η p14^{ARF} (Εικόνα 3.20C), γεγονός που μας ωθεί να συμπεράνουμε ότι η αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης μετά από στρες οφείλεται στη μετα-μεταφραστική σταθεροποίηση της β-κατενίνης.

3.8. Μελέτη ικανότητας μεταγραφικής ενεργοποίησης από το γονίδιο της β-κατενίνης μέσω ενεργότητας λουσιφεράσης

Για να ελέγξουμε εάν τα αυξημένα επίπεδα της β-κατενίνης που παρατηρήσαμε συνοδεύταν και από αυξημένη ικανότητα ενεργοποίησης άλλων παραγόντων που συνεργάζονται με αυτήν, διαμολύνουμε τα κύτταρα HeLa shp14^{ARF}



Εικόνα 3.10. Έλεγχος της ενεργότητας της β-κατενίνης απουσία της p14^{ARF}. Κύτταρα HeLa και H1299 τα οποία δεν εκφράζουν την p14^{ARF}, διαμολύνθηκαν με φορέα που φέρει γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης, μαζί με τον τεχνητό υποκινητή του γονιδίου της β-κατενίνης, ή με ένα φορέα που φέρει τον αρνητικώς επικρατή υποκινητή του γονιδίου της β-κατενίνης. Τα κύτταρα αυτά υποβλήθηκαν σε θερμικό και οξειδωτικό στρες και μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση από το γονίδιο της β-κατενίνης με δοκιμασία λουσιφεράσης. C: κύτταρα που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες OS: οξειδωτικό στρες (1 mM H₂O₂ /60min – Rec. 24 hr) HS: θερμικό πλήγμα (43.5° C/90min – Rec. 37° C/24 hr)

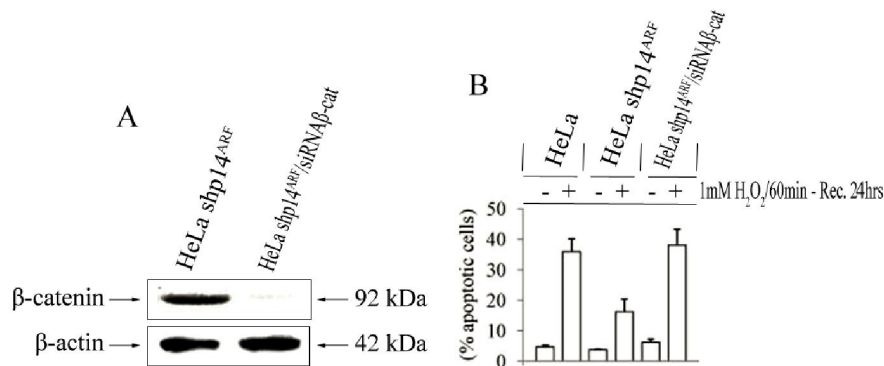
και τα κύτταρα H1299 shp14^{ARF} με το φορέα TOP-flash, ένα πλασμίδιο αναφοράς που φέρει ένα τεχνητό υποκινητή που περιέχει TCF-προσδένουσες περιοχές (wt-TCF) (αλληλουχίες απόκρισης της β-κατενίνης), αλλά και με ένα αρνητικά επικρατή φορέα TCF (DN-TCF) που ανταγωνίζεται την πρόσδεση του υποκινητή της β-κατενίνης, προκειμένου να μελετήσουμε τις διαφορές στην ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης άλλων γονιδίων συνεργατών της β-κατενίνης. Οι μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές υποβλήθηκαν σε θερμικό στρες (43.5° C για 90 λεπτά) με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, ή επώαστηκαν με 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά, με μετέπειτα ανάνηψη για 24 ώρες και ελέγχθησαν ως προς τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου της β-κατενίνης μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των Υλικών-Μεθόδων (Ενότητα 2.28).

Μετά από στρες, στην περίπτωση των HeLa κυττάρων, παρατηρήσαμε μια αύξηση στην μεταγραφική ικανότητα της β-κατενίνης κατά 4 φορές, στην περίπτωση του φορέα που φέρει τις αγρίου τύπου θέσεις πρόσδεσης της β-κατενίνης, σε σχέση με τα πατρικά HeLa shp14^{ARF} κύτταρα (Εικόνα 3.10). Στην περίπτωση του αρνητικώς επικρατή υποκινητή (DN-TCF), παρατηρήθηκε αυξημένη μεν, αλλά μικρότερη ενεργότητα σε σχέση με τα wt-TCF κύτταρα, της τάξης των 2 φορών, σε σχέση με τα αγρίου τύπου HeLa shp14^{ARF} κύτταρα (εικόνα 3.10).

Παρόμοια αποτελέσματα, με μικρότερα όμως ποσοστά μεταγραφικής ικανότητας ενεργοποίησης, παρατηρήσαμε και στην περίπτωση των H1299 κυττάρων (Εικόνα 3.10).

3.9. Η β-κατενίνη εμφανίζει αντι-αποπτωτική δράση απουσία της p14^{ARF}

Γνωρίζοντας την επίδραση p14^{ARF} στην απόπτωση, θελήσαμε να μελετήσουμε με ποιο τρόπο επιδρά η β-κατενίνη στη διαδικασία της απόπτωσης. Βιβλιογραφικά, είναι γνωστό ότι η μειορρύθμιση της β-κατενίνης οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα (Liu et al., 2011), ενώ η μειωμένη έκφραση της β-κατενίνης σε ασθενείς με καρκίνο, αυξάνει την επιβίωσή τους (Kastritis et al., 2009). Έχοντας υπόψιν μας αυτές τις μελέτες, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν κάτι τέτοιο ισχύει και στα δικά μας κύτταρα. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε αποσιώπηση της β-



Εικόνα 3.11. Μελέτη του ρόλου της β-κατενίνης στην απόπτωση.

A: Σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα HeLa shp14^{ARF} διαμολύνθηκαν με την ειδική αλληλουχία αποσιώπησης της β-κατενίνης μέσω Stealth RNAi τεχνολογίας. Από τα κύτταρα αυτά, όπως και από τα πατρικά τους, λήφθηκε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα και μετά από SDS-PAGE, ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση η έκφραση της β-κατενίνης.

B: Στα ίδια κύτταρα, όπως και στα πατρικά HeLa, μελετήθηκε η αποπτωτικότητα με τη βοήθεια κυτταρομέτρου ροής μετά από χρώση με 50 μg/ml PI, ακολουθώντας επώαση με 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά και ανάνηψη των κυττάρων για 24 ώρες.

κατενίνης μέσω RNAi τεχνολογίας (ενότητα 2.25.3) σε κύτταρα που ήδη είχαν αποσιωπημένη την p14^{ARF} και ελέγξαμε την έκφρασή της υπό φυσιολογικές συνθήκες τόσο στα πατρικά κύτταρα (HeLa shp14^{ARF}), όσο και στα κύτταρα που έφεραν διπλή αποσιώπηση, λαμβάνοντας το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα και από τις δύο κυτταρικές σειρές και πραγματοποιώντας SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικό για τη β-κατενίνη αντίσωμα, χρησιμοποιώντας αντίσωμα β-ακτίνης ως μάρτυρα για την ισοφόρτωση των δειγμάτων (Εικόνα 3.11A). Παράλληλα, κύτταρα HeLa, όπως και οι σταθερά μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές που φέρουν αποσιώπηση της p14^{ARF} και διπλή αποσιώπηση για την p14^{ARF} και τη β-κατενίνη, υποβλήθηκαν σε ισχυρό οξειδωτικό σοκ (60 λεπτά σε 1 mM H₂O₂) με ανάνηψη για 24 ώρες και μελετήθηκαν με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής για την απόπτωση που παρουσίαζαν μετά από χρώση με PI, μετρώντας τα υποδιπλοειδή κύτταρα (Εικόνα 3.11B).

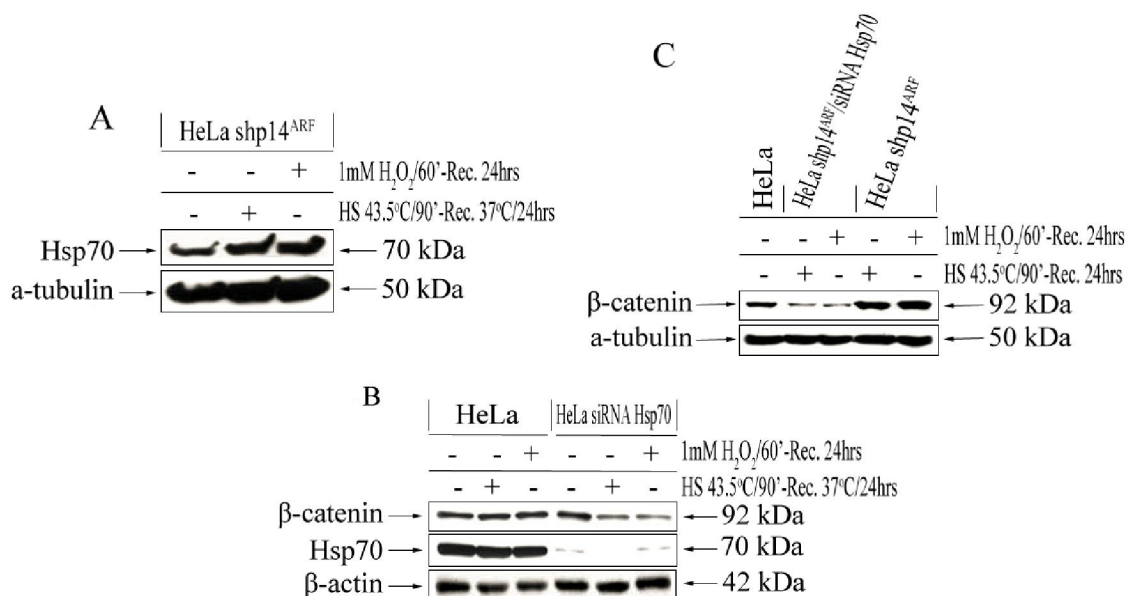
Παρατηρήσαμε ότι η σχεδόν παντελής αποσιώπηση της β-κατενίνης στα κύτταρα HeLa shp14^{ARF} (Εικόνα 3.11A), επαναφέρει τα ποσοστά της απόπτωσης μετά από οξειδωτικό στρες στα ίδια επίπεδα με τα πατρικά HeLa κύτταρα (Εικόνα 3.11B), υποδηλώνοντας έναν αντι-αποπτωτικό ρόλο της β-κατενίνης, απουσία της p14^{ARF}.

3.10. Η Hsp70 ρυθμίζει την έκφραση της β-κατενίνης και συνεργάζεται με την p14^{ARF}

Ο καλά χαρακτηρισμένος ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στην απόκριση των κυττάρων μετά από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα και στον καρκίνο (Solimini et al., 2007), μας προέτρεψε να μελετήσουμε εάν η Hsp70 εμπλέκεται με κάποιον τρόπο στο προστατευτικό μονοπάτι που ασκεί η β-κατενίνη στο θερμικό και το οξειδωτικό στρες.

Έχοντας ήδη αποδείξει τη συσχέτιση μεταξύ β-κατενίνης και p14^{ARF}, ξεκινήσαμε να δούμε εάν η απουσία της p14^{ARF} επηρεάζει με κάποιον τρόπο την έκφραση της Hsp70. Για το λόγο αυτό, κύτταρα HeLa shp14^{ARF}, υποβλήθηκαν σε θερμικό και οξειδωτικό στρες στις συνθήκες που έχουν ήδη αναφερθεί και ελέγχθησαν ως προς την έκφραση της Hsp70 με ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα ισοφόρτωσης την α-τουμπουλίνη. Ως αναμένετο, τα ποσά της Hsp70 αυξήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 3.12A).

Στη συνέχεια, υποκινούμενοι από την επαγωγή τόσο της Hsp70, όσο και της β-κατενίνης μετά από στρες, αλλά και σε συνδυασμό με παλαιότερες αναφορές (Weiss et al., 2007) υποθέσαμε ότι ίσως να υφίσταται κάποιος λειτουργικός ρόλος μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Προκειμένου να εξακριβώσουμε αυτή τη σχέση, χρησιμοποιήσαμε τα σταθερά μετασηματισμένα HeLa κύτταρα στα οποία έχουμε αποσιωπήσει την έκφραση της Hsp70, ενώ προχωρήσαμε στην αποσιώπηση της Hsp70 και στα κύτταρα τα οποία φέρουν αποσιώπηση της p14^{ARF}. Οι κυτταρικές αυτές σειρές, μαζί με τα πατρικά κύτταρα, υποβλήθηκαν σε συνθήκες θερμικού (43.5° C/90min με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες) και οξειδωτικού στρες (1 mM H₂O₂/60min με ανάνηψη για 24 ώρες). Με μεγάλο ενδιαφέρον, παρατηρήσαμε ότι στην περίπτωση που απουσιάζει από τα κύτταρα η Hsp70, παρατηρείται και ελάττωση στην ποσότητα της β-κατενίνης μετά από στρες (Εικόνα 3.12B), γεγονός που ενισχύεται ακόμα περισσότερο στην περίπτωση ταυτόχρονης απουσίας της p14^{ARF} και της Hsp70 (Εικόνα 3.23C), ενώ στα κύτταρα που απουσιάζει μόνο η p14^{ARF}, τα ποσά της β-κατενίνης είναι φυσιολογικά αυξημένα (Εικόνες 3.9A, 3.12C). Οι παραπάνω παρατηρήσεις, μαρτυρούν ένα πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της Hsp70, σε συνεργασία και με την p14^{ARF}, όσον αφορά στην έκφραση της β-κατενίνης.



Εικόνα 3.12. Η Hsp70 εμπλέκεται στην έκφραση της β-κατενίνης μετά από στρες, σε συνεργασία με την p14^{ARF}

A: Σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα HeLa που δεν εκφράζουν την p14^{ARF} υποβλήθηκαν σε θερμικό (43.5° C για 90 λεπτά με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες) ή οξειδωτικό στρες (1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά με μετέπειτα ανάνηψη για 24 ώρες), λήφθηκε το ολικό κυτταρικό τους εκχύλισμα και ελέγχθηκαν ως προς την επαγωγή της Hsp70 μετά από SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικό για την Hsp70 αντίσωμα, χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την α-τουμπουλίνη ως μάρτυρα ισοφόρτωσης.

B: Πατρικά κύτταρα HeLa και ο σταθερά μετασχηματισμένος κλώνος τους που δεν εκφράζει την Hsp70, υποβλήθηκαν στις ίδιες συνθήκες στρες όπως στο (A), λήφθηκε το κυτταρικό τους εκχύλισμα και ελέγχθηκαν ως προς την ποσότητα της β-κατενίνης μετά από SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα ισοφόρτωσης τη β-ακτίνη, ενώ ελέγχθηκε και η έκφραση της Hsp70.

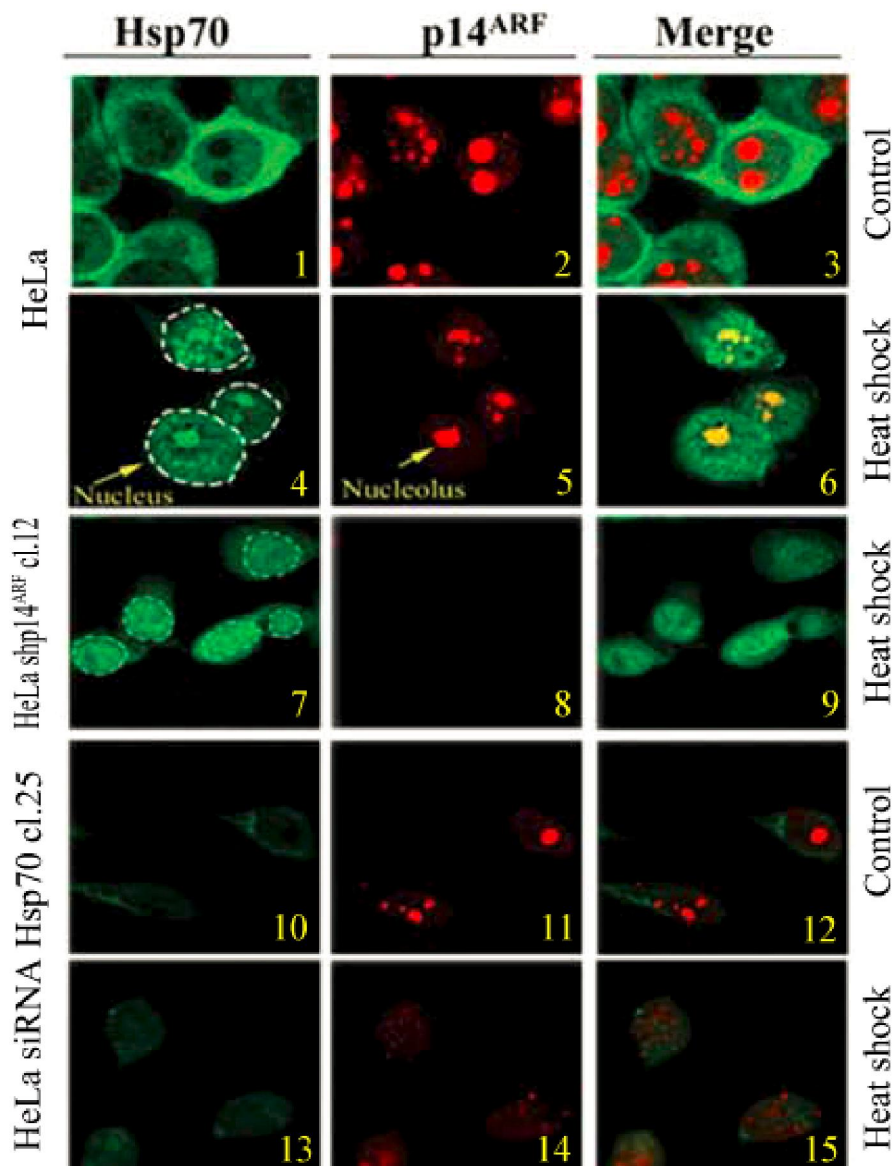
C: Κύτταρα HeLa που δεν εκφράζουν την p14^{ARF}, διαμολύνθηκαν με το φορέα που μέσω siRNA τεχνολογίας αποσιωπεί την Hsp70. Τα κύτταρα αυτά, μαζί με πατρικά HeLa κύτταρα, αλλά και σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα HeLa που δεν εκφράζουν την p14^{ARF}, υποβλήθηκαν στις ίδιες συνθήκες στρες όπως στο (A) και ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση ως προς την έκφραση της β-κατενίνης, χρησιμοποιώντας α-τουμπουλίνη ως μάρτυρα ισοφόρτωσης.

3.11. Η Hsp70 συνεργάζεται άμεσα με την p14^{ARF} σε συνθήκες στρες

Η εμφανής εμπλοκή της p14^{ARF} ως αισθητήρα θερμικού και οξειδωτικού στρες, μας οδήγησε να εξετάσουμε μια πιθανή άμεση σχέση ανάμεσα στην Hsp70 και την p14^{ARF}. Για να επιβεβαιώσουμε μια πιθανή λειτουργική σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του διπλού ανοσοφθορισμού και την παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο, προκειμένου να εξετάσουμε πιθανό συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα, γεγονός που θα μπορούσε να υποδηλώσει και την άμεση λειτουργική τους σχέση.

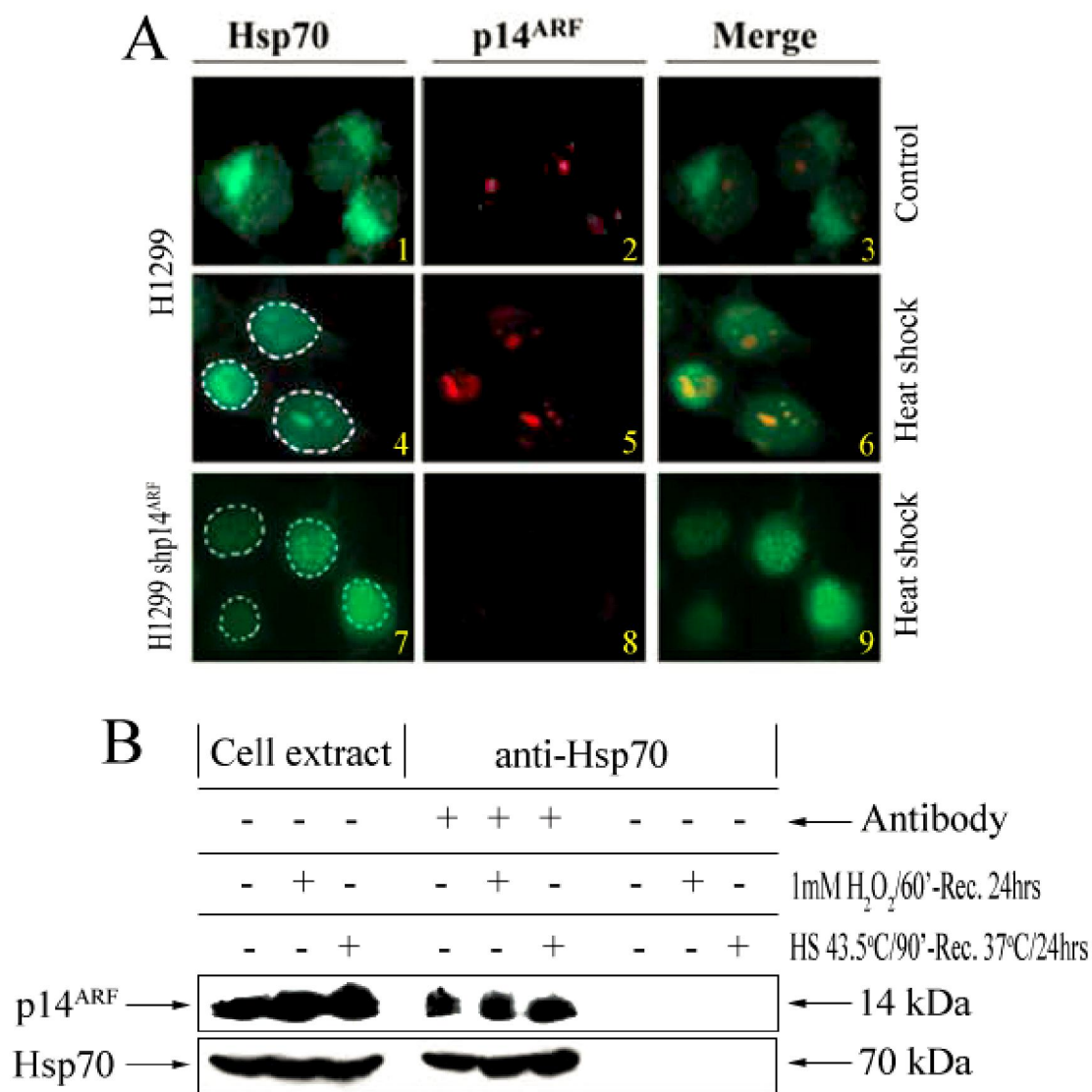
Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, χρησιμοποιήσαμε πατρικά HeLa κύτταρα, αλλά και τους σταθερά μετασχηματισμένους κλώνους των HeLa με αποσιωπημένη την Hsp70 ή την p14^{ARF}, καθώς και πατρικά H1299 κύτταρα και το σταθερά μετασχηματισμένο κλώνο τους που φέρει αποσιώπηση της p14^{ARF}. Τα κύτταρα εξετάστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, αλλά και μετά από θερμικό σοκ στους 43.5° C για 90 λεπτά με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεϋδης 2% και παρατηρήθηκαν

σε συνεστιακό μικροσκόπιο μετά από διπλό ανοσοφθορισμό με αντισώματα ειδικά για την Hsp70 και την p14^{ARF}.



Εικόνα 3.13. Η Hsp70 και η p14^{ARF} συνεντοπίζονται στους πυρηνίσκους σε HeLa κύτταρα μετά από θερμικό πλήγμα. Τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο μετά από διπλό ανοσοφθορισμό με ειδικά για την Hsp70 και p14^{ARF} αντισώματα σε HeLa κύτταρα (ένθετα 1 έως 6), HeLa shp14^{ARF} κύτταρα (ένθετα 7 έως 9) και HeLa siRNA Hsp70 κύτταρα (ένθετα 10-15) υπό φυσιολογικές συνθήκες, ή μετά από θερμικό πλήγμα στους 43.5° C για 90 λεπτά, με επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, που δείχνουν την ταυτόχρονη ανίχνευση των δύο πρωτεϊνών στους πυρηνίσκους μετά από θερμικό στρες.

Τα αποτελέσματα των ανοσοφθορισμών έδειξαν συνεντοπισμό της Hsp70 και της p14^{ARF} στους πυρηνίσκους τόσο των HeLa κυττάρων (Εικόνα 3.13, ένθετο 6), όσο και των H1299 κυττάρων (Εικόνα 3.14A, ένθετο 6), μετά από θερμικό σοκ. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αποσιώπηση της p14^{ARF} οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση της Hsp70 στους πυρηνίσκους μετά από θερμικό σοκ, με αυξημένη εντόπισή της στο κυτταρόπλασμα (Εικόνες 3.13, ένθετα 7 και 9 και 3.14A, ένθετα 7 και 9). Ανάλογο αποτέλεσμα παρατηρούμε στην περίπτωση αποσιώπησης της Hsp70, οπότε η p14^{ARF} εμφανίζεται κατακερματισμένη εντός του πυρήνα (Εικόνα 3.13, ένθετα 14 και 15).



Εικόνα 3.14. Συνεντοπισμός και συγκατακρήμιση Hsp70 και p14^{ARF} φανερώνουν ένα κοινό λειτουργικό ρόλο σε περιπτώσεις στρες.

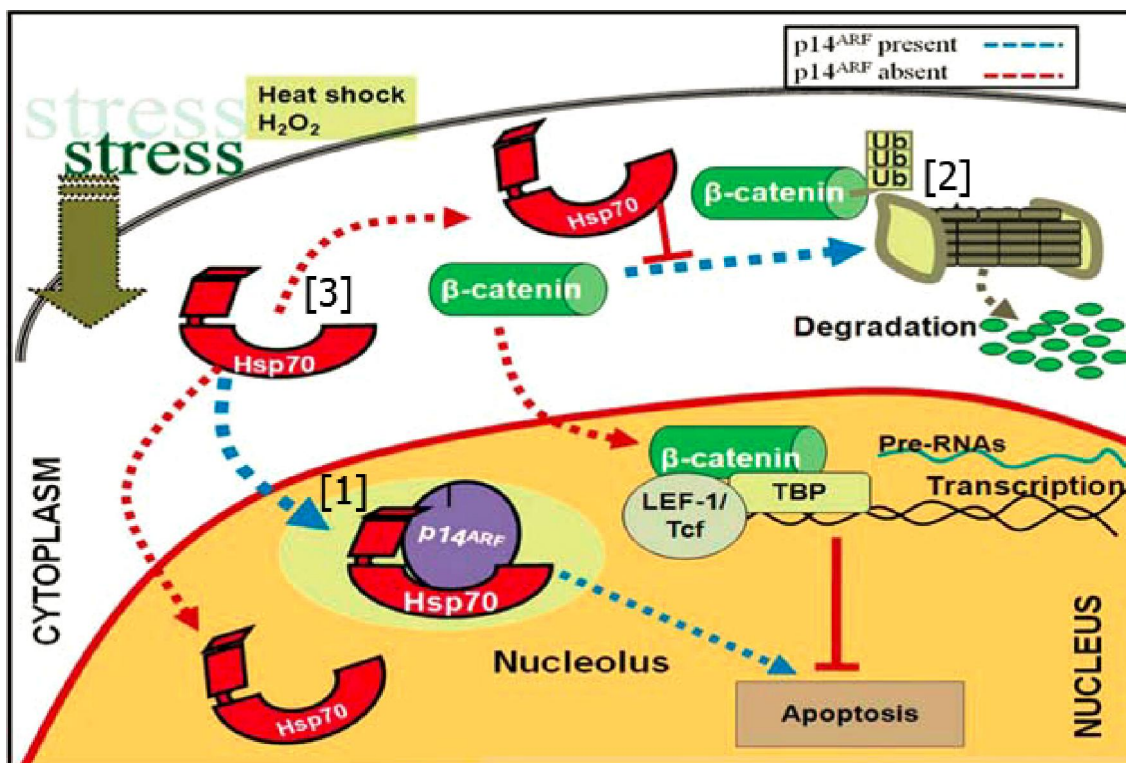
A: Τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο μετά από διπλό ανοσοφθορισμό με αντισώματα που αναγνωρίζουν την Hsp70 και την p14^{ARF} σε κύτταρα H1299 (ένθετα 1 έως 6) και σε κύτταρα H1299 shp14^{ARF} (ένθετα 7 έως 9) υπό φυσιολογικές συνθήκες και μετά από θερμικό πλήγμα στους 43.5° C για 90 λεπτά με μετέπειτα επαναφορά στους 37° C για 24 ώρες, φανερώνουν το συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών, όπως φαίνεται και στα HeLa κύτταρα (εικόνα 3.24).

B: Πειράματα συγκατακρήμισης σε ολικά εκχυλίσματα από HeLa κύτταρα με το αντίσωμα της Hsp70 μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες, αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες, έδειξαν την πιθανή συνεργασία των δύο πρωτεϊνών.

Ολοκληρώνοντας τα πειράματα που αφορούν τη συνεργασία των πρωτεϊνών Hsp70 και p14^{ARF}, επιβεβαιώσαμε τα ευρήματα των τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο με μελέτες ανοσοκατακρήμισης σε HeLa κύτταρα μετά από στρες (43.5° C για 90 λεπτά, ή 1 mM H₂O₂ για 60 λεπτά με επαναφορά και στις δύο περιπτώσεις για 24 ώρες), ή υπό φυσιολογικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας το ειδικό αντίσωμα για την Hsp70. Τα ευρήματα επιβεβαίωσαν τη συγκατακρήμιση της

p14^{ARF} με την Hsp70, ενισχύοντας την ιδέα της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών σε συνθήκες στρες.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι στην περίπτωση οξειδωτικού ή θερμικού στρες, η p14^{ARF} αλληλεπιδρά με την Hsp70, επιτρέποντας την αποικοδόμηση της β-κατενίνης, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση των κυττάρων. Ωστόσο, απουσία της p14^{ARF}, η Hsp70 συγκεντρώνεται σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, αυξάνοντας την ελεύθερη μορφή της, η οποία θα μπορούσε να καταστείλει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης, προωθώντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Εικόνα 3.15).

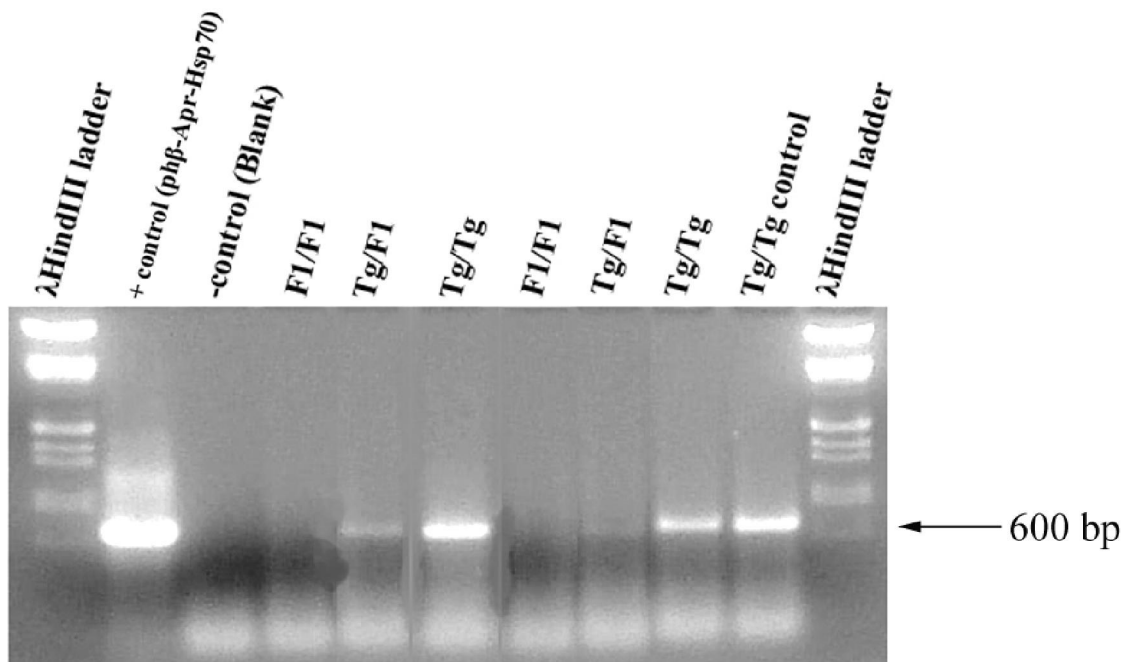


Εικόνα 3.15. Πιθανός μηχανισμός δράσης του άξονα Hsp70-p14^{ARF} στη ρύθμιση της β-κατενίνης. Στρεσογόνα ερεθίσματα όπως οξειδωτικό και θερμικό στρες επάγουν τη μετατόπιση της Hsp70 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η Hsp70 προσδένεται στην p14^{ARF}, όταν αυτή είναι παρούσα και συσσωρεύεται στους πυρηνίσκους χωρίς να επηρεάζει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης από την ουβικιτίνη. Στην περίπτωση απουσίας της p14^{ARF} όμως, η ποσότητα της Hsp70 που συσσωρεύεται στον πυρήνα είναι μικρότερη, αφήνοντας ένα αυξημένο κλάσμα της στο κυτταρόπλασμα, το οποίο προστατεύει τη β-κατενίνη από την αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα, δίνοντας έτσι στα κύτταρα τη δυνατότητα επιβίωσης.

Hsp70 & καρδιακή ανεπάρκεια

3.12. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ως μέσο ανίχνευσης της ομοζυγωτίας διαγονιδιακών ζώων

Στο δεύτερο μέρος μελετήσαμε τον προστατευτικό ρόλο της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια με τη χρήση ενός μοντέλου διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν σε όλους τους ιστούς που ελέγχθησαν, μεταξύ αυτών και της καρδιάς, την ανθρώπινη πρωτεΐνη Hsp70 (Heat shock protein 70). Η καρδιακή ανεπάρκεια είχε προκληθεί τεχνητά στα πειραματόζωα μέσω ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης δοξορουβικίνης. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης επάγει την απόπτωση των κυττάρων μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού (Kim et al., 2009α). Είναι επίσης γνωστό ότι χορήγηση δοξορουβικίνης σε κύτταρα ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών (Kotamraju et al., 2000; Casares et al., 2005; Liu et al., 2008) και ότι η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από διάφορες παθήσεις (de Jong et al., 2009). Ωστόσο δεν είναι γνωστό σε ποιο σημείο του επαγόμενου από τη δοξορουβικίνη αποπτωτικού μονοπατιού στο μυοκάρδιο ασκεί τον προστατευτικό της ρόλο η Hsp70.



Εικόνα 3.16. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο ύπαρξης του διαγονιδίου της Hsp70 σε ποντίκια. Ενδεικτική εικόνα των προϊόντων που λήφθηκαν μετά από PCR στο DNA που λήφθηκε από ουρές ομόζυγων (αγρίου τύπου – F1/F1 και διαγονιδιακών ποντικών – Tg/Tg), καθώς και ετερόζυγων (F1/Tg) ποντικών, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1.5%. Χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα DNA από όλα τα δείγματα, βλέπουμε ότι τα αγρίου τύπου ζώα δεν εμφανίζουν τη διαγνωστική ζώνη του διαγονιδίου στα 600 bp περίπου, ενώ τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν πολύ έντονη τη ζώνη αυτή. Η ενδιάμεση ένταση σε φωτεινότητα ζώνη αντιστοιχεί στα ετερόζυγα ζώα. Ως θετικός μάρτυρας για το ύψος της ζώνης του διαγονιδίου χρησιμοποιήθηκε ο φορέας υπερέκφρασης της Hsp70 pHβ-Apr-Hsp70, ενώ για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήσαμε DNA που λήφθηκε από διαγονιδιακό ποντίκι. Σαν αρνητικός μάρτυρας ελέγχου της PCR, χρησιμοποιήθηκε ddH₂O στη θέση του DNA.

Το αρχικό στάδιο στην παρούσα *in vivo* μελέτη αυτή ήταν η ταυτοποίηση των ποντικών ως προς το γενετικό τους χάρτη, όσον αφορά τουλάχιστον στην έκφραση της Hsp70. Έχοντας πραγματοποιήσει διασταυρώσεις ομόζυγων αγρίου τύπου ποντικών (F1/F1) με ομόζυγα διαγονιδιακά ως προς την Hsp70 ποντίκια (Tg/Tg ποντίκια που υπερεκφράζουν την Hsp70), προέκυψαν σε πρώτη φάση ετερόζυγα ως προς την έκφραση της Hsp70 ποντίκια (F1/Tg), βάσει μεντελικής κληρονομικότητας. Διασταυρώνοντας μεταξύ τους τα ετερόζυγα ζώα, βάσει επίσης μεντελιανής κληρονομικότητας με σχέση επικρατούς – υπολειπόμενου, αναμένουμε ανά γέννα 25% ομόζυγα αγρίου τύπου ζώα (F1/F1), 25% ομόζυγα διαγονιδιακά ζώα (Tg/Tg) και 50% ετερόζυγα ζώα (F1/Tg).

Προκειμένου να εξακριβώσουμε το γονιδιακό φορτίο κάθε ζώου, ελέγξαμε με τη βοήθεια PCR 100 ζώα (50 αρσενικά και 50 θηλυκά) με τον τρόπο που αναφέρθηκε στις ενότητες 2.29.3 και 2.29.4. Ακολούθως, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1.5% (Εικόνα 3.16). Τα ομόζυγα αγρίου τύπου ζώα δεν εμφανίζουν καθόλου προϊόν, σε αντίθεση προς τα ομόζυγα διαγονιδιακά, τα οποία φέρουν με μεγάλη ένταση φωτεινότητας τη διαγνωστική ζώνη του διαγονιδίου της Hsp70 στις 600 bp περίπου. Τα ετερόζυγα ζώα φέρουν και αυτά τη διαγνωστική ζώνη, με ένταση πολύ μικρότερη.

Τα επιβεβαιωμένα ετερόζυγα και ομόζυγα αγρίου τύπου ζώα θανατώθηκαν, ενώ κρατήθηκαν για περαιτέρω αναπαραγωγή και συνέχιση της αποικίας τα ομόζυγα διαγονιδιακά (29 τον αριθμό), τα οποία υπερεκφράζουν την Hsp70 και χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα.

3.13. Η παρουσία της Hsp70 βελτιώνει αισθητά την καρδιακή λειτουργία μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης

Έχοντας επιβεβαιώσει την ύπαρξη του διαγονιδίου στα υπό μελέτη ζώα προχωρήσαμε στην ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δοξορουβικίνης, με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 2.29.5, τόσο σε διαγονιδιακά, όσο και σε αγρίου τύπου ζώα. Τα ζώα μετά το πέρας του κύκλου ενέσεων, αλλά και ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες της καρδιακής λειτουργίας υπό φυσιολογικές συνθήκες και για τις δύο ομάδες, αναισθητοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κεταμίνη και εξετάστηκαν υπερηχοκαρδιογραφικά (ενότητα 2.29.6) ως προς διάφορες παραμέτρους χαρακτηριστικές της καρδιακής λειτουργίας και της καρδιακής παθολογίας (Πίνακας 3.2).

Ομόζυγα αγρίου τύπου (F1/F1) ποντίκια				
Δείκτες	Βασικές μετρήσεις (n=11)	Εβδομάδες μετά δοξορουβικίνης		
		4 (n=4)	6 (n=4)	10 (n=6)
Ηλικία (Μήνες)	8.9 (2.2)	13.0 (1.2) *	13.0 (1.2) *	12.6 (1.4) *
Σωματικό βάρος (g)	32.2 (3.3)	32.5 (3.4)	32.5 (5.2)	29.0 (2.3) *
Καρδιακός ρυθμός (παλμοί/λεπτό)	584 (68)	498 (44) *	520 (97)	550 (91)
AWTd (mm)	1.00 (0.09)	1.09 (0.19)	1.00 (0.14)	0.91 (0.06) *
PWTd (mm)	1.26 (0.14)	1.43 (0.15)	1.15 (0.15)	1.11 (0.11) *
LVDd (mm)	2.50 (0.31)	2.63 (0.24)	3.25 (0.36) *	2.56 (0.48)
LVDs (mm)	0.68 (0.14)	0.93 (0.22) *	1.49 (0.13) *	1.20 (0.22) *
Κλασματική βράχυνση (%)	73.0 (3.9)	65.0 (5.3) *	54.2 (3.6) *	52.7 (6.8) *
Μάζα αριστερής κοιλίας (g)	99.2 (19.9)	127.7 (31.2) *	132.2 (36.5) *	85.5 (21.1)
Μάζα αριστερής κοιλίας/σωματικό βάρος	3.1 (0.6)	4.0 (1.1)	4.0 (0.8) *	2.9 (0.7)
Αναλογία R/H	4.06 (0.52)	3.97 (1.11)	4.02 (0.76) *	2.95 (0.72)
Ομόζυγα διαγονιδιακά ως προς την Hsp70 (Tg/Tg) ποντίκια				
Δείκτες	Βασικές μετρήσεις (n=9)	Εβδομάδες μετά δοξορουβικίνης		
		4 (n=4)	6 (n=4)	10 (n=8)
Ηλικία (Μήνες)	6.2 (1.9)	8.3 (1.3)	9.4 (1.6) *	9.0 (1.7) *
Σωματικό βάρος (g)	27.0 (2.4) †	28.0 (2.4)	28.8 (2.8)	25.7 (2.8) †
Καρδιακός ρυθμός (παλμοί/λεπτό)	632 (72)	484 (71) *	578 (57)	511 (132) *
AWTd (mm)	1.04 (0.10)	1.08 (0.11)	1.09 (0.08)	1.03 (0.11) †
PWTd (mm)	1.16 (0.18)	1.21 (0.17)	1.25 (0.13)	1.27 (0.18)
LVDd (mm)	2.20 (0.33)	2.52 (0.49)	2.61 (0.27) * †	2.60 (0.44)
LVDs (mm)	0.63 (0.15)	1.05 (0.51) *	0.98 (0.23) * †	0.87 (0.26) * †
Κλασματική βράχυνση (%)	71.5 (4.8)	59.9 (11.5) *	62.5 (6.5) *	67.0 (9.5) †
Μάζα αριστερής κοιλίας (g)	81.1 (22.0)	100.1 (8.9)	109.3 (9.6) *	96.1 (21.5)
Μάζα αριστερής κοιλίας/σωματικό βάρος	3.0 (0.7)	3.5 (0.4)	3.9 (0.6) *	3.8 (1.0)
Αναλογία R/H	3.89 (0.65)	4.52 (1.73)	4.32 (0.79) †	2.80 (0.82) * †

Πίνακας 3.2. Υπερηχοκαρδιογραφικοί δείκτες σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια. Αγρίου τύπου (F1/F1) και διαγονιδιακά ως προς την υπερέκφραση της Hsp70 (Tg/Tg) ποντίκια μελετήθηκαν υπερηχοκαρδιογραφικά ως προς δείκτες της καρδιακής λειτουργίας και φυσιολογίας υπό φυσιολογικές συνθήκες ή μετά από 4, 6 ή 10 εβδομάδες ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης 3 mg/kg δοξορουβικίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι, με την τυπική τους απόκλιση σε παρένθεση και φανερώνουν την σαφώς βελτιωμένη κλινική εικόνα των διαγονιδιακών ποντικίων σε όλα τα χρονικά σημεία χορήγησης δοξορουβικίνης.

AWTd: τελοδιαστολική πάχυνση πρόσθιου καρδιακού τοιχώματος

PWTd: τελοδιαστολική πάχυνση οπίσθιου καρδιακού τοιχώματος

LVDd: τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας

LVDs: τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας

Αναλογία R/H: δείκτης δυσμενούς καρδιακής λειτουργίας (Ενότητα 2.29.6)

* P < 0.05 vs βασικές μετρήσεις μέσα σε κάθε ομάδα

† P < 0.05 vs μάρτυρες

Από τις υπερηχοκαρδιογραφικές αναλύσεις, παρατηρήσαμε ότι στα ποντίκια αγρίου τύπου (F1/F1) η χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης φαίνεται να προκάλεσε ορισμένες μεταβολές στην καρδιακή λειτουργία, που συνάδουν στην υπερηχογραφική εκδήλωση συστολικής καρδιακής ανεπάρκειας.

Συγκεκριμένα, μετά από χορήγηση 4 εβδομαδιαίων δόσεων δοξορουβικίνης, παρατηρήσαμε αύξηση της τελοσυστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 0.68 mm σε 0.93 mm (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) και έκπτωση της συστολικής λειτουργικότητας αυτής με ενδεικτική μείωση του δείκτη κλασματικής βράχυνσης (FS) από 71% σε 65% (Εικόνα 3.17D), με μικρού βαθμού μη στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων της (υπερτροφία – τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Μετά από μια ανάρρωση 2 εβδομάδων (6^η εβδομάδα του πρωτοκόλλου), παρατηρήθηκε αύξηση της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 2.5 mm σε 3.25 mm. Επίσης, η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας αυξήθηκε περαιτέρω σε σχέση με τη μέτρηση των 4 εβδομάδων από 0.68 mm σε 1.49 mm, με επακόλουθη αύξηση της μάζας αυτής (έκκεντρη υπερτροφία – αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) και περαιτέρω έκπτωση της συστολικής λειτουργικότητας αυτής, με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης να φτάνει το 54% (Εικόνα 3.17D).

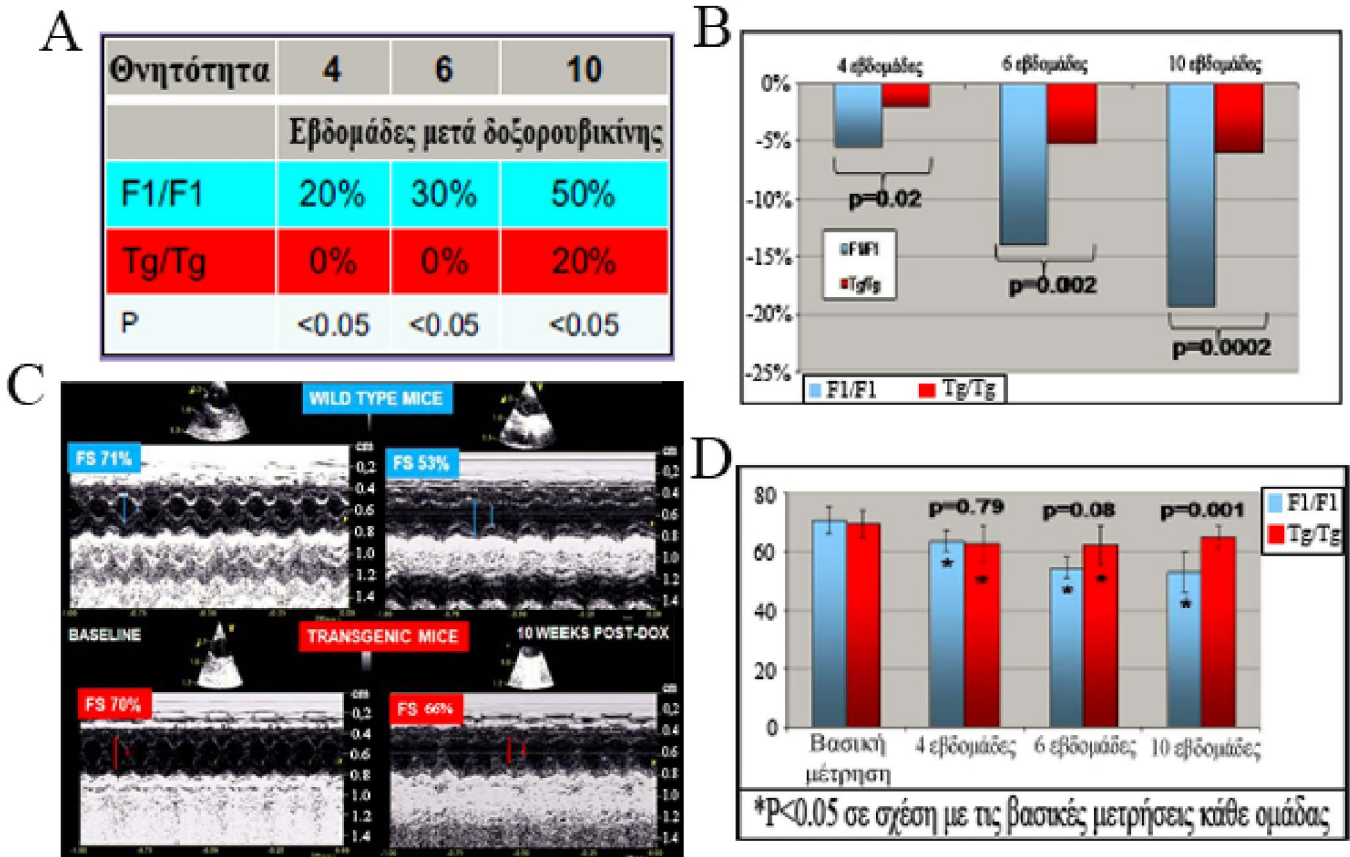
Μετά το πέρας του πρωτοκόλλου χορήγησης (10 εβδομάδες), η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας παρέμεινε αυξημένη σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις στα 1.2 mm (Εικόνα 3.17C), η συστολική της λειτουργικότητα παρέμεινε ελαττωμένη με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης στο 53% (Εικόνες 3.17C,D), ενώ παρατηρήθηκε λέπτυνση του πάχους των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας με επακόλουθη επαναφορά της μάζας της στα προ χορήγησης δοξορουβικίνης επίπεδα (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Μια άλλη σημαντική παρατήρηση αφορά στην ολοένα και αυξανόμενη μείωση του σωματικού βάρους των ζώων με την πάροδο του χρόνου, με κορύφωση στις 10 εβδομάδες, οπότε η μείωση αυτή αγγίζει το 18% περίπου του αρχικού σωματικού βάρους (Εικόνα 3.28B). Επιπλέον, η θνητότητα παρουσίασε αύξηση καθ'όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου, ξεκινώντας από 20% στις 4 δόσεις δοξορουβικίνης και καταλήγοντας σε ποσοστό 50% μετά το πέρας του πρωτοκόλλου (Εικόνα 3.28A).

Στην περίπτωση των διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν την Hsp70, η χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης φαίνεται να προκάλεσε τις παρακάτω μεταβολές, όπως αυτές αναλύθηκαν μετά από την υπερηχοκαρδιογραφική παρατήρηση: Στις 4 εβδομάδες, παρατηρήθηκε αύξηση της τελοσυστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 0.63 mm σε 1.05 mm (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) και έκπτωση της συστολικής λειτουργικότητας αυτής με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης από 70% να φτάνει το 63% (Εικόνα 3.17D). Επίσης, παρατηρήθηκε πολύ μικρή, μη στατιστικά σημαντική, υπερτροφία των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Μετά το στάδιο της ανάρρωσης των δύο εβδομάδων (6 εβδομάδες), παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 2.2 mm σε 2.61 mm, αλλά και της τελοσυστολικής της διαμέτρου από 0.63 mm σε 0.98 mm, με επακόλουθη αύξηση της μάζας της (έκκεντρη υπερτροφία – τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Αυτά τα φαινόμενα δε φαίνεται να επηρέασαν σημαντικά τη συστολική λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, καθώς ο δείκτης κλασματικής βράχυνσης παρέμεινε στο 62.5%, σε σχέση με τη μέτρηση των 4 εβδομάδων (Εικόνα 3.17D). Οι μεταβολές αυτές στα διαγονιδιακά ζώα, παρ'ότι ίσως πιο έντονες αριθμητικά, είναι μικρότερες σε απόλυτο και σχετικό βαθμό σε σχέση με τα ζώα των βασικών μετρήσεων.

Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου ενέσεων με δοξορουβικίνη στα διαγονιδιακά ζώα (10 εβδομάδες), η τελοσυστολική διάμετρος παρέμεινε αυξημένη (0.87 mm) σε σχέση με την αρχική προ παρέμβασης μέτρηση (Εικόνα 3.17C), η δε συστολική λειτουργικότητα φάνηκε να επανέρχεται λίγο, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά, με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης να φτάνει το 66% (Εικόνες 3.17C, D). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε μείωση του πάχους των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλιάς σε αντίθεση προς τα αγρίου τύπου ζώα (Εικόνα 3.17C).



Εικόνα 3.17. Κλινικά και υπερηχοκαρδιογραφικά αποτελέσματα σε ποντίκια μετά από χορήγηση 3 mg/kg DOX (πρωτόκολλο διαλείπουσας ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης 10 εβδομάδων).

A: Στις 4, 6, και 10 εβδομάδες χορήγησης δοξορουβικίνης, τα Tg/Tg ποντίκια έχουν μικρότερη θνητότητα από τα F1/F1 ($p < 0.05$ σε όλες τις εβδομάδες).

B: Με τη χορήγηση δοξορουβικίνης παρατηρείται μείωση του σωματικού βάρους (σταδιακά αυξανόμενη με την πάροδο του χρόνου), αλλά πολύ μικρότερη στα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 ποντίκια ($p < 0.05$ σε όλες τις εβδομάδες).

C: Υπερηχοκαρδιογραφικές εικόνες πριν και μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλιάς αυξάνεται και ο δείκτης κλασματικής βράχυνσης μειώνεται με τη χορήγηση δοξορουβικίνης, υποδηλώνοντας έκπτωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλιάς. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στα Tg/Tg ποντίκια είναι μικρότερες.

D: Η έκπτωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλιάς επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου με τη χορήγηση δοξορουβικίνης στα F1/F1 ποντίκια και είναι μικρότερη στα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 ποντίκια ($p = 0.08$ και $p = 0.001$ στις 6 και 10 εβδομάδες αντίστοιχα).

Στα διαγονιδιακά ζώα, η μείωση του σωματικού βάρους υπήρξε μη στατιστικά σημαντική σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις και μικρότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα, αγγίζοντας μόλις το 6% περίπου στις 10 εβδομάδες (Εικόνα 3.17B). Η

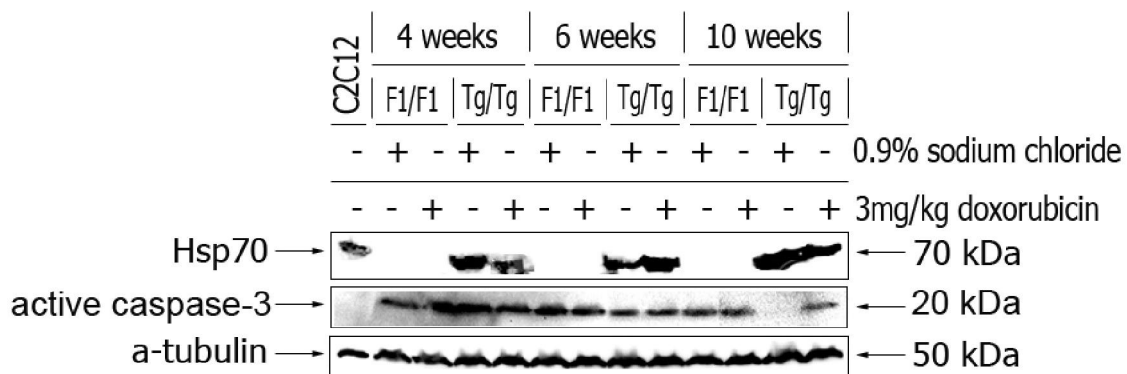
θνητότητα ήταν επίσης σημαντικά μικρότερη στα διαγονιδιακά ζώα, με μηδενικά ποσοστά στα δύο πρώτα χρονικά σημεία και με ποσοστό 20% μετά το πέρας του πρωτοκόλλου χορήγησης (Εικόνα 3.17Α).

Συνολικά, σε όλα τα χρονικά σημεία που μελετήσαμε, τα διαγονιδιακά ζώα παρουσιάζουν καλύτερη εικόνα, τόσο κλινική (θνητότητα, σωματικό βάρος), όσο και υπερηχοκαρδιογραφική, σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα. Φαίνεται ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια μπαίνουν σε μια ηπιότερη καρδιακή ανεπάρκεια στις 4 και 6 εβδομάδες, η οποία φαίνεται να βελτιώνεται στις 10 εβδομάδες, κάτι που σχετίζεται προφανώς με την υπερέκφραση της Hsp70 στα ζώα αυτά.

3.14. Η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, ελέγχοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-3

Έχοντας επιβεβαιώσει πλέον στο σύστημά μας την εδραίωση της καρδιακής ανεπάρκειας λόγω χορήγησης δοξορουβικίνης, αλλά και τον προστατευτικό ρόλο που προσδίδει η Hsp70 κλινικά και υπερηχογραφικά, θελήσαμε αφενός να επιβεβαιώσουμε την προστασία της Hsp70 στα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, αφετέρου να μελετήσουμε βιοχημικά το μονοπάτι μέσω του οποίου ασκείται η προστασία της Hsp70 από την επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια στον καρδιακό ιστό.

Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε ο καρδιακός ιστός (ενότητα 2.29.7) από αγρίου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια πριν από τη χορήγηση δοξορουβικίνης, αλλά και σε χρονικά διαστήματα 4,6 και 10 εβδομάδων μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης και λήφθηκε το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (ενότητα 2.4).



Εικόνα 3.18. Η Hsp70 ελέγχει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε κύτταρα μυοκαρδίου μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιακό ιστό ποντικών αγρίου τύπου και διαγονιδιακών ποντικών πριν και μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης και 0.9% NaCl (διαλύτης της δοξορουβικίνης) σε χρονικά διαστήματα 4,6 και 10 εβδομάδων. Τα εκχυλίσματα ελέγχθησαν μέσω ανοσοαποτύπωσης ως προς την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 με μάρτυρα ισοφόρτωσης ειδικό για την α-τουμπουλίνη αντίσωμα. Ελέγχθηκε επίσης με ειδικό αντίσωμα και η έκφραση της Hsp70 προς επιβεβαίωση της υπερέκφρασης στα Tg/Tg ποντίκια. Παρατηρήσαμε μειωμένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στα διαγονιδιακά ζώα, σε όλες τις περιπτώσεις.

Γνωρίζουμε βιβλιογραφικά ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών (Kotamraju et al., 2000; Casares et al., 2005; Liu et al., 2008). Για το λόγο αυτό, θελήσαμε αρχικά να μελετήσουμε εάν η παρουσία της

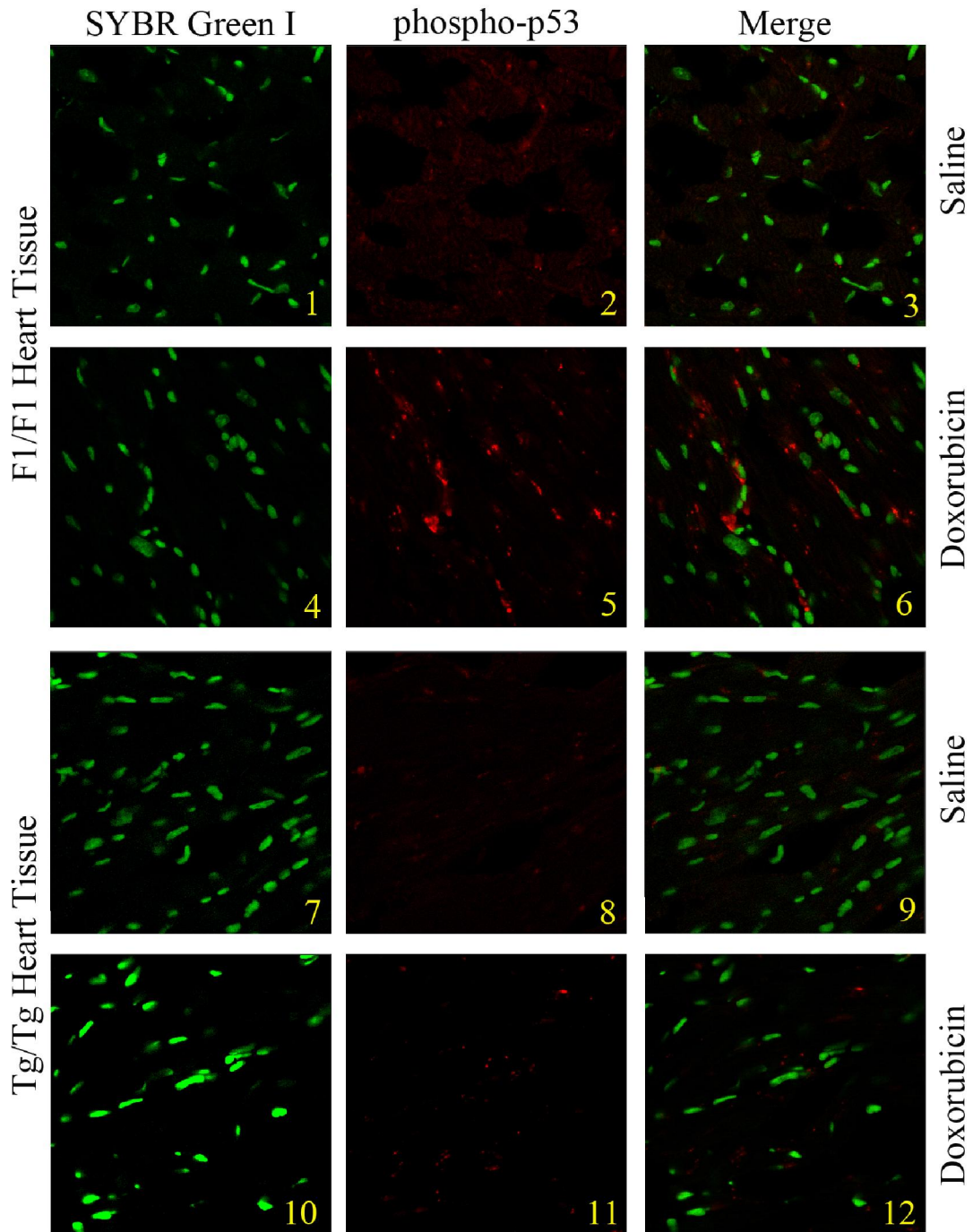
Hsp70 ελέγχει με κάποιο τρόπο την ενεργοποίηση του καταρράκτη. Χρησιμοποιώντας τα εκχυλίσματα από τον καρδιακό ιστό, ελέγξαμε μέσω ανοσοαποτύπωσης την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 μετά από χρόνια διαλείπουσα ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δοξορουβικίνης, παρατηρώντας ότι στα διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν την Hsp70, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι κατά πολύ μικρότερη στις 6 και 10 εβδομάδες, σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα (Εικόνα 3.29). Η παρατήρηση αυτή μας υποδεικνύει ότι ίσως η Hsp70 να ελέγχει την αποπτωτικότητα των κυττάρων του μυοκαρδίου στα τελικά στάδια της απόπτωσης αποτρέποντας την ενεργοποίηση των τελεστικών κασπασών, όπως η κασπάση-3.

Ακολούθως, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν η Hsp70 ελέγχει και κάποιο άλλο στάδιο του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μηχανισμού, ή ακόμη και την απόπτωση μέσω άλλου μηχανισμού. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοαποτύπωση ένας μεγάλος αριθμός αντισωμάτων, (Bcl-2, BAX, PARP-1, cleaved caspase-9, AIF, caspase-8 και phospho-p53).

3.15. Η Hsp70 αποτρέπει την απόπτωση των κυττάρων του μυοκαρδίου ελέγχοντας τη φωσφορυλίωση της p53

Μια απρόσμενη παρατήρηση σε εμβρυικούς ινοβλάστες από τα ποντίκια που χρησιμοποιούμε, μας οδήγησε να μελετήσουμε και την επίδραση της Hsp70 στα αρχικά στάδια του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού και μαλιστα, στο αρχικό στάδιο ενεργοποίησης στον καρδιακό ιστό. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε μια υστέρηση στην ενεργοποίηση της p53 μέσω φωσφορυλίωσης αυτής στα διαγονιδιακά ποντίκια σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (Zerikiotis et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η σημαντική αυτή παρατήρηση μας έδωσε το έναυσμα να μελετήσουμε εάν θα παρατηρήσουμε ανάλογα αποτελέσματα στα ολικά εκχυλίσματα που είχαμε λάβει από τους ιστούς. Αυτό δεν κατέστη δυνατό μετά από ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα για την φωσφορυλιωμένη μορφή της p53.

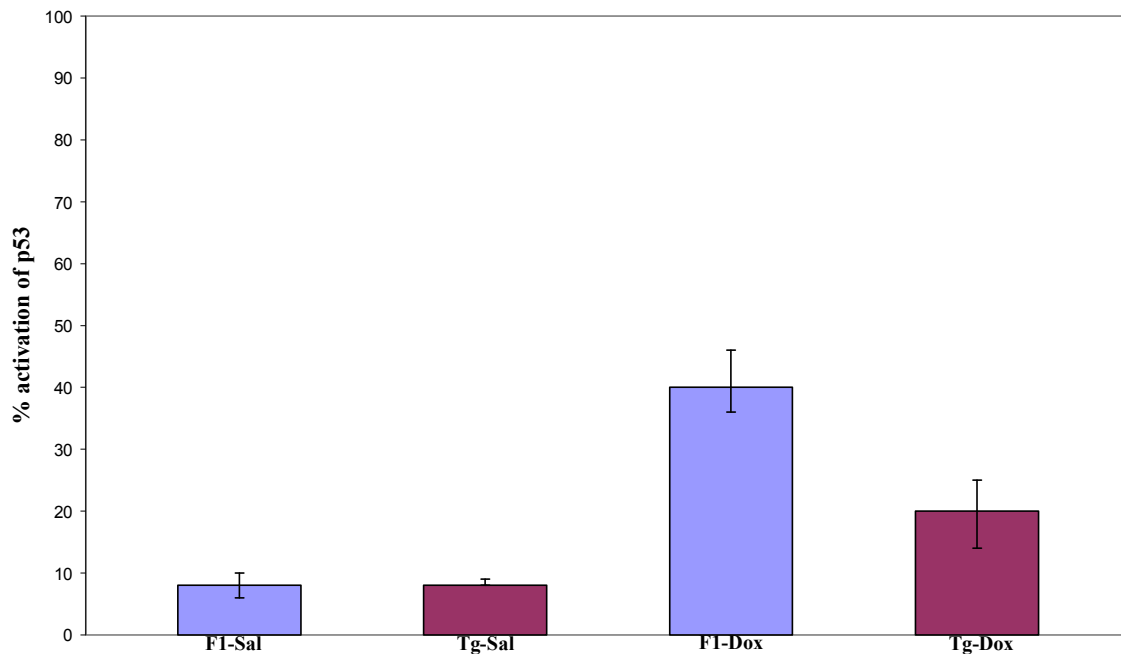
Εφόσον τα αρχικά αποτελέσματα που είχαμε παρατηρήσει σε σχέση με την ενεργοποίηση της p53 ήταν σε κύτταρα, προσπαθήσαμε να απομονώσουμε κύτταρα μυοκαρδίου, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.31. Όμως, ενώ είχαμε ένα ικανοποιητικό αριθμό καρδιομυοκυττάρων από τις καρδιές των διαγονιδιακών ζώων, η προσπάθεια δεν είχε ανάλογη επιτυχία και στην περίπτωση των αγρίου τύπου ζώων. Για το λόγο αυτό, καταφύγαμε και πάλι στους ιστούς, όπου και πραγματοποιήσαμε τομές (Ενότητα 2.30), προκειμένου να ελέγξουμε την ενεργοποίηση της p53 μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού απευθείας στον ιστό (ενότητα 2.16). Αυτή τη φορά, το αποτέλεσμα ήταν επιτυχές. Συγκεκριμένα, οι απομονωμένοι ιστοί υποβλήθηκαν σε κρυοτομές των 5 μm με τη μέθοδο που περιγράφηκε στις ενότητες 2.29.7 και 2.30, μονιμοποιήθηκαν σε 4% w/v διάλυμα παραφορμαλδεΰδης σε TBS, υποβλήθηκαν σε διπλό ανοσοφθορισμό με ειδικό για τη φωσφορυλιωμένη p53 αντίσωμα και χρώση του πυρήνα με SYBR Green I και φωτογραφήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνες 3.19, 3.21A).



Εικόνα 3.19. Η Hsp70 μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση της p53 μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο μετά από χρώση σε κρυστομές 5 μm με αντίσωμα ειδικό για την phospho-p53 (κόκκινη χρώση – ένθετα 2,5,8,11) και SYBR Green I (πράσινη χρώση του πυρήνα – ένθετα 1,4,7,10). Παρατηρήσαμε ότι η ενεργοποίηση της p53 είναι πολύ πιο έντονη στα αγρίου τύπου F1/F1 ποντίκια μετά από τη χορήγηση 3 mg/kg δοξορουβικίνης για 10 εβδομάδες (8 δόσεις, από 1 ανά εβδομάδα με παύση για 2 εβδομάδες μετά την τέταρτη δόση) (ένθετα 5,6), σε σχέση με την αντίστοιχη ενεργοποίηση στα διαγονιδιακά ζώα (ένθετα 11,12). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν την εμπλοκή της Hsp70 στην ενεργοποίηση της p53.

Παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση των αγρίου τύπου ζώων έχουμε έντονη ενεργοποίηση της p53 (Εικόνα 3.19, ένθετα 5,6 - εικόνα 3.21A) μετά από το πέρας του πρωτοκόλλου χορήγησης δοξορουβικίνης των 10 εβδομάδων, που εντοπίζεται σε εστίες εκτός του πυρήνα και εντός του κυτταροπλάσματος, ίσως στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, όπου ενεργοποιείται το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Αντίθετα, στην περίπτωση των διαγονιδιακών ζώων, δεν παρατηρείται τόσο έντονη φωσφορυλίωση της p53 μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.19, ένθετα 11,12 – εικόνα 3.21A), γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή της Hsp70 στη φωσφορυλίωση της p53. Γνωρίζοντας ότι η φωσφορυλίωση της p53 αποτελεί αποπτωτικό σήμα (Bates and Vousden, 1996), η αποτροπή της φωσφορυλίωσης της p53 από την Hsp70, αποτρέπει τελικά τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων του μυοκαρδίου.

Ο ανοσοφθορισμός επαναλήφθηκε προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αφενός μεν τις παρατηρήσεις μας και αφετέρου να στηρίξουμε τις παρατηρήσεις αυτές αναλύοντας στατιστικά τις φωτογραφίες από τις τομές. Για το σκοπό αυτό, καταμετρήθηκαν οι εστίες και ο αριθμός των κυττάρων από 5 διαφορετικά πειράματα και υπολογίστηκε το ποσοστό ενεργοποίησης της p53 ως ο μέσος όρος του λόγου των εστιών προς τον αριθμό των κυττάρων σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα φαίνονται με τη μορφή ιστογράμματος (Εικόνες 3.20, 3.21B).

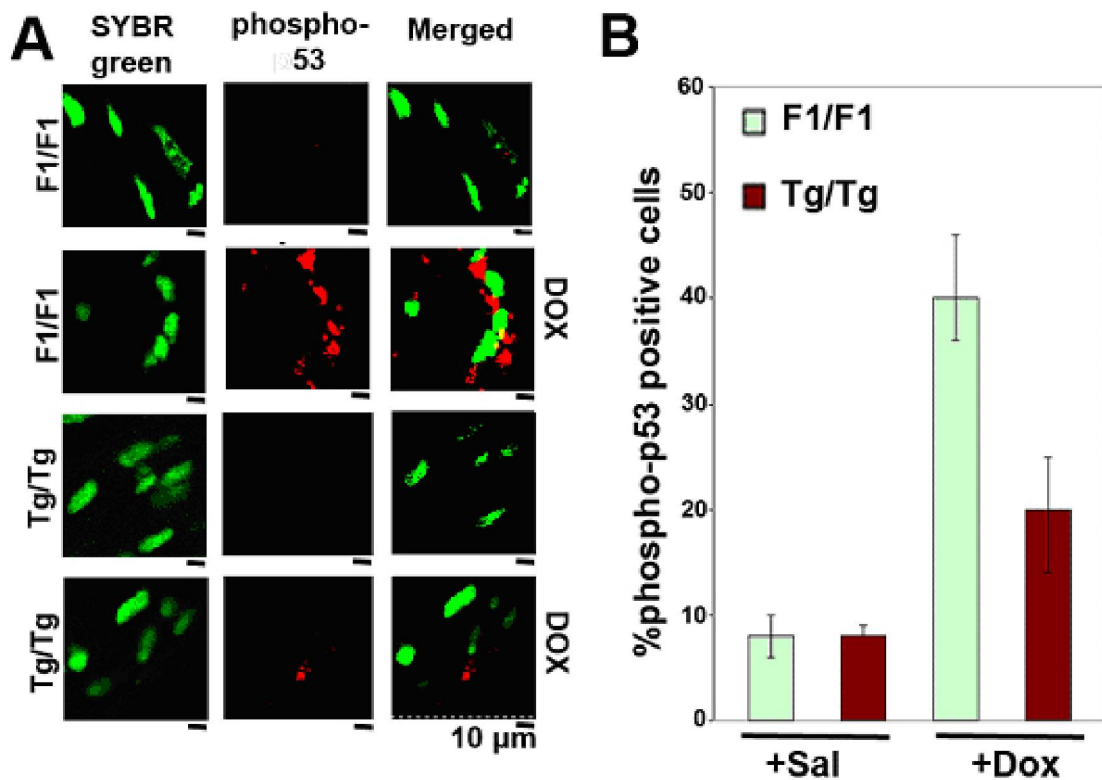


Εικόνα 3.20. Ενεργοποίηση της p53 σε ποντίκια μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. Στατιστική ανάλυση 5 διαφορετικών πειραμάτων ανοσοφθορισμών σε καρδιακές τομές από αγρίου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια ως προς την έκφραση της Hsp70, πριν και μετά το πέρας ενός πρωτοκόλλου ενδοπεριτοναϊκής διαλείπουσας χορήγησης δοξορουβικίνης 10 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αποτελούν το μέσο όρο του λόγου των μετρήσεων των εστιών της φωσφορυλιωμένης p53 προς τον αριθμό των κυττάρων από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

Οι μετρήσεις από την ανάλυση που αναφέρθηκε παραπάνω, επιβεβαίωσαν τις αρχικές μας παρατηρήσεις σχετικά με την εμπλοκή της Hsp70 στον έλεγχο ενεργοποίησης της p53, καθώς στις τομές που προήλθαν από τα αγρίου τύπου ζώα,

σχεδόν το 50% των καρδιομυοκυττάρων παρουσιάζουν ενεργοποίηση της p53, σε αντίθεση προς το 25% των κυττάρων περίπου στα διαγονιδιακά ζώα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ενεργοποίηση της p53 αποτελεί την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας, είναι εύλογο να υποθέσουμε τελικά ότι η Hsp70 προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα από την επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη απόπτωση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με παράλληλες μελέτες που αφορούν εμβρυικά κύτταρα ινοβλαστών (Zerikiotis et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και προέρχονται από τα ίδια ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες μας. Η μελέτη των κυττάρων αναλύει όλο το αποπτωτικό μονοπάτι και υποδεικνύει ότι το αποπτωτικό μονοπάτι με την δοξορουβικίνη διέρχεται μέσω p53, BAX, κασπάση-9 και κασπάση-3

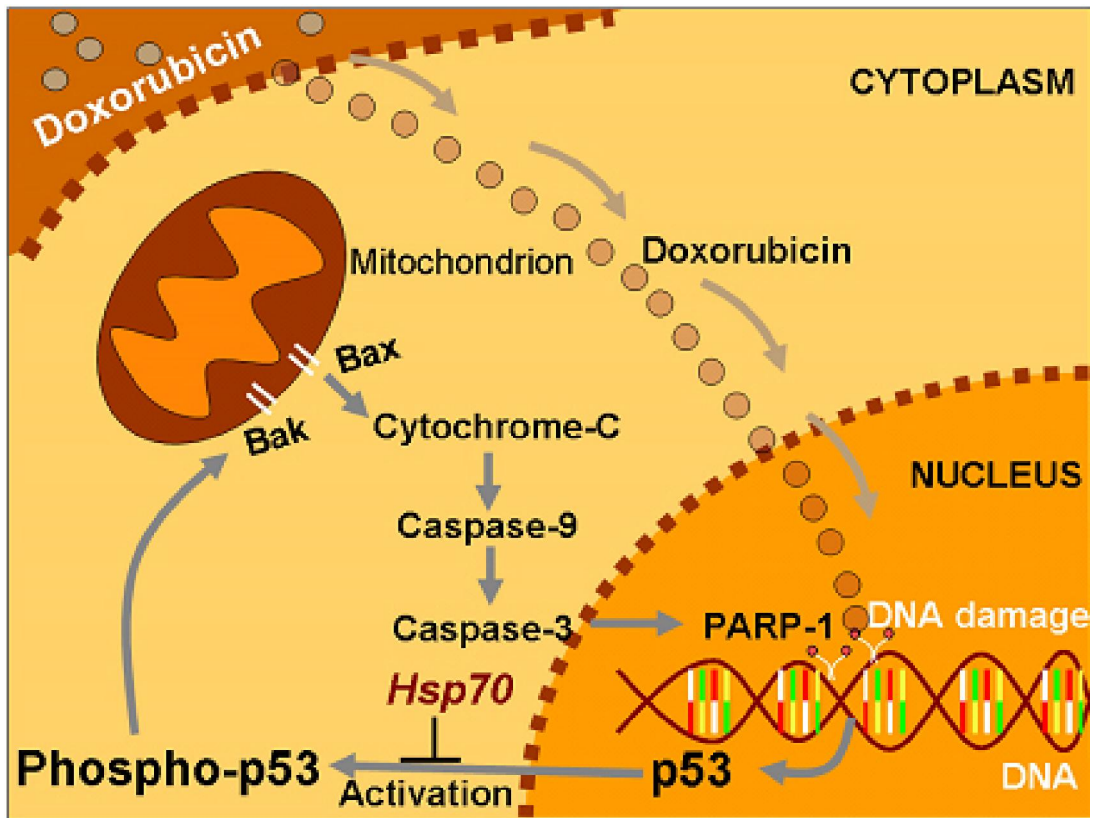


Εικόνα 3.21. Ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της p53 σε καρδιομυικό ιστό ποντικών μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης.

A) Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν για ανοσοφθορισμό με αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη p53, ακολουθούμενο από χρώση με Alexa Fluor 568 και τη χρωστική SYBR Green I.

B) Η ποσοστιαία ενεργοποίηση της p53 ταυτοποιήθηκε μέσω μέτρησης των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι 5 μετρήσεων με την τυπική τους απόκλιση.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, μπορούμε να καταλήξουμε στο ακόλουθο προκαταρκτικό μοντέλο σχετικά με τη δράση της Hsp70 στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων λόγω καρδιακής ανεπάρκειας (Εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.22. Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του προστατευτικού ρόλου της Hsp70 σε κύτταρα μυοκαρδίου μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. Η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω οξειδωτικού στρες. Λόγω του στρες αυτού, η p53 φωσφορυλιώνεται και εξέρχεται του πυρήνα σηματοδοτώντας την έναρξη του μιτοχondριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Ακολούθως, ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών και τα κύτταρα αποπίπτουν. Η παρουσία της Hsp70 δρα στο μονοπάτι αυτό επηρεάζοντας τη φωσφορυλίωση της p53, αποτρέποντας τελικά τα κύτταρα από την απόπτωση.

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα και προσκολλάται στο DNA, το οποίο και καταστρέφει μέσω οξειδωτικού στρες. Στο στάδιο αυτό, εξαιτίας του στρες φωσφορυλιώνεται και σταθεροποιείται η p53, η οποία δεν μπορεί πλέον να ουβικιτινυλιωθεί από την MDM2, η οποία προάγει την έξοδο της p53 από τον πυρήνα. Με τη σειρά της η p53 ενεργοποιεί τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 προκαλώντας την οξειδωτική καταστροφή του μιτοχondριακού DNA, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλα, ενεργοποιείται και η κασπάση-9, η οποία λειτουργεί ως υπόστρωμα για την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η οποία επίσης ωθεί το κύτταρο προς απόπτωση.

Η παρουσία της Hsp70, βάσει των παρατηρήσεών μας, επιδρά σε αρχικό στάδιο του μιτοχondριακού αποπτωτικού μηχανισμού εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση της p53 και αποτρέποντας την έξοδό της από τον πυρήνα, οπότε αυτή δρα φυσιολογικά ως σήμα έναρξης της μεταγραφής. Με τον τρόπο αυτό, το κύτταρο δεν ωθείται προς την απόπτωση.

Το σημείο ακριβώς της δράσης της Hsp70 στο στάδιο αυτό, μένει ακόμη να ταυτοποιηθεί.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτεΐνη Hsp70 συνιστά ένα πολύ δημοφιλές μέλος της οικογένειας των μοριακών συνοδών, ενώ ταυτόχρονα είναι η πιο σημαντική πρωτεΐνη θερμικού σοκ η οποία επάγεται στα κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε πολλά διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, φυσικά ή χημικά. Επί σειρά ετών δεν ήταν γνωστός στην επιστημονική κοινότητα ο λόγος για τον οποίο η Hsp70 επάγεται στα κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε στρες, μετατοπίζεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα και ιδιαίτερα στους πυρηνίσκους. Πριν από δέκα σχεδόν χρόνια, είχε διατυπωθεί η αντίληψη ότι η Hsp70 συσσωρεύεται στους πυρηνίσκους συμπαρασύροντας μαζί της τα μετουσιωμένα υποστρώματα προκειμένου να βοηθήσει στην επιδιόρθωσή τους (Nollen et al., 2001). Με βάση αυτή την αντίληψη, ο πυρηνίσκος δεν ήταν τίποτα παραπάνω από ένα προσωρινό αποθηκευτικό χώρο που θα χρησίμευε μεταγενέστερα για την επιδιόρθωση των πρωτεϊνών, μια θέση αρκετά πειστική. Όμως τα αποτελέσματα της ομάδας μας που δημοσιεύτηκαν το 2009 (Kotogolou et al., 2009), προσέδωσαν νέες λειτουργίες στην Hsp70 στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο.

Αρχικά επιβεβαιώθηκε ότι κύτταρα HeLa στα οποία είχε αποσιωπηθεί η Hsp70 μέσω siRNA τεχνολογίας, αποκτούσαν αυξημένη θερμοευαισθησία και αποπτωτικότητα.

Στη συνέχεια έγινε μια προσπάθεια προσέγγισης του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου από στρες. Για πολλά χρόνια το αποπτωτικό μονοπάτι του θερμικού στρες ήταν άγνωστο. Παλαιότερες έρευνες είχαν υποδείξει ότι η θερμότητα ενεργεί μέσω σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίες προκαλούν βλάβες στο DNA (Bruskov et al., 2002). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, προσπαθήσαμε να βρούμε εάν η Hsp70 συσχετίζεται με τις DNA βλάβες, με την επιδιόρθωσή τους και τους πιθανούς συνεργάτες της που εμπλέκονται σε συστήματα επιδιόρθωσης του DNA στις περιοχές όπου μετατοπίζεται μετά από θερμικό σοκ, όπως οι πυρηνίσκοι. Σημειωτέον είναι ότι οι ίδιες αυτές περιοχές αποτελούν και τους στόχους των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), οι οποίες στοχεύουν το νουκλεοπλασματικό ή το ριβοσωμικό DNA.

Για την επίτευξη των στόχων αυτών τροποποιήθηκε η τεχνική ανίχνευσης κομητών προκειμένου να ανιχνεύθουν θραύσεις DNA σε καθαρούς πυρηνίσκους. Στη συνέχεια μελετήθηκε η προστασία που παρέχει η Hsp70 μετά από θερμικό σοκ στην ακεραιότητα του ριβοσωμικού DNA, που αποτελεί το βασικό συστατικό των πυρηνίσκων. Η τροποποιημένη αυτή τεχνική ανίχνευσης κομητών σε πυρηνίσκους (Nucleolar Comet Assay – NCA), αποτελεί μια νέα ισχυρή τεχνική μελέτης της πυρηνικής απόπτωσης μέσω ανίχνευσης σημειακών θραύσεων του DNA σε απομονωμένους πυρηνίσκους που έχουν υποστεί θερμικό σοκ. Όπως απεδείχθη με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής, η απουσία της Hsp70 είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των σχάσεων μονής αλυσίδας στο DNA κατά τρόπο ανάλογο του αποπτωτικού ερεθίσματος. Η παρατήρηση που συνάδει με όμοιες παρατηρήσεις που έγιναν σε πυρήνες (Doulidas et al., 2007). Έτσι, φανερώθηκε πλέον η σχέση της Hsp70 με τις βλάβες στο DNA και με την πυρηνική-πυρηνισκική απόπτωση. Για περαιτέρω επιβεβαίωση μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών με ανοσοκαθιζήσεις και χρησιμοποιήθηκε η συνεστιακή μικροσκοπία για παρατήρηση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων. Αρχικά, διαπιστώθηκε ο συνεντοπισμός της Hsp70 με την PARP-1 και την XRCC1. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών διερευνήθηκαν περαιτέρω σε δημοσίευση που έγινε (Kotoglou et al., 2009), όπου με δοκιμασίες ανοσοκατακρύμνισης (IP) και συγκατακρύμνισης (pull-down), χρησιμοποιώντας

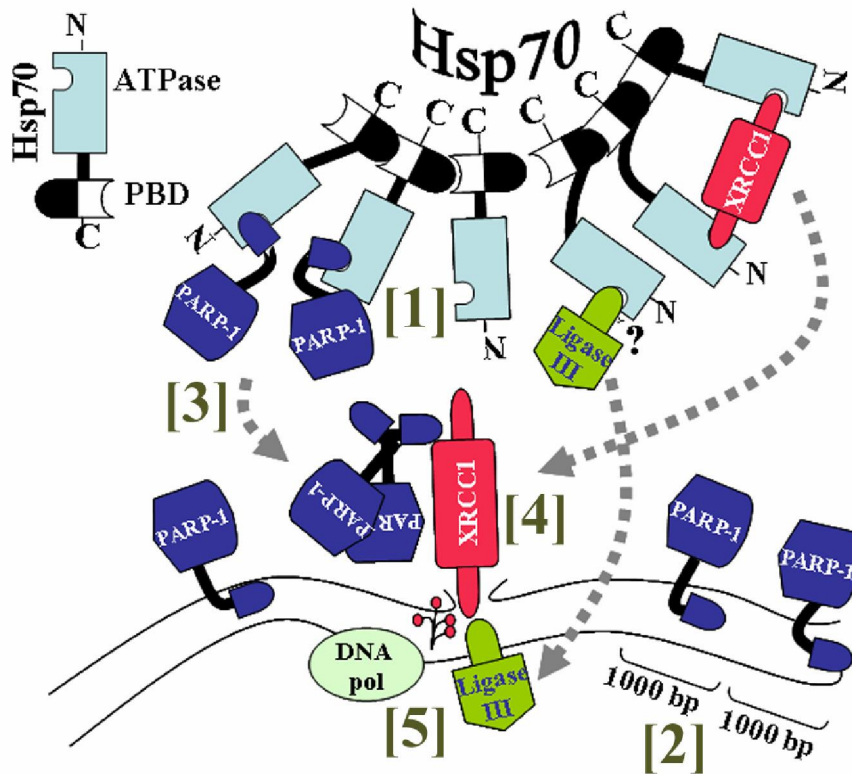
καθαρές GST-πρωτεΐνες, ή κυτταρικά εκχυλίσματα, έγινε φανερή η σύνδεση της Hsp70 με την PARP-1 στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε η σύνδεση της PARP-1 με την Hsp70 μέσω των περιοχών BRCT και ATPάσης αντίστοιχα (Kotoglou et al., 2009), αλλά και η σύνδεση της Hsp70 με την XRCC1 και τελικά η σύνδεση και των τριών πρωτεϊνών μαζί. Τα παραπάνω πειράματα παρέχουν τα πρώτα βιοχημικά στοιχεία ότι η Hsp70 διαδραματίζει ένα προστατευτικό ρόλο κατά των σημειακών θραύσεων που νουκλεοπλασματικού και πυρηνισκικού DNA που υφίσταται θερμικό σοκ με την εμπλοκή της στα αποπτωτικά μονοπάτια αυτά.

Δεδομένου ότι η Hsp70 αποτελεί βασικότατο μόριο ρύθμισης της ποιότητας των πρωτεϊνών, η παρούσα εργασία προτείνει έναν επιπλέον ρόλο της Hsp70. Αυτόν της προστασίας από σημειακές θραύσεις του DNA. Οι δύο αυτοί ρόλοι καθιστούν την Hsp70 ως μια πολύ σημαντική συνοδό πρωτεΐνη που κατέχει μια βασική θέση στην προστασία και την ποιοτική ρύθμιση των μεγάλων βιομορίων (DNA, πρωτεΐνες).

Με την εργασία αυτή, αποδεικνύεται για πρώτη φορά ο πιθανός ρόλος της Hsp70 στο πυρηνόπλασμα και τους πυρηνίσκους, προτείνοντας την προστασία των υποκυτταρικών αυτών διαμερισμάτων από τις θραύσεις μονής έλικας του DNA. Είναι ίσως και η πρώτη φορά που αποδεικνύεται ότι κάποια συνοδός πρωτεΐνη εμπλέκεται λειτουργικά σε τόσο διαφορετικά υποστρώματα. Ολοκληρώνοντας, θα μπορούσαμε να προτείνουμε ένα μοντέλο επιδιόρθωσης των σημειακών θραύσεων του DNA στο οποίο θα περιλαμβάνεται και ένα επιπλέον βασικό μόριο, η Hsp70. Σύμφωνα με τα παρόντα αλλά και παλαιότερα στοιχεία, η Hsp70 σε μονομερή ή ολιγομερή κατάσταση επιστρατεύει στην περιοχή των σημειακών θραύσεων του DNA όλα τα μόρια εκείνα που συμμετέχουν στα επιδιορθωτικά μονοπάτια, ιδίως αυτά που φέρουν BRCT δομές (Εικόνα 4.1).

Σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνουμε, η PARP-1 διμερίζεται, πιθανά με τη βοήθεια της Hsp70 και ξεκινά την πολυ-ADP-ριβοζυλίωση στον εαυτό της και σε ιστόνες αλλά και μη ιστόνες, στο σημείο όπου υπάρχει κάποια θραύση. Η πολυ-ADP-ριβοζυλίωση έχει ως αποτέλεσμα τη χαλάρωση του DNA στην περιοχή αυτή, λόγω απώθησης των ιστονών και μη ιστονών. Η XRCC1 στη συνέχεια, κρατά τα άκρα στο σημείο της θραύσης σε μια σταθερή κατάσταση, προκειμένου να μην αποδιαταχθεί πλήρως το DNA, μέχρι να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του επιδιορθωτικού συμπλόκου, το οποίο θα αναλάβει και την επιδιόρθωση. Η Hsp70 ίσως να αποτελεί ένα υπόστρωμα το οποίο επιταχύνει την οργάνωση και τη μετακίνηση των επιδιορθωτικών μορίων του DNA στις σημειακές θραύσεις, όπου και δημιουργούνται οι επιδιορθωτικές μηχανές (Εικόνα 4.1).

Έχοντας εξακριβώσει την εμπλοκή της Hsp70 στο μηχανισμό επιδιόρθωσης σημειακών σχάσεων του DNA και παρατηρώντας τη μετατόπισή της στους πυρηνίσκους, η συνεργασία μας με το Δρ. Δαμαλά Αλέξανδρο μας επεσήμανε την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης, της p14^{ARF}. Η πρωτεΐνη αυτή, είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία εδράζεται στους πυρηνίσκους τόσο υπο φυσιολογικές, όσο και υπό στρες συνθήκες και σχετίζεται με την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Η συσχέτισή της αυτή με την απόπτωση, αλλά και η παρουσία της εντός των πυρηνίσκων, μας γέννησε το εύλογο ερώτημα μήπως υπάρχει συνεργασία των πρωτεϊνών Hsp70 και p14^{ARF}, αφενώς λόγω της συσχέτισης και των δύο με αποπτωτικά μονοπάτια και αφετέρου και κυριότερο, η συνύπαρξή τους εντός των πυρηνίσκων μετά από στρες, δεδομένου ότι η Hsp70 μετατοπίζεται σε αυτό το υποκυτταρικό διαμέρισμα μετά από στρες.



Εικόνα 4.1. Υποθετικό μοντέλο της λειτουργίας της Hsp70 στην απόκριση σε σημειακές βλάβες στο DNA στο πυρηνόπλασμα και τους πυρηνίσκους. Η Hsp70 διευκολύνει τη δράση του επιδιορθωτικού μηχανισμού των σημειακών θραύσεων στο DNA με τη συγκέντρωση των μορίων του στη θέση της βλάβης και την επιτάχυνση της λειτουργίας τους. [1] Η Hsp70 (μονομερής ή ολιγομερής) καθοδηγεί τα επιδιορθωτικά μόρια στο άκρο της σημειακής θραύσης. [2] Ένα μόριο PARP-1 βρίσκεται ανά 1.000 bp του DNA. [3] Η PARP-1 διμερίζεται, υποβοηθούμενη πιθανά από την αναδιπλωτική ικανότητα της Hsp70 και καταλύει αντιδράσεις πολυ-ADP-ριβοζυλίωσης. [4] Η XRCC1 δεσμεύεται στα άκρα της σημειακής θραύσης του DNA και τα κρατά σε μια θέση κατάλληλη για την επιδιόρθωση. [5] Η DNA λιγάση III και η DNA πολυμεράση β ολοκληρώνουν την επιδιόρθωση της βλάβης, τοποθετώντας τις κατάλληλες βάσεις που απουσιάζουν στη θέση τους και συνδέοντας μεταξύ τους τις συμπληρωματικές αλυσίδες.

Η p14^{ARF} όπως αναφέραμε είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη (Kamijo et al., 1997; Sharpless et al., 2001) της οποίας η δράση έγκειται στον εντοπισμό ογκογονικών ερεθισμάτων και την ενεργοποίηση της p53 (Ozenne et al., 2010). Η p14^{ARF} δε φαίνεται να παίζει κάποιο άμεσο ρόλο στην απόκριση σε βλάβες στο DNA. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που της προσδίδουν ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική απόπτωση λόγω βλαβών στο DNA. Η απόπτωση αυτή που ελέγχεται από παράγοντες όπως η p53 (de Stanchina et al., 1998; Ozenne et al., 2010). Επιπλέον, η p14^{ARF} έχει προταθεί ότι εμπλέκεται σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, όπως ο μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής νουκλεοτιδίων (NER). Και στην περίπτωση αυτή δεν εμπλέκεται η p53 (Dominguez-Brauer et al., 2009). Έτσι, η p14^{ARF} φαίνεται να έχει έναν ενεργό ρόλο στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας μέσω της διέγερσης διάφορων μονοπατιών (Ozenne et al., 2010).

Επιπλέον, παρ' όλο που υπάρχουν αναφορές ότι η έκφραση της p14^{ARF} επάγεται από ιικές μολύνσεις (García et al., 2006), δεν φαίνεται να αυξάνεται η έκφρασή της μετά από διάφορους τύπους στρες (Sherr, 2006), ενώ υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες

σχετικά με την απόκρισή της σε οξειδωτικό (Menéndez et al., 2003) και θερμικό στρες. Ερωτήματα που τέθηκαν είναι πώς το οξειδωτικό και το θερμικό στρες επηρεάζει την έκφραση της p14^{ARF}; Επηρεάζει η p14^{ARF} την απόπτωση μετά από αυτές τις μορφές στρες και με ποιο τρόπο; Για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα, προχωρήσαμε στην αποσιώπηση της p14^{ARF} μέσω τεχνολογίας “short-hairpin RNA” σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ή στην υπερέκφραση αυτής με χρήση επαγωγέα IPTG. Τα αποτελέσματα τόσο από τις πραγματοποιηθείσες ανοσοαποτυπώσεις, όσο και από την κυτταρομετρία ροής, μας έδειξαν ότι αφενός η p14^{ARF} δεν είναι στρεσοεπαγόμενη, αφετέρου η επαγόμενη μέσω θερμικού ή οξειδωτικού στρες απόπτωση ρυθμίζεται από την p14^{ARF} και μάλιστα, η ποσότητά της στα κύτταρα σχετίζεται άμεσα με τα ποσοστά απόπτωσης μετά από στρες. Παράλληλα, ενισχύσαμε παλαιότερες παρατηρήσεις που υποστήριζαν ότι η p14^{ARF} ενεργοποιεί αποπτωτικά μονοπάτια που είναι ανεξάρτητα της p53 (Eymin et al., 2006; Dominguez-Brauer et al., 2009), καθώς τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε έχουν είτε μη λειτουργική p53, είτε δεν την εκφράζουν καθόλου.

Οι παρατηρήσεις αυτές σχετικά με τον προστατευτικό ρόλο της p14^{ARF} στο οξειδωτικό και θερμικό στρες, μας οδήγησαν στην απορία μήπως η προστασία αυτή μετά από στρες προέρχεται από την αυξορρύθμιση κάποιας πρωτεΐνης η οποία ενεργοποιεί την p14^{ARF} και απουσία της τελευταίας μπορεί να δράσει ως παράγοντας επιβίωσης; Πράγματι, καταφεύγοντας σε μελέτες ανοσοαποτύπωσης, αποδείχθηκε ότι μετά από θερμικό και οξειδωτικό στρες παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης, μιας πρωτεΐνης που υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων (Kotsinas et al., 2002), όπως και τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε στις μελέτες μας, ενώ η μεταγραφική ενεργότητα που παρουσιάζει μπορεί να δράσει και ως επαγωγέας της p14^{ARF} (Saegusa et al., 2006). Αξιοσημείωτο είναι ότι η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης συνοδεύεται και από έντονη ικανότητα μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *CTNNB1* της β-κατενίνης, όπως φανερώθηκε από μελέτες ενεργότητας λουσιφεράσης.

Επακόλουθο ερώτημα που προέκυψε από τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν τί θα συνέβαινε στην περίπτωση απουσίας τόσο της p14^{ARF}, όσο και του ενεργοποιητή της έκφρασής της β-κατενίνης; Για το λόγο αυτό, έγινε η αποσιώπηση της β-κατενίνης μέσω siRNA τεχνολογίας και ελέγχθηκε η αποπτωτικότητα των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής και αντιπαραβολή με τις παρατηρήσεις από τις δοκιμασίες λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν μια αναστροφή του αντι-αποπτωτικού ρόλου της p14^{ARF} απουσία της β-κατενίνης, υποστηρίζοντας την υπόθεση ενός προ-αποπτωτικού ρόλου για την τελευταία. Η υπόθεσή αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι ορισμένα γονίδια με αυξητικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες αλληλεπιδρούν με παράγοντες της οικογένειας TCF, φέροντας τις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης στο μόριό τους (Widlund et al., 2002; Hino et al., 2005). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η β-κατενίνη με την p14^{ARF} δημιουργούν φαινόμενα αρνητικής ανατροφοδότησης που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης της p14^{ARF} με τους παράγοντες E2F1 και myc, όπου η πρώτη ανταγωνίζεται τη μεταγραφική λειτουργία των τελευταίων, επηρεάζοντας τον κυτταρικό κύκλο και μάλιστα ανεξάρτητα από την παρουσία της p53 (Sherr, 2006; Ozenne et al., 2010). Η ύπαρξη τέτοιων ρυθμιστικών δικτύων υπογραμμίζει τη σημασία τους στην κυτταρική ομοιόσταση.

Σε επόμενη φάση, συνδυάστηκαν τα παραπάνω με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντός μας, την Hsp70. Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι μια συγγενής πρωτεΐνη της Hsp70, η Hsp90 μπορεί μέσω αναστολής της να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων της β-κατενίνης μέσω αποικοδόμησης εξαρτώμενης από την ουβικιτίνη

(Kurashina et al., 2009), έπρεπε να εξακριβώσουμε πως ακριβώς επιδρά η Hsp70 πάνω στην έκφραση της β-κατενίνης και κατ' επέκταση, ποια η σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, αλλά και η λειτουργική σχέση της Hsp70 με την p14^{ARF}. Προς απάντηση των αποριών μας, μελέτες ανοσοαποτύπωσης μας επέδειξαν ότι η απουσία της Hsp70 οδηγούσε σε μείωση της έκφρασης της β-κατενίνης μετά από οξειδωτικό ή θερμικό στρες, ενώ μελέτες ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρύμνισης μας έδειξαν μια πιθανή λειτουργική συσχέτιση των Hsp70 και p14^{ARF} μέσω συνεντοπισμού στους πυρηνίσκους και ταυτόχρονη αντίχνευση μετά από συγκατακρύμνιση. Όλα τα παραπάνω μας οδήγησαν στην υπόθεση ενός λειτουργικού ρόλου των Hsp70, p14^{ARF} και β-κατενίνης. Τα ευρήματά μας αυτά υποστηρίζονται και από πρόσφατα δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν τον έλεγχο της Hsp70 στην αποικοδόμηση της β-κατενίνης από το πρωτεόσωμα μέσω ουβικιτινυλίωσης (Weiss et al., 2007).

Αξιοσημείωτη είναι η σημαντικότητα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στον κυτταρικό κύκλο, αλληλεπιδρώντας με αρκετούς ρυθμιστές αυτού (Aligue et al., 1994; Picard, 2002; McClellan et al., 2007), βοηθώντας στη σταθεροποίησή τους, όπως στην περίπτωση της Hsp90, η οποία σχηματίζει σύμπλοκα με τη μεταλλαγμένη p53 και την MDM2, προστατεύοντας την MDM2 από την αποικοδόμηση μέσω του πρωτεοσώματος και μπλοκάροντας την αλληλεπίδρασή της με την p14^{ARF} (Peng et al., 2001). Σύμφωνα με την προηγούμενη αναφορά, αλλά και δικές μας παρατηρήσεις, οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου μπορούν να επηρεάσουν την υποκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ακόμη και όταν οι μεταξύ τους ποσότητες διαφέρουν σημαντικά. Παρά τάντα, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η Hsp70 μαζί με άλλες ομοσυνοδές πρωτεΐνες, όπως η CHIP, ωθούν τις πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος (Εικόνα 4.2, Αγγελίδης, 2003β). Η ασυμφωνία αυτή στις παρατηρήσεις θα μπορούσε να οφείλεται στην πληθώρα των ομο-συνοδών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της Hsp70 αλλά και την ειδικότητα των στόχων-υποστρωμάτων της (Mosser and Morimoto, 2004).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, προτείνουμε το ακόλουθο μοντέλο σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών Hsp70, p14^{ARF} και β-κατενίνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες (Εικόνα 3.15) (Damalas et al., 2011).

Με βάση το μοντέλο αυτό, η p14^{ARF} δρα ως συλλέκτης της Hsp70 που επάγεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα λόγω στρες (θερμικού ή οξειδωτικού). Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ των δύο πρωτεϊνών επιτρέπει την αποικοδόμηση της β-κατενίνης από το πρωτεόσωμα μέσω ουβικιτινυλίωσης, οδηγώντας τελικά το κύτταρο σε απόπτωση. Ωστόσο, απουσία της p14^{ARF}, η Hsp70 δε μετατοπίζεται στον ίδιο βαθμό στον πυρήνα-πυρηνίσκους. Το αυξημένο κυτταροπλασματικό κλάσμα επηρεάζει την ουβικιτινυλίωση της β-κατενίνης, καταστέλλοντας έτσι την αποικοδόμησή της και προωθώντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Παράλληλα με τα παραπάνω πειράματα που αφορούσαν τη μελέτη λειτουργίας της Hsp70, μελετούσαμε *in vivo* και το ρόλο της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ποντικών που διατηρούμε και υπερεκφράζουν την Hsp70. Για το σκέλος αυτό, ακολουθήθηκε η επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια, μια πολύ γνωστή παρενέργεια που προκαλεί η δοξορουβικίνη σε καρκινοπαθείς οι οποίοι δέχονται θεραπεία με το εν λόγω κυτταροστατικό φάρμακο (Octavia et al., 2012). Οι μέχρι σήμερα μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον τομέα αυτό, περιέχουν κατά κύριο λόγο κλινικά στοιχεία, χωρίς να υπάρχουν πολλές αναφορές στο μονοπάτι που ακολουθείται για την απόπτωση των μυοκυττάρων της καρδιάς μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Το

κενό αυτό θελήσαμε να καλύψουμε, εν μέρει τουλάχιστον, συνδέοντας την από δοξορουβικίνη απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων με τον προστατευτικό ρόλο που προσδίδει η Hsp70.

Για τις πειραματικές ανάγκες, πραγματοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο διαλείπουσας ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης δοξορουβικίνης σε ποντίκια αγρίου τύπου και ποντίκια που έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70. Χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες ποντίκια και των δύο ομάδων στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε κάποια επεξεργασία, μετρήσαμε υπερηχοκαρδιογραφικά την καρδιακή λειτουργία, προχωρώντας ακολούθως στον υπερηχοκαρδιογραφικό έλεγχο των ζώων στα οποία πραγματοποιήθηκαν ενέσεις δοξορουβικίνης, σε χρονικά πλαίσια 4, 6 και 10 εβδομάδων. Όπως αναμενόταν, η χορήγηση δοξορουβικίνης προκάλεσε στα ζώα καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία βάσει των υπερηχοκαρδιογραφικών μετρήσεων, φαίνεται να εγκαθίσταται στις 6 εβδομάδες και στις δύο ομάδες ζώων. Στην περίπτωση όμως των αγρίου τύπου ποντικίων, η καρδιακή ανεπάρκεια είναι πιο βαριάς μορφής, όπως αποκαλύπτεται από τους καρδιακούς δείκτες, αλλά και τη θνητότητα των ζώων σε κάθε χρονικό σημείο. Αντιθέτως, τα διαγονιδιακά ως προς την έκφραση της Hsp70 ζώα, εμφανίζουν μια ηπιότερης μορφής καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία στις 10 εβδομάδες τείνει να ανακάμψει, όπως φανερώνουν οι δείκτες καρδιακής λειτουργίας. Παράλληλα, τα ζώα αυτά εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά θνητότητας. Έτσι, οδηγούμαστε σε ένα πρώιμο συμπέρασμα ότι η Hsp70 βοηθά στην ανάκαμψη της καρδιακής λειτουργίας και την επιβίωση των ζώων μετά από την από δοξορουβικίνη επαγόμενη καρδιακή ανεπάρκεια.

Επειδή όμως μόνο οι κλινικές παρατηρήσεις δεν ήταν αρκετές για να υποστηρίξουν την υπόθεση για την προστασία του μυοκαρδίου από την Hsp70, επιχειρήθηκε η βιοχημική ανάλυση των κυττάρων του μυοκαρδίου και των αποπτωτικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Επίσης, μελετήθηκε και το επίπεδο που μπορεί η Hsp70 να αναστείλει, αν αυτό ισχύει φυσικά, τον επαγόμενο από δοξορουβικίνη κυτταρικό θάνατο στα καρδιομυοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκαν βιοχημικά κύτταρα ή τομές από το μυοκάρδιο ζώων, τόσο αγρίου τύπου, όσο και διαγονιδιακών, τα οποία βρισκόταν στο αποκορύφωμα της καρδιακής ανεπάρκειας (10 εβδομάδες), μέσω μελετών ανοσοαποτύπωσης σε ολικά εκχυλίσματα από καρδιές, όσο και μελετών ανοσοφθορισμού σε τομές από τις καρδιές των εν λόγω ποντικίων, χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για αποπτωτικούς δείκτες. Και στην περίπτωση αυτή, η ενεργοποίηση των αποπτωτικών δεικτών ήταν ασθενέστερη στην περίπτωση των διαγονιδιακών ποντικίων. Επιπλέον όμως, οι βιοχημικές μελέτες, μας έδειξαν ότι η Hsp70 μπορεί να ελέγξει τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων το σημείο προ της ενεργοποίησης της p53.

Έτσι, μετά από τα παραπάνω, είμαστε σε θέση να προτείνουμε το ακόλουθο μοντέλο για τη δράση της Hsp70 στην προστασία των καρδιομυοκυττάρων μετά από επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια (Εικόνα 3.22).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και προκαλεί βλάβες στο DNA με άμεση σύνδεση ή μέσω ROS από το οξειδωτικό στρες. Σε αρχικό στάδιο, το στρεσογόνο ερέθισμα, αναστέλλει το μεταγραφικό ρόλο της p53, η οποία προσδένεται πιθανά στην MDM2 και εξέρχεται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Η p53 φωσφορυλιώνεται και πηγαίνει πιθανά στο μιτοχόνδριο, όπου και ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση. Η Hsp70 εμπλέκεται στο μονοπάτι αυτό. Συγκεκριμένα, αναστέλλει την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της p53, οπότε

αυτή επιτελεί το ρόλο της εντός του πυρήνα χωρίς να ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης μέσω του ελέγχου φωσφορυλίωσης της p53.

Ολοκληρώνοντας, η παρούσα εργασία αναφέρεται σε εμπλοκή της Hsp70 σε 3 κυτταρικούς μηχανισμούς.

Ο πρώτος αφορά την προστασία και διατήρηση της ποιότητας του DNA από την Hsp70 (Kotoglou et al., 2009). Δηλαδή, προτείνεται ένας νέος ρόλος για την Hsp70 που αφορά στη ρύθμιση των σημειακών θραύσεων του νουκλεοπλασματικού και του ριβοσωμικού DNA. Βέβαια δεν αποκλείεται και η πιθανότητα η Hsp70 να παρεμβαίνει και στην προστασία της ποιότητας του RNA δεδομένου ότι από παλιά είναι γνωστό ότι συνιστά μια RNP-συνδέουσα πρωτεΐνη. Οι μελλοντικές μελέτες ενδεχομένως να στοχεύσουν στη διευθέτηση αυτού του θέματος προσθέτοντας περαιτέρω στοιχεία στην προστατευτική της δράση.

Ο δεύτερος μηχανισμός, που συνδέει τη δράση της Hsp70 με την p14^{ARF} και τη β-κατενίνη, αφορά στην προστασία των καρκινικών κυττάρων από την απόπτωση μετά από στρες. Βέβαια, μελλοντικές εργασίες μπορούν να υποδείξουν με σαφήνεια τον τρόπο με τον οποίο η Hsp70 παρεμβαίνει στην αλλαγή του προτύπου ουβικιτινυλίωσης της β-κατενίνης, όπως έχει προταθεί (Weiss et al., 2007), οδηγώντας τελικά στην αποτροπή της αποικοδόμησής της. Επιπλέον, τα ευρήματά μας θα μπορούσαν να έχουν προεκτάσεις σε πιθανές κλινικές εφαρμογές σχετικές με τη θεραπεία ασθενών που έχουν καρκίνους, μέσω της χρήσης πρόσφατα σχεδιασμένων αναστολέων της β-κατενίνης, χρησιμοποιώντας τους πιθανά σε συνδυασμό με στοχευμένη γονιδιακή θεραπεία ή φαρμακευτική αποσιώπηση της Hsp70, προς ενίσχυση της δράσης των αναστολέων αυτών, οδηγώντας τελικά τα καρκινικά κύτταρα πιο εύκολα στον κυτταρικό θάνατο.

Ο τρίτος μηχανισμός αφορά την εμπλοκή της Hsp70 στο μηχανισμό καρδιακής ανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκαν νέα *in vivo* δεδομένα για τη δράση της Hsp70 στην από δοξορουβικίνη επαγόμενη καρδιακή ανεπάρκεια μέσα από τη μελέτη καρδιακών δεικτών και βιοχημικών αναλύσεων σε μυϊκά κύτταρα καρδιακού ιστού. Προτείνεται ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η Hsp70 προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα από την απόπτωση εξαιτίας της δράσης της δοξορουβικίνης, δίνοντας έτσι ένα πιθανό τρόπο για απαλλαγή του εν λόγω φαρμάκου από τη σημαντική αυτή παρενέργεια, η οποία επισκιάζει την επιτυχημένη επί χρόνων χορήγησή του στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκινωμάτων. Μελλοντικά, θα πρέπει να εξετάσουμε εάν η δράση της Hsp70 στον έλεγχο της απόπτωσης γίνεται εντός ή εκτός του πυρηνικού χώρου, μελετώντας εάν η p53 εξέρχεται από τον πυρήνα ή παραμένει εκεί.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

5.1. Περίληψη

Στην παρούσα εργασία αναλύουμε την εμπλοκή της Hsp70 σε 3 κυτταρικούς μηχανισμούς.

Πρώτον, η μετακίνηση της Hsp70 προς τον πυρήνα-πυρηνίσκους μετά από στρες, θερμικό ή οξειδωτικό, γίνεται προκειμένου αυτή να συμμετάσχει σε μονοπάτι που σχετίζεται με την προστασία του νουκλεοπλασματικού και του ριβοσωμικού DNA των πυρηνίσκων από σημειακές θραύσεις. Η Hsp70 προσδένεται με την PARP-1 και την XRCC1, για την επιτέλεση της δράσης της.

Δεύτερον, η Hsp70 εμπλέκεται στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων από στρες μέσω της συνεργασίας της με την πρωτεΐνη p14^{ARF}. Η αποσιώπηση της p14^{ARF} σε καρκινικά κύτταρα μας έδειξε αυξημένη αντοχή στον κυτταρικό θάνατο μετά από θερμικό ή οξειδωτικό στρες. Η προστασία αυτή φαίνεται να προέρχεται από την αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης, μιας πρωτεΐνης που ρυθμίζει μεταγραφικά την p14^{ARF}, όπως φανέρωσαν μελέτες αποσιώπησης της β-κατενίνης. Στην περίπτωση αυτή, ο προστατευτικός ρόλος της p14^{ARF} φάνηκε να αίρεται μετά από στρες, με τα επίπεδα της απόπτωσης να επανέρχονται στα επίπεδα των πατρικών κυττάρων. Επιπλέον, η Hsp70 φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδα της β-κατενίνης σε συνεργασία με την p14^{ARF}, όπως μας υπέδειξαν μελέτες διπλής αποσιώπησης των πρωτεϊνών Hsp70 και p14^{ARF}, προτείνοντας το σχηματισμό ενός λειτουργικού δικτύου μεταξύ των τριών πρωτεϊνών που ρυθμίζει την απόπτωση των κυττάρων μετά από οξειδωτικό ή θερμικό στρες μέσω επαγωγής σημάτων κυτταρικού θανάτου.

Τρίτον, η Hsp70 εμπλέκεται στην προστασία από καρδιακή ανεπάρκεια μέσω επίδρασής της στην αναστολή του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μηχανισμού. Σε *in vivo* μελέτες χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την Hsp70. Αποδείχθηκε ότι η Hsp70 εμπλέκεται στο μηχανισμό απόπτωσης των καρδιομυοκυττάρων μέσω ελέγχου της ενεργοποίησης της p53.

Συνολικά, η παρούσα εργασία έφερε στο φως νέα στοιχεία σχετικά με την προστατευτική δράση της Hsp70, προτείνοντας 3 νέες δράσεις που αφορούν την επιδιόρθωση σημειακών DNA θραύσεων μετά από στρες, την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μετά από στρες, αλλά και την προστασία των κυττάρων του μυοκαρδίου προς αποφυγή της καρδιακής ανεπάρκειας.

5.2. Summary

In this project, we analyse the involvement of Hsp70 into 3 cellular mechanisms.

Firstly, Hsp70's translocation to the nucleus-nucleoli after heat or oxidative stress takes place in order for it to participate in a pathway that relates to the protection of nucleoli's nucleoplasmic and ribosomal DNA from strand breaks. Hsp70 binds to PARP-1 and XRCC1 in order to achieve its purpose.

Secondly, Hsp70 is involved in the apoptosis of cancer cells after stress, through co-operation with p14^{ARF}. Silencing of p14^{ARF} in cancer cells has demonstrated increased tolerance in cellular death after heat or oxidative stress. This protection seems to come from an increase in the levels of b-catenin, a protein that transcriptionally regulates p14^{ARF}, as indicated by b-catenin silencing studies. In this case, the protective role of p14^{ARF} after stress seems to be suspended, with apoptotic

levels reaching those of mother cells. Furthermore, Hsp70 seems to regulate b-catenin levels in co-operation with p14^{ARF}, as indicated by double silencing of Hsp70 and p14^{ARF}, suggesting the formation of an active network among these three proteins. This network regulates cellular apoptosis after oxidative or thermal stress through induction of cellular death signals.

Thirdly, Hsp70 is involved in the protection from heart failure through inhibition of the mitochondrial apoptotic mechanism. *In vivo* studies using Hsp70-overexpressing transgenic mice have proven that Hsp70 is involved in the apoptotic mechanism cardiomyocytes via control of activation of p53.

In sum, the present work has brought to light new evidence concerning the protective effect of Hsp70, proposing 3 new actions involving DNA strand break repair after stress, cancer cell apoptosis after stress and the protection of myocardial cells in avoidance of heart failure.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adachi H., Katsuno M., Minamiyama M. et al., (2003). Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J. Neurosci.* 23, 2203-2211
- Aligue R., Akhavan-Niak H. and Russell P., (1994). A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *The EMBO Journal* 13, 6099-6106
- Altmeyer M. and Hottiger M.O., (2009). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging. *Aging* 1, 458-469
- Amadori D., (2001). Moving forward with new data and approaches: a fresh look at anthracyclines in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Rep.* 3(s3):e1, open access article
- Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K.L. et al., (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77-83
- Andrabi S.A., Dawson T.M. and Dawson V.L., (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147, 233-241
- Angelidis C.E., Lazaridis I. and Pagoulatos G.N., (1988). Specific inhibition of simian virus 40 protein synthesis by heat and arsenite treatment. *Eur. J. Biochem.* 172, 27-34
- Angelidis C.E., Lazaridis I. and Pagoulatos G.N., (1991). Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur. J. Biochem.* 199, 35-39
- Angelidis C.E., Lazaridis I. and Pagoulatos G.N., (1999). Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *Eur. J. Biochem.* 259, 505-512
- Angelidis C.E., Nova C., Lazaridis I. et al., (1996). Overexpression of hsp70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics* 2, 111-117
- Arcamone F., Cassinelli G., Faktini G. et al., (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering* 11, 1101-1110
- Asea A., (2005). Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of Hsp72. *Exerc. Immunol. Rev.* 11, 34-45
- Aveic S., Pigazzi M. and Basso G., (2011). BAG1: The guardian of anti-apoptotic proteins in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 6, open access article
- Αγγελίδης Χ., (2003α). Μοριακοί συνοδοί (chaperones). In *Αναδίπλωση και συστήματα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών*, Αγγελίδης Χ. (Ιωάννινα: Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων), 3-4
- Αγγελίδης Χ., (2003β). Έλεγχος ποιότητας πρωτεϊνών. In *Αναδίπλωση και συστήματα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών*, Αγγελίδης Χ. (Ιωάννινα: Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων), 19-33
- Babizhayev M.A., Nikolayev G.M., Nikolayeva J.G. et al., (2011). A survey and analysis of the role of molecular chaperone proteins and imidazole-containing dipeptide-based compounds as molecular escorts into the skin during stress, injury, water structuring and other types of cutaneous pathophysiology. *International Journal of Cosmetic Science* 33, 1-16
- Baler R., Welch W.J. and Voellmy R., (1992), Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *The Journal of Cell Biology* 117, 1151-1159

- Banasik M., Stedeford T. and Strosznajder R.P., (2012). Natural inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase I. *Mol. Neurobiol.*, in press
- Banasik M., Stedeford T., Strosznajder R.P. et al., (2011). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 attenuates the toxicity of carbon tetrachloride. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 26, 883–889
- Barracough R. and Ellis R.J., (1980). Protein synthesis in chloroplasts IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 608, 19-31
- Barral J.M., Broadley S.A., Schaffar G. et al., (2004). Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15, 17-29
- Bases R., (2005). Clonogenicity of human leukemic cells protected from cell-lethal agents by heat shock protein 70. *Cell Stress & Chaperones* 10, 37–45
- Bases R., (2006). Heat shock protein 70 enhanced deoxyribonucleic acid base excision repair in human leukemic cells after ionizing radiation. *Cell Stress & Chaperones* 11, 240-249
- Bates S and Vousden K.H., (1996). p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 12-18
- Becker J. and Craig E.A., (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219, 11-23
- Beckmann R.P., Mizzen L.A. and Welch W.J., (1990). Interaction of Hsp70 newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854
- Benaroudj N., Triniolles F. and Ladjimi M.M., (1996). Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 18471-18476
- Benjamin I.J. and McMillan D.R., (1998). Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 83, 117-132
- Benz I. and Schmidt M.A., (2002). Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology* 45, 267-276
- Bergeron J.J.M., Brenner M.B., Thomas D.Y. et al., (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *TIBS* 19, 124-128
- Berkovich E., Lamed Y. and Ginsberg D., (2003). E2F and Ras synergise in transcriptionally activating p14ARF expression. *Cell Cycle* 2, 127-133
- Berthiaume J.M. and Wallace K.B., (2007). Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 23, 15–25
- Billen D., (1990). Spontaneous DNA damage and its significance for the "negligible dose" controversy in radiation protection. *Radiat. Res.* 124, 242-245
- Bole D.G., Hendershot L.M. and Kearney J.F., (1986). Posttranslational Association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *The Journal of Cell Biology* 102, 1558-1566
- Bonnycastle L.L.C., Yu C.-E., Hunt C.R. et al., (1994). Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 23, 85-93
- Boorstein W.R., Ziegelhoffer T. and Craig E.A., (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 38, 1-17
- Bozidis P., Lazaridis I., Pagoulatos G.N. et al., (2002). Mydj2 as a potent partner of hsc70 in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 1553-1560

- Braig K., Otwinowski Z., Hegde R. et al., (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEl at 2.8 Å. *Nature* 371, 578-586
- Brocchieri L., de Macario E.C. and Macario A.J.L., (2008). hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology* 8, open access article
- Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K. et al., (2002). Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Research* 30, 1354-1363
- Buchner J., (1999). Hsp90 & Co. – a holding for folding. *TIBS* 24, 136-141
- Buchner J., Schmidt M., Fuchs M. et al., (1991). GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* 30, 1586-1591
- Bukau B. and Horwich A.L., (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366
- Bukau B., Weissman J. and Horwich A., (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451
- Caiafa P., Guastafierro T. and Zampieri M., (2009). Epigenetics: poly(ADP-ribosylation) of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J.* 23, 672–678
- Caldecott K.W., (2001). Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssays* 23, 447-455
- Caldecott K.W., (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2, 955-969
- Caldecott K.W., Aoufouchi S., Johnson P. et al., (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular ‘nick-sensor’ in vitro. *Nucleic Acids Research* 24, 4387–4394
- Caldecott K.W., McKeown C.K., Tucker J.D. et al., (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA Ligase III. *Mol. Cell. Biol.* 14, 68-76
- Calini V., Urani C. and Camatini M., (2003). Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicology in Vitro* 17, 561-566
- Casares N., Pequignot M.O., Tesniere A. et al., (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 1691–1701
- Castellone M.D., Teramoto H., Williams B.O. et al., (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 310, 1504-1510
- Caveda L., Martin-Padura I., Navarro P. et al., (1996). Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J. Clin. Invest.* 98, 886–893
- Chambon P., Weill J.D. and Mandel P., (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 11, 39-43
- Chandrasekhar G.N., Tilly K., Woolford C. et al., (1986). Purification of the groES morphogenetic protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 12414-12419
- Chappell T.G., Konforti B.B., Schmid S.L. et al., (1987). The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 746-751

- Chen D., Shan J., Zhu W.G. et al., (2010). Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* 464, 624-627
- Chen M., Cai H., Yang J.-L. et al., (2008). Effect of heat stress on expression of junction-associated molecules and upstream factors androgen receptor and Wilms' tumor 1 in monkey sertoli cells. *Endocrinology* 149, 4871-4882
- Cheng M.Y., Hartl F.-U., Martin J. et al., (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 337, 620-625
- Chernikov A.V., Gudkov S.V., Shtarkman I.N. et al., (2007). Oxygen effect in heat-induced DNA damage. *Biophysics* 52, 185-190
- Chiang H.-L., Terlecky S.R., Plant C.P. et al., (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382-385
- Chiarugi A., (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 122-129
- Chien A.J., Moore E.C., Lonsdorf A.S. et al., (2009). Activated Wnt/ β -catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 1193-1198
- Chirico W.J., Waters M.G. and Blobel G., (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810
- Clark J.I. and Muchowski P.J., (2000). Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 52-59
- Clevers H., (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480
- Cohen E., Bieschke J., Perciavalle R.M. et al., (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* 313, 1604-1610
- Collins A.R., Ai-guo M. and Duthie S.J., (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair* 336, 69-77
- Colombo E., Martinelli P., Zamponi R. et al., (2006). Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res.* 66, 3044-3050
- Cooper G.M. and Hausman R.E., (2007). The nucleus. In *The Cell: A Molecular Approach*, 4th edition, Cooper G.M. (Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates Inc.), 355-383
- Coppo A., Manzi A., Pulitzer J.F. et al., (1973). Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 76, 61-87
- Craig E.A. and Gross C. A., (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? *TIBS* 16, 135-140
- Craig E.A. and Jacobsen K., (1984). Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell* 38, 841-849
- Craig E.A., Weissman J.S. and Horwich A.L., (1994). Heat shock proteins and molecular chaperones: Mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78, 365-372
- Creagh E.M., Carmody R.J. and Cotter T.G., (2000). Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Experimental Cell Research* 257, 58-66
- Cummings C.J., Sun Y., Opal P. et al., (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Human Molecular Genetics* 10, 1511-1518

- Curtin N.J., (2005). PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7, 1-20
- Cyr D.M. and Douglas M.G., (1994). Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue YDJ1. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 9798-9804
- Cyr D.M., Langer T. and Douglas M.G., (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *TIBS* 19, 176-181
- Damalas A., Velimezi G., Kalaitzakis A. et al., (2011). Loss of p14ARF confers resistance to heat shock- and oxidative stress-mediated cell death by upregulating β -catenin. *Int. J. Cancer* 128, 1989-1995
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. et al., (1999). Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342, 249-268
- Dastoor Z. and Dreyer J.-L., (2000). Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *Journal of Cell Science* 113, 2845-2854
- Davies B.R., Worsley S.D. and Ponder B.A.J., (1998). Expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. *Histopathology* 32, 69-80
- de Jong P.R., Schadenberg A.W.L., Jansen N.J.G. et al., (2009). Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects. *Cell Stress and Chaperones* 14, 117-131
- de la Rosa E.J., Vega-Núñez E., Morales A.V. et al., (1998). Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9950-9955
- de Stanchina E., McCurrach M.E., Zindy F. et al., (1998). E1A signaling to p53 involves the p19ARF tumor suppressor. *Genes & Development* 12, 2434-2442
- DeLuca-Flaherty C., Flaherty K.M., McIntosh L.J. et al., (1988). Crystals of an ATPase fragment of bovine clathrin uncoating ATPase. *J. Mol. Biol.* 200, 749-750
- den Besten W., Kuo M.-L., Williams R.T. et al., (2005). Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle* 4, 1593-1598
- Deshaies R.J., Koch B.D., Werner-Washburne M. et al., (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805
- DiDomenico B.J., Bugaisky G.E. and Lindquist S., (1982). The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* 31, 593-603
- Dimri G.P., Itahana K., Acosta M. et al., (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 273-285
- Doetsch P.W. and Cunningham R.P., (1990). The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutation Research* 236, 173-201
- Dominguez G., Silva J., Garcia J.M. et al., (2003). Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4 α in some human primary tumors. *Mutation Research* 530, 9-17
- Dominguez-Brauer C., Chen Y.-J., Brauer P.M. et al., (2009). ARF stimulates XPC to trigger nucleotide excision repair by regulating the repressor complex of E2F4. *EMBO reports* 10, 1036-1042

- Dorner A.J., Bole D.G. and Kaufman R.J., (1987). The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* 105, 2665-2674
- Doroshov J.H., Locker G.Y. and Myers C.E., (1980). Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations caused by doxorubicin. *J. Clin. Invest.* 65, 128-135
- Doulias P.-T., Christoforidis S., Brunk U.T. et al., (2003). Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 719–728
- Doulias P.-T., Kotoglou P., Tenopoulou M. et al., (2007). Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radical Biology & Medicine* 42, 567-577
- Drees F., Pokutta S., Yamada S. et al., (2005). α -Catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903–915
- Dressel R., Johnson J.P. and Günther E., (1998). Heterogenous patterns of constitutive and heat shock induced expression of HLA-linked HSP70-1 and HSP70-2 heat shock genes in human melanoma cell lines. *Melanoma Research* 8, 482-492
- D'Silva I., Pelletier J.D., Lagueux J. et al., (1999). Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1430, 119-126
- Duarte M.C., Colombo J., Baptista Rossit A.R. et al., (2005). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 11, 6593-6600
- Ellenberger T. and Tomkinson A.E., (2008). Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 313–338
- Ellgaard L., Molinari M. and Helenius A., (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888
- Ellis J., (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379
- Ellis R.J. and Hemmingsen S.M., (1989). Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *TIBS* 14, 339-342
- Ellis R.J. and Van der Vies S.M., (1988). The rubisco subunit binding protein. *Photosynthesis Research* 16, 101-115
- Ellis R.J., (1996). Discovery of molecular chaperones. *Cell Stress & Chaperones* 1, 155-160
- Ellwood M.S. and Craig E.A., (1984). Differential regulation of the 70K Heat shock gene and related Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1454-1459
- Eom Y.-W., Kim M.A., Park S.S. et al., (2005). Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 24, 4765–4777
- Essers .A.G., de Vries-Smits L.M.M., Barker N. et al., (2005). Functional interaction between β -catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 308, 1181-1184
- Eymin B., Claverie P., Salon C. et al., (2006). p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4339–4350

- Fathallah D.M., Cherif D., Dellagi K. et al., (1993). Molecular cloning of a novel human hsp70 from a B cell line and its assignment to chromosome 5. *The Journal of Immunology* 151, 810-813
- Febbraio M.A., Ott P., Bay Nielsen H. et al., (2002a). Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J. Physiol.* 544, 957-962
- Febbraio M.A., Steensberg A., Walsh R. et al., (2002b). Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J. Physiol.* 538, 911-917
- Feige U and Polla B.S., (1994). Heat shock proteins: the hsp70 family - Hsp70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 50, 979-986
- Fenton W.A and Horwich A.L., (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Science* 6, 743-760
- Fenton W.A., Kashi Y., Furtak K. et al., (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371, 614-619
- Ferrarini M., Heltai S., Zocchi M.R. et al., (1992). Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int. J. Cancer* 51, 613-619
- Fink A.L., (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 79, 425-449
- Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C. and McKay D.B., (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628
- Flaherty K.M., McKay D.B., Kabsch W. et al., (1991). Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5041-5045
- Fleck O. and Nielsen O., (2004). DNA repair. *Journal of Cell Science* 117, 515-517
- Flynn G.C., Beckers C.J.M., Baase W.A. et al., (1993). Individual subunits of bacterial luciferase are molten globules and interact with molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10826-10830
- Fohlman J., Eaker D., Karlsson E. et al., (1976). Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *Eur. J. Biochem.* 68, 457-469
- Fornari F.A., Randolph J.K., Yalowich J.C. et al., (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol. Pharm.* 45, 649-656
- Freeman B.C. and Morimoto R.I., (1996). The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *The EMBO Journal* 15, 2969-2979
- Freeman B.C., Myers M.P., Schumacher R. et al., (1995). Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *The EMBO Journal* 14, 2281-2292
- Frydman J., Nimmegern E., Ohtsuka K. et al., (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111-117
- Fu Y., Zheng S., An N. et al., (2011). β -catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int. J. Cancer* 129, 1541-1551
- Gabai V.L., Yaglom J.A., Volloch V. et al., (2000). Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6826-6839

- Gabriele T., Tavaría M., Kola I. et al., (1996). Analysis of heat shock protein 70 in human chromosome 21 containing hybrids. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 905-910
- Gamer J., Bujard H. and Bukau B., (1992). Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ 32. *Cell* 69, 833-842
- Gao Y.-J., Xiao C.-F., Chen S. et al., (2004). In vitro study on role of Hsp70 expression in DNA damage of human embryonic lung cells exposed to benzo[a]pyrene. *Biomedical and Environmental Sciences* 17, 144-152
- García M.A., Collado M., Muñoz-Fontela C. et al., (2006). Antiviral action of the tumor suppressor ARF. *The EMBO Journal* 25, 4284-4292
- Garigan D., Hsu A.-L., Fraser A.G. et al., (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161, 1101-1112
- Gat U., DasGupta R., Degenstein L. et al., (1998). De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. *Cell* 95, 605-614
- Gehrig S.M., van der Poel C., Sayer T.A. et al., (2012). Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 484, 394-398
- Georgellis D., Sohlberg B., Hartl F.U. et al., (1995). *Molecular Microbiology* 16, 1259-1268
- Georgopoulos C., Tilly K. and Casjens S., (1983). Lambdoid phage head assembly. In *Lambda II*, Volume 13, Hendrix R.W., Roberts J.W., Stahl F.W. and Weisberg R.A. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 279-304
- Georgopoulos C.P., (1977). A new bacterial gene (groPC) which affects λ DNA replication. *Molec. gen. Genet.* 151, 35-39
- Georgopoulos C.P., Hendrix R.W., Casjens S.R. et al., (1973). Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* 76, 45-60
- Georgopoulos C.P., Lam B., Lundquist-Heil A. et al., (1979). Identification of the *E. coli* dnaK (groPC756) gene product. *Molec. gen. Genet.* 172, 143-149
- Germann M.W., Johnson C.N. and Spring A.M., (2012). Recognition of damaged DNA: structure and dynamic markers. *Medicinal Research Reviews* 32, 659-683
- Gething M.-J. and Sambrook J., (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45
- Gething M.-J., McCammon K. and Sambrook J., (1986). Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell* 46, 939-950
- Gilbert C.S., van den Bosch M., Green C.M. et al., (2003). The budding yeast Rad9 checkpoint complex: chaperone proteins are required for its function. *EMBO Reports* 4, 953-958
- Ginsberg G., Angle K., Guyton K. et al., (2011). Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutation Research* 727, 1-15
- Givan A.L. (2004). Flow cytometry: an introduction. In *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*, 2nd edition, volume 263, Hawley T.S. and Hawley R.G. (Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.), 1-31
- Glover J.R. and Lindquist S., (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82

- Glover J.R., Schirmer E.C., Singer M.A. et al., (1998). Hsp104. In *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Structure, Function, and Mode of Action*, Fink A.L. and Goto Y. (New York: Marcel Dekker, Inc.), 193-224
- Goate A.M., Cooper D.N., Hall C. et al., (1987). Localization of a human heat-shock HSP70 gene sequence to chromosome 6 and detection of two other loci by somatic-cell hybrid and restriction fragment length polymorphism analysis. *Hum. Genet.* 75, 123-128
- Goloubinoff P., Christeller J.T., Gatenby A.A. et al., (1989b). Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342, 884-889
- Goloubinoff P., Gatenby A.A. and Lorimer G.H., (1989a). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* 337, 44-47
- Gradwohl G., De Murcia J.M., Molinete M. et al., (1990). The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2990-2994
- Graf P.C.F. and Jakob U., (2002). Redox-regulated molecular chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1624-1631
- Gragerov A., Zeng L., Zhao X. et al., (1994). Specificity of DnaK-peptide binding. *J. Mol. Biol.* 235, 848-854
- Günther E. and Walter L., (1994). Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* 50, 987-1001
- Gupta R.S., Aitken K., Falah M. et al., (1994). Cloning of *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2895-2899
- Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C. et al., (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22, 6669-6678
- Gutierrez L.L.P., Maslinkiewicz A., Curi R. et al., (2008). Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochemical Pharmacology* 75, 2245-2262
- Gwack Y., Nakamura H., Lee S.H. et al., (2003). Poly (ADP-ribose) polymerase I and Ste20-like kinase hKFC act as transcriptional repressors for gamma-2 herpesvirus lytic replication. *Mol. Cell Biol.* 23, 8282-8294
- Haas I.G. and Wabl M., (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387-389
- Hageman J. and Kampinga H.H., (2009). Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ/ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. *Cell Stress and Chaperones* 14, 1-21
- Halladay J.T. and Craig E.A., (1995). A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Mol. Cell Biol.* 15, 4890-4897
- Hansen J.J., Dürr A., Cournu-Rebeix I. et al., (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1328-1332
- Hantschel M., Pfister K., Jordan A. et al., (2000). Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress & Chaperones* 5, 438-442
- Harrison G.S., Drabkin H.A., Kao F.-T. et al., (1987). Chromosomal location of human genes encoding major heat-shock protein HSP70. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 13, 119-130

- Hart M., Concordet J.-P., Lassot I. et al., (1999). The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Current Biology* 9, 207–210
- Hart M.J., de los Santos R., Albert I.N. et al., (1998). Downregulation of β -catenin by human axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Current Biology* 8, 573–581
- Hartl F.U. and Hayer-Hartl M., (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858
- Hartl F.U., (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580
- Hartl F.-U., Hlodan R. and Langer T., (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *TIBS* 19, 20-25
- Hartl F.U., Martin J. and Neupert W., (1992). Protein folding in the cell: The role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 293-322
- Hashemi J., Lindström M.S., Asker C. et al., (2002). A melanoma-predisposing germline CDKN2A mutation with functional significance for both p16 and p14ARF. *Cancer Letters* 180, 211–221
- He X., (2003). A Wnt-Wnt situation. *Developmental Cell* 4, 791-797
- He X., Semenov M., Tamai K. et al., (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/b-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677
- Heck T.G., Schöler C.M. and de Bittencourt P.I.H., (2011). HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell. Biochem. Funct.* 29, 215-226
- Hegde M.L., Hazra T.K. and Mitra S., (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research* 18, 27-47
- Hemmingsen S.M., Woolford C., Van der Vies S.M. et al., (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334
- Hendershot L.M., Valentine V.A., Lee A.S. et al., (1994). Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics* 20, 281-284
- Henderson B., (2010). Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem. Funct.* 28, 1-14
- Hendrix R.W., (1979). Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol.* 129, 375-392
- Hightower L.E. and Guidon P.T.Jr., (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *Journal of Cellular Physiology* 138, 257-266
- Hightower L.E., (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66, 191-197
- Hino S.-I., Tanji C., Nakayama K.I. and Kikuchi A., (2005). Phosphorylation of β -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes β -catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9063–9072
- Hofman G.E. and Somero G.N., (1995). Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mutilus trossulus*. *The Journal of Experimental Biology* 198, 1509-1518

- Hooeboom D. and Burgering B.M.T., (2009). Should I stay or should I go: β -catenin decides under stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796, 63–74
- Horváth I. and Víg L., (2010). Stability in times of stress. *Nature* 463, 436-438
- Horváth I., Multhoff G., Sonnleitner A. et al., (2008). Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 1653-1664
- Horwich A.L., Fenton W.A. and Farr G.W., (2004). Chaperonins. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 1, 393-398
- Hsieh P. and Yamane K., (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 129, 391–407
- Hsu A.-L., Murphy C.T. and Kenyon C., (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145
- Hu J., O.Toft D. and Seeger C., (1997). Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *The EMBO Journal* 16, 59-68
- Hunt C. and Morimoto R.I., (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6455-6459
- Hurtley S.M. and Helenius A., (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 277-307
- Hutchison K.A., Dittmar K.D. and Pratt W.B., (1994). All of the factors for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with heat shock protein 90 are preassociated in a self-sufficient protein folding structure, a "foldosome". *The Journal of Biological Chemistry* 269, 27894-27899
- Itzhaki L.S., Otzen D.E. and Fersht A.R., (1995). Nature and consequences of GroEL-protein interactions. *Biochemistry* 34, 14581-14587
- Ivanchuk S.M., Mondal S., Dirks P.B. et al., (2001). The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *Journal of Neuro-Oncology* 51, 219-229
- Jäätelä M., (1995). Over-expression of Hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer.* 60, 689-693
- Jäätelä M., (2004). Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23, 2746-2754
- Jäätelä M., Wissing D., Kokholm K. et al., (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal* 17, 6124-6134
- Jagtap P. and Szabó C., (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 421-440
- Jakob U., Gaestel M., Engel K. et al., (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 1517-1520
- Jamieson C., Sharma M. and Henderson B.R., (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 847-850
- Kamijo T., Bodner S., van de Kamp E. et al., (1999). Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res.* 59, 2217-2222
- Kamijo T., Weber J.D., Zambetti G. et al., (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8292–8297

- Kamijo T., Zindy F., Roussel M.F. et al., (1997). Tumor Suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649–659
- Kampinga H.H. and Craig E.A., (2010). The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 579-592
- Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J. et al., (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 14, 105-111
- Kang P.-J., Ostermann J., Shilling J., Neupert W. et al., (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348 137-143
- Kastritis E., Murray S., Kyriakou F. et al., (2009). Somatic mutations of adenomatous polyposis coli gene and nuclear b-catenin accumulation have prognostic significance in invasive urothelial carcinomas: evidence for Wnt pathway implication. *Int. J. Cancer* 124, 103–108
- Katsumata K., Okazaki A., Tsurupa G.P. et al., (1996). Dominant forces in the recognition of a transient folding intermediate of α -lactalbumin by GroEL. *J. Mol. Biol.* 264, 643-649
- Kauppinen T.M., (2007). Multiple roles for poly(ADP-ribose)polymerase-1 in neurological disease. *Neurochemistry International* 50, 954–958
- Kehrel L., (1999). Confocal imaging. In *Leica TCS Confocal Systems User Manual*. Leica Microsystems Heidelberg GmbH (Heidelberg, Germany), 1-7
- Kenny M.K., Mendez F., Sandigursky M. et al., (2001). Heat shock protein 70 binds to human apurinic/apyrimidinic endonuclease and stimulates endonuclease activity at abasic sites. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 9532–9536
- Khan S.H., Moritsugu J. and Wahl G.M., (2000). Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3266-3271
- Kim D.W., Kim K.-O., Shin M.J. et al., (2009 α). siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Molecular Cancer* 8, open access
- Kim J.-H., Kushiro K., Graham N.A. et al., (2009 β). Tunable interplay between epidermal growth factor and cell– cell contact governs the spatial dynamics of epithelial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 11149-11153
- Kochan J. and Murialdo H., (1983). Early intermediates in bacteriophage lambda prohead assembly II. Identification of biologically active intermediates. *Virology* 131, 100-115
- Koh D.W., Dawson T.M. and Dawson V.L., (2005). Poly(ADP-ribosylation) regulation of life and death in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 760–768
- Korinek V., Barker N., Morin P.J. et al., (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787
- Kotamraju S., Konorev E.A., Joseph J. et al., (2000). Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes Is ameliorated by nitron spin traps and ebselen: role of reactive oxygen and nitrogen species. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 33585–33592
- Kotoglou P., Kalaitzakis A., Vezyraki P. et al., (2009). Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress and Chaperones* 14, 391-406

- Kotsinas A., Evangelou K., Zacharatos P. et al., (2002). Proliferation, but not apoptosis, is associated with distinct β -Catenin expression patterns in non-small-cell lung carcinomas: relationship with adenomatous polyposis coli and G1- to S-phase cell-cycle regulators. *Am. J. Pathol.* 161, 1619–1634
- Kozutsumi Y., Segal M., Normington K. et al., (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464
- Kraus C., Liehr T., Hülsken J. et al., (1994). Localization of the human β -catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 23, 272-274
- Kraus W.L., (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 294–302
- Krause K.H. and Michalak M., (1997). Calreticulin. *Cell* 88, 439-443
- Kubota H., (2000). Heat shock proteins: HSP60 family genes. In *Encyclopedia of Stress*, Volume 2, Fink G. (United States of America: Academic Press), 348-349
- Kubota Y., Nash R.A., Klungland A. et al., (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *The EMBO Journal* 15, 6662-6670
- Kuehn M.J., Ogg D.J., Kihlberg J. et al., (1993). Structural basis of pilus subunit recognition by the PapD chaperone. *Science* 262, 1234-1241
- Kuida K., (2000). Molecules in focus: caspase-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 121-124
- Kuo M.-L., den Besten W., Bertwistle D. et al., (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes & Development* 18, 1862–1874
- Kurashina R., Ohyashiki J.H., Kobayashi C. et al., (2009). Anti-proliferative activity of heat shock protein (Hsp) 90 inhibitors via β -catenin/TCF7L2 pathway in adult T cell leukemia cells. *Cancer Letters* 284, 62-70
- Kwong R.A., Kalish L.H., Nguyen T.V. et al., (2005). p14ARF protein expression is a predictor of both relapse and survival in squamous cell carcinoma of the anterior tongue. *Clin. Cancer Res.* 11, 4107-4116
- Laemmli U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamerdin J.E., Montgomery M.A., Stilwagen S.A. et al., (1995). Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics* 25, 547-554
- Lancaster G.I., Møller K., Secher N.H. et al., (2004). Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress & Chaperones* 9, 276-280
- Langelier M.-F., Servent K.M., Rogers E.E. et al., (2008). A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 4105–4114
- Langer T., Lu C., Echols H. et al., (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683-689
- Laplante A.F., Moulin V., Auger F.A. et al., (1998). Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 1291-1301

- Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D. et al., (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420
- Lee A.S., (1987). Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *TIBS* 12, 20-23
- Lee M., Han W.S., Kim O.K. et al., (2006). Prognostic value of p16INK4 α and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathology – Research and Practice* 202, 415–424
- Leung K.C., Rajendran M.Y., Monfries C. et al., (1990). The human heat-shock protein family. *Biochem J.* 267, 125-132
- Leung M., Rosen D., Fields S. et al., (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition: preclinical and clinical development of synthetic lethality. *Mol. Med.* 17, 854-862
- Leung S.-M. and Hightower L.E., (1997). A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 2607-2614
- Leung T.K.C., Hall C., Rajendran M. et al., (1992). The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics* 12, 74-79
- Lewis M.J. and Pelham H.R.B., (1985). Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. *The EMBO Journal* 4, 3137-3143
- Lewis V.A., Hynes G.M., Zheng D. et al., (1992). T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol. *Nature* 358, 249-252
- Lewthwaite J., Skinner A. and Henderson B., (1998). Are molecular chaperones microbial virulence factors? *Trends in Microbiology* 6, 426-428
- Li G.C. and Werb Z., (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3218-3222
- Li G.C., Li L., Liu Y.-K. et al., (1991). Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1681-1685
- Liberek K., Galitski T.P., Zylicz M. et al., (1992). The DnaK chaperone modulates the heat shock response of escherichia coli by binding to the σ 32 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. USA* 89, 3516-3520
- Liberek K., Marszalek J., Ang D. et al., (1991). Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 88, 2874-2878
- Lilien J. and Balsamo J., (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of β -catenin. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 459–465
- Lin H., Blank M. and Goodman R., (1999). A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J. Cell. Biochem.* 75, 170-176
- Lin Z., Schwarz F.P. and Eisenstein E., (1995). The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 1011-1014
- Lindahl T., (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715
- Lindquist S. and Craig E.A., (1988). The heat-shock proteins. *Annu.Rev. Genet.* 22, 631-677

- Lindquist S., (1986). The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191
- Litt M., Kramer P., LaMorticella D.M. et al., (1998). Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Human Molecular Genetics* 7, 471-474
- Liu J., Mao W., Ding B. et al., (2008). ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1956–H1965
- Liu X., Wang L., Zhao S. et al., (2011). β -catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Med. Oncol.* 28, 608–614
- Lorimer G.H., (2001). A personal account of chaperonin history. *Plant Physiology* 125, 38-41
- Lucero O.M., Dawson D.W., Moon R.T. et al., (2010). A re-evaluation of the “oncogenic” nature of Wnt/ β -catenin signaling in melanoma and other cancers. *Curr. Oncol. Rep.* 12, 314–318
- López-Ribot J.L. and LaJean Chaffin W., (1996). Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 4724-4726
- Macario A.J.L. and de Macario E.C., (2005). Sick Chaperones, Cellular Stress, and Disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 1489-1501
- Macer D.R.J. and Koch G.L.E., (1988). Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 91, 61-70
- Mager W.H. and de Kruijff A.J.J., (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59, 506-531
- Maguschak K.A. and Ressler K.J., (2012). The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 62, 78-88
- Makatsori D., Kourmouli N., Polioudaki H. et al., (2004). The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 25567-25573
- Manolagas S.C. and Almeida M., (2007). Gone with the Wnts: β -catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol. Endocrinol.* 21, 2605-2614
- Manukhov I.V., Eroshnikov G.E., Vyssokikh M.Y. et al., (1999). Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins. *FEBS Letters* 448, 265-268
- Marintchev A., Gryk M.R. and Mullen G.P., (2003). Site-directed mutagenesis analysis of the structural interaction of the single-strand-break repair protein, X-ray cross-complementing group 1, with DNA polymerase β . *Nucleic Acids Research* 31, 580-588
- Marintchev A., Mullen M.A., Maciejewski M.W. et al., (1999). Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nature Structural & Molecular Biology* 6, 884-893
- Marintchev A., Robertson A., Dimitriadis E.K. et al., (2000). Domain specific interaction in the XRCC1-DNA polymerase β complex. *Nucleic Acids Research* 28, 2049-2059
- Martin J., Langer T., Boteva R. et al., (1991). Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* 352, 36-42

- Masson M., Niedergang C., Schreiber V. et al., (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3563–3571
- Masutani M., Suzuki H., Kamada N. et al., (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2301–2304
- Matsumoto Y. and Kim K., (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase β during DNA repair. *Science* 269, 699-702
- Mayhew M., da Silva A.C.R., Martin J. et al., (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379, 420-426
- McClellan A.J., Scott M.D. and Frydman J., (2005). Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* 121, 739-748
- McClellan A.J., Xia Y., Deutschbauer A.M. et al., (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131, 121-135
- McDonald B.T., Tamai K. and He X., (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26
- McDonough H. and Patterson C., (2003). CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress & Chaperones* 8, 303-308
- Mégnin-Chanet F., Bollet M.A. and Hall J., (2010). Targeting poly(ADP-ribose) polymerase activity for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 67,3649–3662
- Mendez F., Kozin E. and Bases R., (2003 α). Heat shock protein 70 stimulation of the deoxyribonucleic acid base excision repair enzyme polymerase β . *Cell Stress & Chaperones* 8, 153–161
- Mendez F., Sandigursky M., Kureekattil R.P. et al., (2003 β). Specific stimulation of human apurinic/aprimidinic endonuclease by heat shock protein 70. *DNA Repair* 2, 259–271
- Mendoza J.A., Rogers E., Lorimer G.H. et al., (1991). Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 13044-13049
- Menéndez S., Khan Z., Coomber D.W. et al., (2003). Oligomerization of the human ARF tumor suppressor and its response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 18720–18729
- Miki T., Yasuda S.-Y. and Kahn M., (2011). Wnt/ β -catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Dev. and Rep.* 7, 836-846
- Milner C.M. and Campbell R.D., (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 32, 242-251
- Milner C.M. and Campbell R.D., (1992). Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 36, 357-362
- Minami Y., Höhfeld J., Ohtsuka K. et al., (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 19617-19624
- Mitcheson J.S., Hancox J.C. and Levi A.J., (1998). Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular Research* 39, 280-300
- Mitra S., Boldogh I., Izumi T. et al., (2001). Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 38, 180-190

- Mizzen L.A., Chang C., Garrels J.I. et al., (1989). Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp75, a member of the hsp70 family and hsp58, a homolog of the bacterial groEL protein. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 20664-20675
- Mizzen L.A., Kabling A.N. and Welch W.J., (1991). The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp75 and hsp58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins. *Cell Regulation* 2, 165-179
- Mohrenweiser H.W., Carrano A.V., Fertitta A. et al., (1989). Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, on human chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.* 52, 11-14
- Moore D.J., Taylor R.M., Clements P. et al., (2000). Mutation of a BRCT domain selectively disrupts DNA single-strand break repair in noncycling Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13649-13654
- Morange M., (2005). What history tells us II. The discovery of chaperone function. *J. Biosci.* 30, 461-464
- Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V. et al., (1997). Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 275-1787-1790
- Morley J.F. and Morimoto R.I., (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular Biology of the Cell* 15, 657-664
- Morrison S.L. and Scharff M.D., (1975). Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line. *J. Immunol.* 114, 655-659
- Mosser D.D. and Morimoto R.I., (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenes. *Oncogene* 23, 2907-2918
- Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L. et al., (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5317-5327
- Multhoff G. and Hightower L.E., (1996). Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress & Chaperones* 1, 167-176
- Multhoff G. and Hightower L.E., (2011). Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress and Chaperones* 16, 251-255
- Multhoff G., Botzler C., Jennen L. et al., (1997). Heat shock protein 72 on tumor cells: A recognition structure for natural killer cells. *The Journal of Immunology* 158, 4341-4350
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M. et al., (1995). A stress-inducible 72-kDa heat shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* 61, 272-279
- Munro S. and Pelham H.R.B., (1986). An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291-300
- Munro S. and Pelham H.R.B., (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907
- Murialdo H. and Becker A., (1978). A genetic analysis of bacteriophage lambda prohead assembly in vitro. *J. Mol. Biol.* 125, 57-74
- Murialdo H., (1979). Early intermediates in bacteriophage lambda prohead assembly. *Virology* 96, 341-367
- Nash R.A., Caldecott K.W., Barnes D.E. et al., (1997). XRCC1 Protein Interacts with One of Two Distinct Forms of DNA Ligase III. *Biochemistry* 36, 5207-5211

- Neckers L. and Tatu U., (2008). Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe* 4, 519-527
- Niu P., Liu L., Gong Z. et al., (2006). Overexpressed heat shock protein 70 protects cells against DNA damage caused by ultraviolet C in a dose-dependent manner. *Cell Stress & Chaperones* 11, 162-169
- Nollen E.A., Salomons F.A., Brunsting J.F. et al., (2001). Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12038-12043
- Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A. et al., (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.* 200, 425-435
- Nylandsted J., Rohde M., Brand K. et al., (2000). Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7871-7876
- Obermann W.M.J., Sonderrmann H., Russo A.A. et al., (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *The Journal of Cell Biology* 143, 901-910
- Obermoeller L.M., Warshawsky I., Wardell M.R. et al., (1997). Differential functions of triplicated repeats suggest two independent roles for the receptor-associated protein as a molecular chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 10761-10768
- Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L. et al., (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52, 1213-1225
- Ogawa F., Shimizu K., Hara T. et al., (2008). Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. *Clinical and Experimental Rheumatology* 26, 659-662
- Oka M., Kimata Y., Mori K. et al., (1997). *Saccharomyces cerevisiae* KAR2 (BiP) gene expression is induced by loss of cytosolic HSP70/Ssa1p through a heat shock element-mediated pathway. *J. Biochem.* 121, 578-584
- Oka S., Kato J. and Moss J., (2006). Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 705-713
- Ortho Biotech, (2007). Doxil (doxorubicin HCl liposome injection): product information (revised). Ortho Biotech Products L.P. (New Jersey, USA), 1-19
- Ostermann J., Horwich A.L., Neupert W. et al., (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 341 125-130
- Ozenne P., Eymin B., Brambilla E. et al., (2010). The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int. J. Cancer* 127, 2239-2247
- Pack C.-G., Aoki K., Taguchi H. et al., (2000). Effect of electrostatic interactions on the binding of charged substrate to GroEL studied by highly sensitive fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267, 300-304
- Palhano Fedato R. and Maistro E.L., (2012). Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylesculetin in vivo and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J. Appl. Toxicol.*, *in press*

- Palleros D.R., Welch W.J. and Fink A.L., (1991). Interaction of hsp70 with unfolded proteins: Effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5719-5723
- Panaretakis T., Pokrovskaja K., Shoshan M.C. et al., (2002). Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 44317–44326
- Pandita T.K., Pandita S. and Bhaumik S.R., (2009). Molecular parameters of hyperthermia for radiosensitization. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 19, 235–251
- Papp E., Nardai G., Söti C. et al., (2003). Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *BioFactors* 17, 249-257
- Park S.-H., Bolender N., Eisele F. et al., (2007). The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Molecular Biology of the Cell* 18, 153-165
- Parsell D.A., Kowal A.S., Singer M.A. et al., (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 372, 475-478
- Pelham H.R.B. and Hardwick K.G., (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *The EMBO Journal* 7, 1757-1762
- Pelham H.R.B., (1984). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *The EMBO Journal* 3, 3095-3100
- Pelham H.R.B., (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46, 959-961
- Peluso M., Airoidi L., Munnia A. et al., (2008). Bulky DNA adducts, 4-aminobiphenyl-haemoglobin adducts and diet in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) prospective study. *British Journal of Nutrition* 100, 489-495
- Peng Y., Chen L., Li C. et al., (2001). Inhibition of MDM2 by hsp90 contributes to mutant p53 stabilization. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 40583-40590
- Périard J.D., Ruell P., Caillaud C. et al., (2012). Plasma Hsp72 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) expression under heat stress: influence of exercise intensity. *Cell Stress and Chaperones*, in press
- Perrett S., Zahn R., Stenberg G. et al., (1997). Importance of electrostatic interactions in the rapid binding of polypeptides to GroEL. *J. Mol. Biol.* 269, 892-901
- Peterson J.R., Ora A., Van P.N. et al., (1995). Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Molecular Biology of the Cell* 6, 1173-1184
- Phipps B.M., Hoffmann A., Stetter K.O. et al., (1991). A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *The EMBO Journal* 10, 1711-1722
- Picard D., (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1640-1648
- Pilon M. and Schekman R., (1999). Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679-682
- Pimkina J.S. and Murphy M.E., (2011). Interaction of the ARF tumor suppressor with cytosolic Hsp70 contributes to its autophagy function. *Cancer Biology & Therapy* 12, 503-509
- Plakidou-Dymock S. and McGivan J.D., (1994). Calreticulin-a stress protein induced in the renal epithelial cell line NBL-1 by amino acid deprivation. *Cell Calcium* 16, 1-8

- Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M. et al., (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 40974–40980
- Plumier J.-C.L., Ross B.M., Currie R.W. et al., (1995). Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J. Clin. Invest.* 95, 1854-1860
- Pockley A.G., Georgiades A., Thulin T. et al., (2003). Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 42, 235-238
- Pokutta S. and Weis W.I., (2007). Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 237–261
- Polaina J. and Conde J., (1982). Genes involved in the control of nuclear fusion during the sexual cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 253-258
- Pollice A., Vivo M. and La Mantia G., (2008). The promiscuity of ARF interactions with the proteasome. *FEBS Letters* 582, 3257–3262
- Qiu X.-B., Shao W.-M., Miao S. et al., (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2560–2570
- Ran R., Lu A., Zhang L. et al., (2004). Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK γ and impairing NF- κ B survival signaling. *Genes Dev.* 18, 1466-1481
- Ranson N.A., Dunster N.J., Burston S.G. et al., (1995). Chaperonins can catalyse the reversal of early aggregation steps when a protein misfolds. *J. Mol. Biol.* 250, 581-586
- Reddy N.N., Varaprasad K., Ravindra S. et al., (2011). Evaluation of blood compatibility and drug release studies of gelatin based magnetic hydrogel nanocomposites. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 385, 20–27
- Resendez E.Jr., Attenello J.W., Grafsky A. et al., (1985). Calcium ionophore A23187 induces expression of glucose-regulated genes and their heterologous fusion genes. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1212-1219
- Reya T. and Clevers H., (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850
- Rice P.A., (1999). Holding damaged DNA together. *Nature Structural & Molecular Biology* 6, 805-806
- Rippmann F., Taylor W.R., Rothbard J.B. et al., (1991). A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *The EMBO Journal* 10, 1053-1059
- Ritossa F., (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573
- Ritossa F., (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones* 1, 97-98
- Ritossa F.M., Pulitzer J.F., Swift H. et al., (1965). On the action of ribonuclease in salivary gland cells of *Drosophila*. *Chromosoma* 16, 144-151
- Rizos H., Darmanian A.P., Mann G.J. et al., (2000). Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization. *Oncogene* 19, 2978-2985
- Robertson K.D. and Jones P.A., (1998). The human ARF cell cycle regulatory promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6457-6473

- Rose M.D., Misra L.M. and Vogel J.P., (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57, 1211-1221
- Rothblatt J.A., Deshaies R.J., Sanders S.L. et al., (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *The Journal of Cell Biology* 109, 2641-2652
- Rowley N., Prip-Buus C., Westermann B. et al., (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell* 77, 249-259
- Ruis H. and Schüller C., (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17, 959-965
- Sadler I., Chiang A., Kurihara T. et al., (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *The Journal of Cell Biology* 109, 2665-2675
- Saegusa M., Hashimura M., Kuwata T. et al., (2006). Induction of p16INK4A mediated by β -catenin in a TCF4-independent manner: implications for alterations in p16INK4A and pRb expression during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 119, 2294–2303
- Saibil H., (2000). Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 251-258
- Saibil H.R., (2008). Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 35-42
- Sakumi K. and Sekiguchi M., (1990). Structures and functions of DNA glycosylases. *Mutation Research* 236, 161-172
- Saldanha G., Ghura V., Potter L. et al., (2004). Nuclear β -catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *British Journal of Dermatology* 151, 157–164
- Salma A., Tsiapos A. and Lazaridis I., (2007). The viral SV40 T antigen cooperates with dj2 to enhance Hsc70 chaperone function. *FEBS J.* 274, 5021-5027
- Samali A. and Cotter T.G., (1996). Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Experimental Cell Research* 223, 163-170
- Sargent C.A., Dunham I., Trowsdale J. et al., (1989). Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1968-1972
- Scherl A., Couté Y., Déon C. et al., (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13, 4100-4109
- Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G. et al., (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210
- Schiller P., Amin J., Ananthan J. et al., (1988). Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human HSP70 gene. *J. Mol. Biol.* 203, 97-105
- Schmid D., Baici A., Gehring H. et al., (1994). Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263, 971-973
- Schmitt C.A., McCurrach M.E., de Stanchina E. et al., (1999). INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes & Development* 13, 2670–2677
- Schreiber V., Amé J.C., Dollé P. et al., (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 23028–23036

- Scovassi A.I. and Poirier G.G., (1999). Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 199, 125–137
- Selim M.E., A Rashed E.L., Aleisa N.A. et al., (2012). The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation* 8, 58-64 (open access article)
- Selkoe D.J., (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426, 900-904
- Shall S. and de Murcia G., (2000). Poly ADP-ribose/ polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutation Research* 460, 1–15
- Sharma S.K., De Los Rios P., Christen P. et al., (2010). The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nature Chemical Biology* 6, 914-920
- Sharpless N.E., (2004). Ink4a/Arf links senescence and aging. *Experimental Gerontology* 39, 1751–1759
- Sharpless N.E., Bardeesy N., Lee K.H. et al., (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91
- Sherr C.J., (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689–3695
- Sherr C.J., (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature Reviews Cancer* 6, 663-673
- Shi J., Koteiche H.A., Mchaourab H.S. et al., (2006). Cryoelectron microscopy and EPR analysis of engineered symmetric and polydisperse Hsp16.5 assemblies reveals determinants of polydispersity and substrate binding. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 40420-40428
- Shi Y., Mosser D.D. and Morimoto R.I., (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes & Development* 12, 654-666
- Shiu R.P., Pouyssegur J. and Pastan I., (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3840-3844
- Silva J., Domínguez G., Silva J.M. et al., (2001). Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer. *Oncogene* 20, 4586-4590
- Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Iyer S. et al., (1998). Transient poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 13703–13712
- Šimůnek T., Štěrba M., Popelová O. et al., (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports* 61, 154–171
- Singal P.K., Deally C.M.R. and Weinberg L.E., (1987). Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19, 817-828
- Sirlin J.L., (1960). Cell sites of RNA and protein synthesis in the salivary gland of *Smittia* (Chironomidae). *Experimental Cell Research* 19, 177-180
- Skaper S.D., (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in acute neuronal death and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 993, 217–228
- Slater M.R. and Craig E.A., (1987). Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1906-1916
- Slater M.R. and Craig E.A., (1989). The SSA1 and SSA2 genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 17, 805-806

- Smith D.B. and Corcoran L.M., (2002). Expression and purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. In *Short Protocols in Molecular Biology: a Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 5th edition, Volume 2, Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (USA: Wiley), 16-18 — 16-21
- Solimini N.L., Luo J and Elledge S.J., (2007). Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 130, 986-988
- Sriram M., Osipuk J., Freeman B.C. et al., (1997). Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure* 5, 403-414
- Stankiewicz A.R., Lachapelle G., Foo C.P. et al., (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 38729-38739
- Sternberg N., (1973). Properties of a mutant of *Escherichia coli* defective in bacteriophage λ head formation (groE). II. The propagation of phage λ . *J. Mol. Biol.* 76, 25-44
- Sterpone S. and Cozzi R., (2010). Influence of XRCC1 genetic polymorphisms on ionizing radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids* 2010, open access article
- Stone D.E. and Craig E.A., (1990). Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1622-1632
- Strosznajder R.P., Jesko H. and Dziewulska J., (2005). Effect of carvedilol on neuronal survival and poly(ADP-ribose) polymerase activity in hippocampus after transient forebrain ischemia. *Acta Neurobiol. Exp.* 65, 137-144
- Strosznajder R. and Gajkowska B., (2006). Effect of 3-aminobenzamide on Bcl-2, Bax and AIF localization in hippocampal neurons altered by ischemia-reperfusion injury. The immunocytochemical study. *Acta Neurobiol. Exp.* 66, 15-22
- Sullivan C.S. and Pipas J.M., (2001). The virus-chaperone connection. *Virology* 287, 1-8
- Sunshine M., Feiss M., Stuart J. et al., (1977). A new host gene (groPC) necessary for lambda DNA replication. *Molec. gen. Genet.* 151, 27-34
- Szabo A., Langer T., Schröder H. et al., (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system-DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10345-10349
- Tan C., Tasaka H., Yu K.-P. et al., (1967). Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease: clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20, 333-353
- Tavaria M., Gabriele T., Anderson R.L. et al., (1995). Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics* 29, 266-268
- Tavaria M., Gabriele T., Kola I. et al., (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress & Chaperones* 1, 23-28
- Taylor R.M., Thistlethwaite A. and Caldecott K.W., (2002). Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2556-2563
- Terasawa K., Minami M. and Minami Y., (2005). Constantly updated knowledge of Hsp90. *J. Biochem.* 137, 443-447
- Thirumalai D. and Lorimer G.H., (2001). Chaperonin-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 245-269

- Thompson M.D. and Monga S.P., (2007). WNT/ β -catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 45, 1298-1305
- Thorstensen L. and Lothe R.A., (2003). The WNT signaling pathway and its role in human solid tumors. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 2, 300-331
- Tian X., Liu Z., Niu B. et al., (2011). E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, open access article
- Tilly K., McKittrick N., Zylicz M. et al., (1983). The dnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. *Cell* 34, 641-646
- Tilly K., Murialdo H. and Georgopoulos C., (1981). Identification of a second *Escherichia coli* groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1629-1633
- Tissières A., Mitchell H.K. and Tracy U.M., (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389-398
- Trautinger F., (2003). Stress proteins in the photobiology of mammalian skin. In *Handbook of Photochemistry and Photobiology, Volume 4, Photobiology*, Nalwa H.S. (Stevenson Ranch, California: American Scientific Publishers), 149-158
- Trautinger F., Kindås-Mügge I., Barlan B. et al., (1995). 72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* 105, 160-162
- Trott A. and Morano K.A., (2003). The yeast response to heat shock. In *Yeast Stress Responses, Volume 1*, Hohman S. and Mager W.H. (United States of America: Springer), 71-126
- Trouba K.J., Hamadeh H.K., Amin R.P. et al., (2002). Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 665-673
- Tyedmers J., Mogk A. and Bukau B., (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 777-788
- Ungewickell E., (1985). The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. *The EMBO Journal* 4, 3385-3391
- Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S.E.H. et al., (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378, 632-635
- van den Bosch M. and Lowndes N.F., (2004). Remodelling the Rad9 checkpoint complex. Preparing Rad53 for action. *Cell Cycle* 3, 119-122
- Vassilakos A., Cohen-Doyle M.F., Peterson P.A. et al., (1996). The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *The EMBO Journal* 15, 1495-1506
- Vaupel P., Kallinowski F. and Okunieff P., (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research* 49, 6449-6465
- Veglia F., Matullo G. and Vineis P., (2003). Bulky DNA Adducts and Risk of Cancer: A Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 157-160
- Verdine G.L. and Bruner S.D., (1997). How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome? *Chemistry & Biology* 4, 329-334
- Vicart P., Caron A., Guicheney P. et al., (1998). A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics* 20, 92-95
- Viitanen P.V., Lubben T.H., Reed J. et al., (1990). Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebiphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K⁺ dependent. *Biochemistry* 29, 5665-5671

- Virág L. and Szabó C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 54, 375–429
- Vogiatzi P. and Claudio P.P., (2010). Distinct roles of the pocket proteins in the control of cell cycle. In *Signal Transduction: Pathways, Mechanisms and Diseases*, 11th edition, Sitaramayya A. (Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag), 353-374
- Walter C.A., Lu J., Bhakta M. et al., (1994). Testis and somatic Xrcc-1 DNA repair gene expression. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 20, 451-461
- Walter S., Lorimer G.H. and Schmid F.X., (1996). A thermodynamic coupling mechanism for GroEL-mediated unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9425-9430
- Wang T.-F., Chang J. and Wang C., (1993). Identification of the peptide binding domain of hsc70. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 26049-26051
- Wang X., Goode E.L., Fredericksen Z.S. et al., (2008). Association of genetic variation in genes implicated in the β -Catenin destruction complex with risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 2101-2108
- Wang Z.-Q., Stingl L., Morrison C. et al., (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes & Development* 11, 2347–2358
- Ware F.E., Vassilakos A., Peterson P.A. et al., (1995). The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 4697-4704
- Weiss Y.G., Bromberg Z., Raj N. et al., (2007). Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of I κ B kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 35, 2128–2138
- Weissman J.S., Hohl C.M., Kovalanko O. et al., (1995). Mechanism of GroEL action: Productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* 83, 577-587
- Weissman J.S., Kashi Y., Fenton W.A. et al., (1994). GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell* 78, 693-702
- Weissman J.S., Rye H.S., Fenton W.A. et al., (1996). Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* 84, 481-490
- Welch W.J. and Feramisco J.R., (1984). Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 4501-4513
- Werner-Washburne M., Stone D.E. and Craig E.A., (1987). Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2568-2577
- White H.E., Orlova E.V., Chen S. et al., (2006). Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure* 14, 1197-1204
- Whitehouse C.J., Taylor R.M., Thistlethwaite A. et al., (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 104, 107-117
- Whitesell L. and Lindquist S.L., (2005). Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 761-772
- Widlund H.R., Horstmann M.A., Price E.R. et al., (2002). β -catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of Cell Biology* 158, 1079–1087

- Willis M.S. and Patterson C., (2010). Hold me tight: role of the heat shock protein family of chaperones in cardiac disease. *Circulation* 122, 1740-1751
- Wuiff C. and Houen G., (1996). Cation-dependent interactions of calreticulin with denatured and native proteins. *Acta Chemica Scandinavica* 50, 788-795
- Wood M.J., Irwin W.J. and Scott D.K. (1980). Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 15, 291-300
- Wu B., Hunt C. and Morimoto R., (1985). Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein Hsp70. *Mol. Cell. Biol.* 5, 330-341
- Wu B.J., Kingston R.E. and Morimoto R.I., (1986). Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 629-633
- Wu F.S., Park Y.-C., Roufa D. et al., (1981). Selective stimulation of the synthesis of an 80,000-dalton protein by calcium ionophores. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 5309-5312
- Xanthoudakis S. and Nicholson D.W., (2000). Heat-shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biology* 2, E163-E165
- Xiao A., Wong J. and Luo H., (2010). Viral interaction with molecular chaperones: role in regulating viral infection. *Arch. Virol.* 155, 1021-1031
- Xiao C., Chen S., Li J. et al., (2002). Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission. *Cell Stress & Chaperones* 7, 396-402
- Xirodimas D.P., Chisholm J., Desterro J.M. et al., (2002). p14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Letters* 528, 207-211
- Xu Z. and Sigler P. B., (1998). GroEL/GroES: Structure and function of a two-stroke folding machine. *Journal of Structural Biology* 124, 129-141
- Yaffe M.B., Farr G.W., Miklos D. et al., (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* 358, 245-248
- Yap A.S., Briehner W.M. and Gumbiner B.M., (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 119-146
- Yarbrough W.G., Bessho M., Zanation A. et al., (2002). Human tumor suppressor ARF impedes S-phase progression independent of p53. *Cancer Res.* 62, 1171-1177
- Yokota S., Yanagi H., Yura T. et al., (2000). Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *Eur. J. Biochem.* 267, 1658-1664
- Young J.C., Moarefi I. and Hartl F.U., (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* 154, 267-273
- Yu S.-W., Wang H., Poitras M.F. et al., (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263
- Zahn R., Perrett S., Stenberg G. et al., (1996). Catalysis of amide proton exchange by the molecular chaperones GroEL and SecB. *Science* 271, 642-645
- Zhong T. and Arndt K.T., (1993). The yeast SIS1 protein, a DnaJ homolog, is required for the initiation of translation. *Cell* 73, 1175-1186
- Zhou X., Tron V.A., Li G. et al., (1998). Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* 111, 194-198
- Zhou Z.-Q. and Walter C.A., (1995). Expression of the DNA repair gene XRCC1 in baboon tissues. *Mutation Research* 348, 111-116

- Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F. et al., (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614
- Zhu X.-D., Li C.-L., Lang Z.-W. et al., (2004). Significant correlation between expression level of HSP gp96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World J. Gastroenterol.* 10, 1141-1145
- Zhurinsky J., Shtutman M. and Ben-Ze'ev A., (2000). Plakoglobin and b-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *Journal of Cell Science* 113, 3127-3139
- Zimmermann R., Sagstetter M., Lewis M.J. et al., (1988). Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *The EMBO Journal* 7, 2875-2880
- Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H. et al., (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Development* 12, 2424-2433
- Zurawel R.H., Chiappa S.A., Allen C. et al., (1998). Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β -catenin mutations. *Cancer Res.* 58, 896-899
- Zweig M. and Cummings D.J., (1973). Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: Selective host involvement in the cleavage of a tail protein. *J. Mol. Biol.* 80, 505-518
- Γκίμπα-Τζιαμπίρη Ο., (1992). Η φυσιολογία του κυκλοφορικού συστήματος. Στο *Καρδιακές παθήσεις*, Τόμος 1, Τούτουζας Π. και Μπουντούλας Χ. (Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"), 68-106
- Κωλέττης Μ., (1992). Μηχανική λειτουργία της καρδιάς. Στο *Καρδιακές παθήσεις*, Τόμος 1, Τούτουζας Π. και Μπουντούλας Χ. (Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"), 107-130
- Λίμας Κ. και Λίμα Α., (1992β). Καρδιακή ανεπάρκεια-ανωμαλίες του μυοκαρδιακού κυττάρου. Στο *Καρδιακές παθήσεις*, Τόμος 1, Τούτουζας Π. και Μπουντούλας Χ. (Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"), 745-755
- Μπουντούλας Χ. και Γκελερής Π., (1992). Καρδιακή ανεπάρκεια-κλινική εικόνα. Στο *Καρδιακές παθήσεις*, Τόμος 1, Τούτουζας Π. και Μπουντούλας Χ. (Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"), 758-783
- Παπαδόπουλος Ν.Ι., (1992). Ανατομική της καρδιάς. Στο *Καρδιακές παθήσεις*, Τόμος 1, Τούτουζας Π. και Μπουντούλας Χ. (Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"), 17-65

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

7.1. Σύντομογραφίες

·OH → hydroxyl
11q23.3-q25 → genetic area 23.3 to 25 of the large arm of chromosome 11
14q22 → genetic area h;mraxx of the large arm of chromosome 14
14q22-24 → genetic area ;h to 22mex of the large arm of chromosome 14
14q24.1 → genetic area 24.1 of the large arm of chromosome 14
5' utr → 5' untranslated region
5q31.1-31.2 → genetic area 31.1 to 31.2 of the large arm of chromosome 5
6p21.3 → genetic area 21.3 of the short arm of chromosome 6
9q34 → genetic area 34 of the large arm of chromosome 9
A → adenine
ADP → adenosine diphosphate
AIF → apoptosis inducing factor
AJs → adherens junctions
AP → apurinic
APC → adenomatous polyposis coli
APE → apurinic endonuclease
APS → ammonium persulfate
AR → androgen receptor
ARF → alternative reading frame
ARH3 → ADP-ribose hydrolase 3
Asn → asparagine
Asp → aspartic acid
ATCC → American type culture collection
ATP → adenosine triphosphate
AWTd → Anterior wall thickness at end-diastole
B23 → nucleophosmin
BAG-1 → Bcl2 athanogen protein 1
BER → base excision repair
BiP → immunoglobulin binding protein
BRCA1 → breast cancer gene 1
BRCT → BRCA1 C-terminus
BSA → bovine serum albumin
C → cytosine
C. elegans → *Caenorhabditis elegans*
CaCl₂ → calcium chloride
c-cpn → cytosol chaperonin (CCT)
CCT → Chaperonin containing T-complex polypeptide 1
Cdk4 → cyclin dependent kinase 4
cDNA → complementary deoxyribonucleic acid
CHIP → Carboxyl-terminus of Hsp interacting protein
CK1 → casein kinase 1
ClpA → coactosin like protein A
ClpP → Clp protease
CO₂ → carbon dioxide
-COOH → carboxyl
cpn10 → 10 kDa chaperonin

cpn60 → 60 kDa chaperonin
 CTA → carboxy terminus of the *Saccharomyces* heat shock protein family
 D → aspartic acid
 Da → Daltons
 DAPI → 4',6-diamidino-2-phenylindole
 ddH₂O → double distilled water
 DMEM → Dulbecco's Eagles Modified Medium
 DMSO → dimethyl sulfoxide
 DNA → deoxyribonucleic acid
 DNA pol β → DNA polymerase β
 DnaJ → Bacterial homologue of Hsp40
 DnaK → Bacterial Hsp70
 DN-TCF → dominant negative T-cell factor promoter
 dNTP → deoxyrinonucleotide triphosphate
 dRP → deoxyribose phosphate
 Dsh → dishevelled
 E → glutamic acid
E. coli → *Escherichia coli*
 E1A → adenoviral oncoprotein
 E2F1 → Human transcription factor 1 member of E2f family
 EBV → Epstein-Barr virus
 ECL → enhanced chemiluminescence
 ECM → extracellular matrix
 EDTA → ethylenediaminetetraacetic acid
 EGTA → ethylene glycol tetraacetic acid
 eHsp70 → extracellular Hsp70
 EMT → endothelial to mesenchymal transition
 F1/F1 → wild type mice
 F1/Tg → heterozygous mice
 FAP → familial adenomatous polyposis
 Fas → stress receptor of the TNF family, also known as CD95
 FBS → foetal bovine serum
 FISH → fluorescence *in situ* hybridization
 FITC → fluorescein isothiocyanate
 FOXO → forkhead box transcriptional protein
 Fz → frizzled
 G → Guanine
 GAPDH → Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
 GGR → global gene repair
 Glu → glutamine
 Gram- → bacteria that do not retain crystal violet stain due to thick bacterial wall
 GroE → chaperonin protein of *E. coli*
 GroEL → chaperonin 60 heat-shock protein from *E. coli* affecting head morphogenesis of λ phage
 GroES → co-chaperone of GroEL with the same function
 groPC756 → *E. coli* DnaK
 Grp75 → 75 kDa glucose regulated protein
 Grp78 → 78 kDa glucose regulated protein
 Grp94 → 94 kDa glucose regulated protein
 GrpE → *E. coli* glucose regulated protein

GSK3 β → glycogen synthase kinase 3 beta
GST → glutathione S-transferase
H → histidine
H₂O₂ → hydrogen peroxide
HBV → hepatitis B virus
Hdj-1 → Mammalian DnaJ
HeLa → mammary cancer cells derived from Henrietta Lacks
Hip → Hsc70 interacting protein
His → histidine
HLA → human leucocyte antigen
hOGG1 → human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1
Hop → Hsp70/90 organising protein
HRP → horseradish peroxidase
hr → hours
Hsc70 → 70 kDa heat shock cognate
HSE → heat shock element
Hsf-1 → heat shock factor 1
Hsf1p → yeast heat shock factor 1
Hsp104 → 104 kDa heat shock protein
Hsp25 → 25 kDa heat shock protein
Hsp33 → 33 kDa heat shock protein
Hsp40 → 40 kDa heat shock protein
Hsp47 → 47 kDa heat shock protein
Hsp58 → 58 kDa heat shock protein
Hsp60 → 60 kDa heat shock protein
Hsp70 → 70 kDa heat shock protein
Hsp70-1 → Hsp70
hsp70-1a → Hsp70
hsp70-1b → intronless human Hsp70
hsp70-11 → 70 kDa heat shock like protein
hsp70-2 → Hsp70-1b
hsp70-2a → Hsp70 isotype
hsp70-2b → Hsp70 isotype
hsp70-3 → *Ratus norvegicus* Hsp70-like protein
hsp70-4 → Hsp70 isotype
hsp70-5 → Grp78
hsp70-6 → Hsp70 isotype
hsp70-7 → Hsp70 isotype
hsp70B → Hsp70 isotype
hsp70B' → Hsp70 isotype
hsp70-Hom → hsp70-11
Hsp70i → Hsp70
HSP70RY → Hsp70 isotype
Hsp70s → 70 kDa heat shock protein family
Hsp72 → Hsp70
Hsp73 → Hsc70
Hsp90 → 90 kDa heat shock protein
Hsp90s → 90kDa heat shock protein family
HSPA → Hsp70 old name
HSPA1A → Hsp70

HSPA1B → Hsp70-1b
HSPA1L → hsp70-11
HSPA2 → hsp70-2b
HSPA4 → Hsp70 isotype
HSPA5 → hsp70-5
HSPA6 → hsp70-6
HSPA7 → hsp70-7
HSPA8 → Hsc70
Hsps → heat shock protein family
hsx70 → Hsp70
IgG → immunoglobulin G
INK4A → cyclin dependent kinase inhibitor
IP → immunofluorescence
iPS → induced pluripotent stemm cells
IPTG → isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K → lysine
KAc → potassium acetate
Kar2 → karyogamy gene 2
Kar2p → protein of the karyogamy gene 2
kb → kilobases
KCl → potassium chloride
kDa → kilodaltons
KH₂PO₄ → monopotassium phosphate
L → leucine
L.M.P. → low melting point
LapA → large adhesion protein A
LB → luria broth
LEF-1 → lymphoid enhancer-binding factor 1
LEF-3 → lymphoid enhancer-binding factor 3
LEF-4 → lymphoid enhancer-binding factor 4
Leu → leucine
LIG3 → DNA ligase III a gene
Lig3a → DNA ligase III a
LRP → low density lipoprotein receptor-related protein
LVDD → left ventricular diameter at end-diastole
LVDs → left ventricular diameter at end-systole
Lys → lysine
mA → milliamperes
Mdj1p → Yeast Dj-1 protein homologue
Mdm2 → Murine double minute 2 protein
MEFs → mouse embryonic fibroblasts
MET → methionine
mg → milligram
Mg²⁺ → magnesium
MgCl₂ → magnesium chloride
MgSO₄ → magnesium sulfate
MHC class I → major histocompatibility complex class I
MHC class II → major histocompatibility complex class II
mHsp70 → mitochondrial Hsp70
min → minute

mito-Hsp70 → mHsp70
ml → millilitre
mM → millimolar
M-MLV → moloney murine leukaemia virus
mRNA → messenger RNA
Na₂HPO₄ → sodium phosphate dibasic
NaAC → sodium acetate
NaCl → sodium chloride
NAD⁺ → nicotinamide adenine dinucleotide
NaHCO₃ → sodium bicarbonate
NaOH → sodium hydroxide
NCA → nucleolar comet assay
NER → nucleotide excision repair
ng → nanogram
-NH₂ → amine
NLS → nuclear localization signal
nm → nanometres
Nm23 → nucleoside diphosphate kinase
NoLS → nucleolar localization signal
NPM → B23
NTA → N-terminal area
NTD → N-terminal domain
OGG1 → 8-oxoguanine glycosylase
oriC → origin of replication
p14^{ARF} → alternate reading frame product of the CDKN2A locus
p16 → cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
PAGE → polyacrilamide gel electrophoresis
PAHs → polycyclic aromatic hydrocarbons
PapD → bacterial immunoglobulin-like chaperone
PAR → poly-ADP ribosylation
PARG → poly (ADP-ribose) glycohydrolase
PARP-1 → poly (ADP-ribose) polymerase 1
PARP-2 → poly (ADP-ribose) polymerase 2
PARP-3 → poly (ADP-ribose) polymerase 3
PARPs → poly (ADP-ribose) polymerase family
PBD → peptide binding domain
PBS → phosphate buffered saline
PCR → polymerase chain reaction
pH → measure of the activity of the (solvated) hydrogen ion
PI → propidium iodide
PIPES → 1,4-piperazinediethanesulfonic acid
PKA → protein kinase A
PMSF → phenylmethanesulfonyl fluoride
PMT → photo multiplier tube (confocal microscopy)
PNK → polynucleotide kinase
pol β → polymerase β
PVDF → polyvinylidene fluoride
PWTd → posterior wall thickness at end-diastole
Rad9 → DNA yeast checkpoint complex
Raf → serine/threonine specific kinase

RAP → receptor-associated protein
Rb → retinoblastoma
RIPA → radioimmunoprecipitation buffer
RNA → ribonucleic acid
RNAi → RNA interference
RNP → ribonucleoprotein
ROS → reactive oxygen species
rpm → revolutions per minute
RPMI → Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR → reverse transcriptase PCR
Rubisco → Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase
s. → species
S.cerevisiae → *Saccharomyces cerevisiae*
SCLC → small-cell lung carcinoma
SDS → sodium dodecyl sulfate
sec → seconds
Sec63 → secretion protein 63
Ser → serine
shRNA → small-hairpin RNA
siRNA → small interfering RNA
Sis1 → Yeast initiation of translation protein 1
smARF → short mitochondrial ARF
Src → non-receptor tyrosine kinase
Ssa → Yeast Hsp70 homologue
ssa1 → Yeast heat shock protein gene 1
Ssa1p → stress-seventy subfamily A protein 1
Ssa2p → stress-seventy subfamily A protein 2
Ssa3p → stress-seventy subfamily A protein 3
Ssa4p → stress-seventy subfamily A protein 4
Ssas → stress-seventy subfamily A protein family
Ssb → single-strand binding protein
SSBR → single-strand break repair
STREs → stress response elements
SV40 → simian virus 40
T → thymine
TBE → Tris/Borate/EDTA
TBS → tris buffered saline
TCA → trichloroacetic acid
TCF → T-cell transcription factor
TCF-1 → T-cell factor 1
TCP1 → T-complex protein 1
TE → tris-EDTA
TEMED → tetramethylethylenediamine
TF55 → thermophilic factor 55
TF55/56 → Thermophilic factor 55/56
Tg/Tg → homozygous transgenic mice
Thr → threonine
TNF → tumor necrosis factor
TPR → tetratricopeptide repeat
TPR2 → tetratricopeptide repeat domain 2

TriC → CCT
TRITC → Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
U → units
UDP → uridine diphosphate
UPRE → unfolded protein response element
UV → ultra violet
V → volts
v/v → volume/volume
w/v → weight/volume
Wnt → wingless
wt-TCF → wild type T-cell factor
XRCC1 → X-ray cross-complementing group 1 protein
YAC → yeast artificial chromosome
Ydj1 → yeast DnaJ gene
Ydj1p → yeast DnaJ protein
YG100 → former Ssa1
YG102 → former Ssa2
 β -NAD⁺ → β -nicotinamide adenine dinucleotide
 β -TrCP → β -transducin repeats-containing protein
 μ g → microgram
 μ l → microlitre
 μ M → micromolar
 σ 32 → *E. coli* transcription factor sigma 32