

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265202





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΠΥΡΟΣ ΓΕΩΡΓΑΤΟΣ**  
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ**

*“Hsp 70 νανομηχανές και γονιδιακή αποσιώπηση”*

**ΚΟΤΟΓΛΟΥ Χ. ΠΟΛΥΧΡΟΝΗΣ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Κοτόγλου Πολυχρόνη: 3-4-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 529<sup>α</sup>/23-3-2004

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Αγγελίδης Χαράλαμπος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 529<sup>α</sup>/23-3-2004

«*Hsp 70* νανομηχανές και γονιδιακή αποσιώμηση»

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 619<sup>α</sup>/30-10-2007

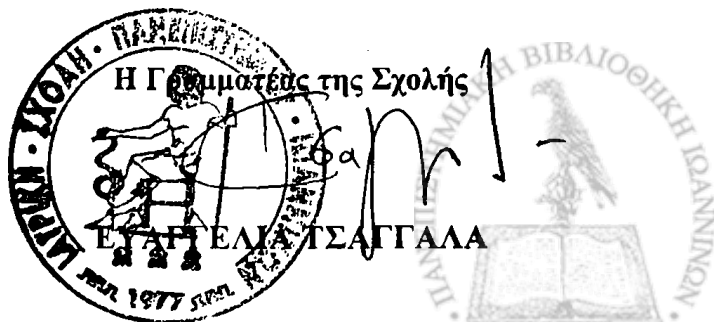
Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία - Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λαζαρίδης Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-12-2007

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



*Στον πατέρα μου Χρήστο*

*Ήμουν τόσο τυχερός  
που σε είχα πατέρα και  
πρωταγωνιστή στη ζωή μου  
αλλά και τόσο άτυχος  
που σε έχασα νωρίς και άδικα!*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας, κ. Αγγελίδη Χαράλαμπου και συνχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων (Πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ, 08-02-01) μέσα στα πλαίσια του 3<sup>ου</sup> πλαισίου στήριξης καθώς επίσης και μερικώς από το ΕΜΠΕΙΡΙΚΙΟ ΙΔΡΥΜΑ (11-07-2000).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αγγελίδη Χαράλαμπο, ο οποίος μου εμπιστεύθηκε το θέμα της παρούσας διατριβής δίνοντάς μου την ευκαιρία να εργαστώ στον εργαστηριακό του χώρο και καθοδηγώντας με όλο αυτό το χρονικό διάστημα με τις πολύτιμες συμβουλές και τις πρωτοποριακές ιδέες του, ώστε να φέρω εις πέρας την εργασία. Επιπλέον, με μύησε στο θεωρητικό υπόβαθρο της εργασίας και μου υπέδειξε τον σωστό τρόπο εργασίας, επιστημονικής σκέψης και συγγραφής, όσον αφορά την ακόλουθη εργασία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις που μου κατάδειξαν με αποτέλεσμα την ακόμη καλύτερη και αρτιότερη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές αλλά και τα μέλη ΔΕΠ, με τους οποίους συνεργαστήκαμε καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και οι οποίοι συνεισφέρανε σε μέγιστο βαθμό όσον αφορά την εκμάθηση της χρήσης του απαραίτητου εργαστηριακού εξοπλισμού καθώς και την επίλυση αποριών μου που ανέκυψαν σχετικά με προβλήματα που αντιμετώπισα στην πορεία των πειραματικών διαδικασιών.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω από τα βάθη της καρδιάς μου στην οικογένειά μου και τους κοντινούς μου φίλους για την πολυτιμότερη βοήθειά τους και προπαντός για την ψυχολογική υποστήριξή τους ειδικά το τελευταίο αυτό χρονικό διάστημα.



# 1. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



	<b>Σελίδα</b>
<b>1. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	1
<b>2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	9
2.1. ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (HEAT SHOCK RESPONSE)	11
2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ	11
2.3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ	13
2.3.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΥΝΟΔΩΝ ΚΑΙ ΟΜΟΣΥΝΟΔΩΝ	18
Α. ΜΙΚΡΕΣ HEAT-SHOCK ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ α-ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΝΗ.	18
Β. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP40	18
Γ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP60	22
Δ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP70	22
Ε. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP90	22
ΣΤ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP100	23
Ζ. ΚΑΛΝΕΞΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗ	23
Η. ΠΕΠΤΙΔΥΛΟ-ΠΡΟΛΥΛΟ-ΙΣΟΜΕΡΑΣΗ (PPI) / ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (TF)	23
Θ. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΗ ΙΣΟΜΕΡΑΣΗ	24
Ι. ΟΜΟΣΥΝΟΔΟΙ ΤΗΣ HSP70	24
ΙΑ. ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ	24
2.3.2. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ 70kDa (Hsp70)	24
2.3.2.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ Hsp70 ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	25
1. Hsp70-1a και η Hsp70-1b	27
2. Hsp70-1t	31
3. Hsp70-2	31
4. Hsp70-5, Bip, Grp78	32
5. Hsp70-6	33
6. Hsp70-8, Hsc70	33
7. Hsp70-9	34
2.4. ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ DNA	35





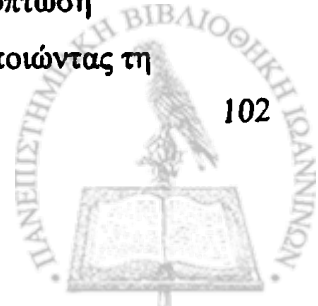
2.4.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ DNA ΜΕΣΩ ΑΠΟΚΟΠΗΣ ΒΑΣΕΩΝ (BER-SSBR)	37
2.4.1.1. PARP-1	38
Α. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ PARP-1 ΩΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA	38
Β. PARP-1 ΚΑΙ ΓΕΝΟΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	41
Γ. Η PARP-1 ΩΣ ΜΑΣΟΛΑΒΗΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ	43
2.4.1.2. XRCC1	44
2.5. ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	49
3.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	51
3.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	53
3.1.1. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας	53
3.1.2. Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας	53
α) Θρεπτικά υλικά	53
β) Διάλυμα έκπλυσης (PBS)	54
γ) Ορός, FCS	54
δ) Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Trypsin/EDTA)	54
3.1.3. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	54
3.1.4. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων	55
3.2. Λύση κυττάρων-Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών	55
3.3. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών (Bio-Rad protein assay)	56
3.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	56
3.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)	57
3.6. Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation)	59
3.7. Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (Immunofluorescence)	60
3.8. Απονόμωση πυρήνων-πυρηνίσκων από κύτταρα	61
3.9. Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων πυρήνων-πυρηνίσκων σε πηκτή αγαρόζης (Comet Assay in nucleus-nucleolus, NCA)	62
3.10. DNA fragmentation (laddering) of nucleus-nucleolus	63
3.11. Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA (PARIS kit, AMBION)	64
3.12. Καθαρισμός RNA με DNAση.	65
3.13. RT-PCR	65



3.14. Διαδικασία δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων BL21/ED	66
3.15. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων (Transformation)	67
3.16. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Plasmid Mini-Preparation DNA).	67
3.17. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη σε μικρή κλίμακα	68
3.18. Εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες σε μικρή κλίμακα υπό αποδιατακτικές συνθήκες.	69
3.19. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη σε μεγάλη κλίμακα	70
3.20. Εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες σε μεγάλη κλίμακα υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.	70
3.21. Καθαρισμός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από μικρά μόρια μέσω διαπίδυσης (Dialysis).	72
3.22. Συγκατακρήμνιση καθαρών πρωτεϊνών <i>in vitro</i> (Pull down of GST fusion proteins)	72
3.23. Καθαρισμός His χημικών πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας	74
3.24. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα με το σύστημα του βακουλοϊού	75
3.24.1. Δημιουργία και απομόνωση ανασυνδυασμένων βακεμιδίων.	75
3.24.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	76
3.24.3. Δημιουργία ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών	77
3.24.4. Τιτλοποίηση αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου (H42Q SV40) ιού SV40 (plaque assay).	77
3.24.5. Παραγωγή πρωτεϊνών από διαμολυσμένα με βακοιλλοϊό ευκαρυωτικά κύτταρα.	78
3.24.6. Καθαρισμός πρωτεϊνών από διαμολυσμένα με βακιλλοϊό ευκαρυωτικά κύτταρα με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας.	79
3.25. Κυτταρομετρία ροής	80
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	81
4.1. Επιλογή κυτταρικών κλώνων γονιδιακής αποσιώπησης με τεχνολογία siRNA για τις πρωτεΐνες Hsp70 (A) και Hsp40 (B).	83
4.2. Ανάλυση με ανοσοφθορισμό των κλώνων HeLa-siRNA-Hsp70 και	



HeLa-siRNA-Hsp40 για τον έλεγχο της παραγωγής και κατανομής των πρωτεϊνών Hsp70 (A) και Hsp40 (B) κάτω από φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ.	84
4.3. Ανάλυση με RT-PCR των επιπέδων κυτταροπλασματικού RNA της Hsp70 στον κυτταρικό κλώνο HeLa-siRNA-Hsp70 κάτω από φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ.	85
4.4. Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει την παραγωγή των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsc70;.	87
4.5. Η απουσία της Hsp70 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp40 κατά τη διάρκεια της επαναφοράς των κυττάρων στους 37° C μετά από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ.	88
4.6. Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει αρνητικά τη ρύθμιση της Hsp70 κατά τη διάρκεια της επαναφοράς των κυττάρων στους 37° C μετά από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ.	89
4.7. Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp70 στο επίπεδο της μεταγραφής ή της ωρίμανσης του RNA κατά την επαναφορά των κυττάρων από το θερμικό σοκ. Η ανάλυση έγινε με RT-PCR.	91
4.8. Η αρνητική ρύθμιση της Hsp70 μέσω siRNA τεχνολογίας δεν ανατρέπεται από άλλους επαγωγείς όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	92
4.9. Η απουσία της Hsp70 προκαλεί θερμοευαισθησία στα κύτταρα HeLa	93
4.10. Η απουσία της Hsp40 προκαλεί θερμοευαισθησία στα κύτταρα HeLa	94
4.11. Η απουσία της Hsp70 μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων. Ανάλυση με βάση την ικανότητα των κυττάρων στη δημιουργία αποικιών (A) αλλά και στον πολ/σμό και την επιβίωσή τους με τη χρήση WST-1 (B)	95
4.12. Η απουσία της Hsp40 μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων. Ανάλυση με βάση την ικανότητα των κυττάρων στη δημιουργία αποικιών (A) αλλά και στον πολ/σμό και την επιβίωσή τους με τη χρήση WST-1 (B)	97
4.13. Τα κύτταρα που δεν παράγουν Hsp70 (A) ή Hsp40 (B) είναι περισσότερο αποπτωτικά συγκρινόμενα με τα πατρικά τα οποία παράγουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες κάτω από συνθήκες ισχυρού θερμικού σοκ	98
4.14. Η απουσία της Hsp70 προκαλεί αύξηση της απόπτωσης στο κεραμίδιο	100
4.15. Η απουσία της Hsp40 προκαλεί αύξηση της απόπτωσης στο κεραμίδιο	101
4.16. Η αρνητική ρύθμιση της Hsp70 σε κύτταρα HeLa, ενισχύει την απόπτωση των κυττάρων, όπως αωιχωεύεται σε κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τη χρωστική Hoechst 33342.	102



4.17. Η διάσπαση του πυρηνίσκου λόγω θερμικού σοκ στα κύτταρα HeLa και HeLa siRNA-Hsp70.	104
4.18. Μελέτες ανοσοφθορισμού με συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal) για τον εντοπισμό PARP1, XRCC1 και Hsp70 στα κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 κατά τη διάρκεια φυσιολογικών συνθηκών αλλά και συνθηκών θερμικού σοκ.	107
4.19. Η Hsp70 δεσμεύεται στην PARP-1 και την XRCC1 και ίσως να διευκολύνει τα κύτταρα HeLa στην αντιμετώπιση των βλαβών του DNA.	110
4.20. Η Hsp70 συνδέεται στην περιοχή BRCT της PARP-1.	112
4.21. Η Hsp70 συνδέεται στην PARP-1 μέσω της ATPase περιοχής της.	115
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	119
<b>6. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ</b>	127
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	129
ABSTRACT	131
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	133



## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 2.1. ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ (HEAT SHOCK RESPONSE)

Η επαγωγή απόκρισης σε θερμικό σοκ παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1962 από τον Rittosa F., όταν λάρβες της μύγας *Drosophila melanogaster* αφέθηκαν τυχαία σε ανυψωμένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη μέρα, τα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων των λαρβών εμφάνισαν μία διογκωμένη διάταξη (puffing pattern), υποδεικνύοντας ότι η ανυψωμένη θερμοκρασία προκάλεσε δραματικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην ανακάλυψη των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs), μία εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα πρωτεϊνών που επάγονται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε στρεσογόνους παράγοντες.

Απόκριση θερμικού σοκ (Heat shock response) ονομάζεται η αλλαγή στην κατάσταση ή ενεργότητα ενός κυττάρου ή ενός οργανισμού ως αποτέλεσμα ενός ξαφνικού θερμικού εξωτερικού ερεθίσματος, με θερμοκρασία υπεράνω της φυσιολογικής του οργανισμού ή του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζονται πολλές λειτουργίες μεταξύ των οποίων, η κίνηση, η έκκριση, η παραγωγή ενζύμων, η γονιδιακή έκφραση και πολλές άλλες. Τι βλάβες μπορεί να υποστεί ο οργανισμός ή το κύτταρο από την ξαφνική και υψηλή θερμοκρασία είναι υπό μελέτη. Μέχρι σήμερα αυτό που γνωρίζουμε είναι το ότι μεταξύ αυτών των γονιδίων που επηρεάζονται είναι και τα γονίδια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins: HSPs) για τις οποίες είναι αποδεκτό πλέον το ότι λειτουργούν κυρίως προς την κατεύθυνση της ποιότητας των πρωτεϊνών αφού οι λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν είναι:

- Αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών
- Επαναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών
- Προστασία των πρωτεϊνών κατά την διάρκεια του στρες
- Ενδοκυτταρική κυκλοφορία των πρωτεϊνών
- Συμμετοχή στον καταβολισμό λανθασμένων πρωτεϊνών

## 2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ

Ο όρος πρωτεϊνική αναδίπλωση (protein folding) αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ένα πολυπεπίδιο μετατρέπεται από μία γραμμική αλληλουχία αμινοξέων σε μία



τρισδιάστατη δομή η οποία και αποτελεί τη λειτουργική πρωτεΐνη. Ο όρος αυτός συμπεριλαμβάνει και την έννοια της επαναδίπλωσης (refolding), η οποία αναφέρεται σε πρωτεΐνες που έχουν χάσει τη φυσική διαμόρφωσή τους λόγω μετουσίωσης (π.χ. μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε χημικούς παράγοντες) ή λόγω τροποποιήσεων που μπορεί να υφίστανται κατά τη διάρκεια μεταφοράς στο στόχο τους (translocation) και οι οποίες θα πρέπει να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση. Η κατανόηση της πορείας που ακολουθεί μία πρωτεΐνη προς την πλήρη αναδίπλωσή της καθώς και η περιγραφή των μηχανισμών και των παραγόντων που συμμετέχουν σε αυτήν αποτελούν ένα από τα βασικότερα πεδία της σύγχρονης Βιολογίας με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Η στερεοχημική πληροφορία που είναι απαραίτητη για τις νεοσυντιθέμενες πρωτεϊνικές αλυσίδες ώστε να αναδιπλωθούν σωστά μέσα στα κύτταρα, βρίσκεται αποκλειστικά στην πρωτοταγή δομή του αρχικού μεταφραστικού προϊόντος, αρχή που θεμελιώθηκε από τον Anfinsen το 1973 και επιβεβαιώθηκε τα επόμενα χρόνια (Anfinsen JR., 1973, Ellis R.J. and Hartl F.U., 1999). Δηλαδή, μία νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη ή μία πρωτεΐνη που έχει αποδιαταχθεί λόγω ύπαρξης κάποιου μετουσιωτικού παράγοντα κατέχει όλη την απαιτούμενη πληροφορία ώστε να αναδιπλωθεί αυθόρμητα *in vitro* και να υιοθετήσει μία φυσική τρισδιάστατη δομή, μετά την απομάκρυνση του αποδιατακτικού παράγοντα (Rose GD, et al., 2006). Κατά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης τα υδροφοβικά της κατάλοιπα εγκλείονται στο εσωτερικό του μορίου δημιουργώντας έναν υδροφοβικό πυρήνα, ενώ στο εξωτερικό μένουν εκτεθειμένα τα υδροφιλικά κατάλοιπα, σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον (Ellis R.J., 2004).

Το φαινόμενο της αυθόρμητης αναδίπλωσης-επαναδίπλωσης *in vitro* παρατηρήθηκε σε πειράματα επαναδίπλωσης με τη χρήση διαλύματος αναδίπλωσης που περιέχει μόνο την καθαρή πρωτεΐνη και διαθέτει τις καλύτερες δυνατές συνθήκες (δηλαδή χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και χαμηλές θερμοκρασίες, συνθήκες που δεν ευνοούν τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις). Όμως, *in vivo*, στο εσωτερικό του κυττάρου, μία νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη έρχεται αντιμέτωπη με αρκετούς κινδύνους. Καθώς η πολυπεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνεται, μπορεί να αναδιπλωθεί λανθασμένα πριν ολοκληρωθεί η σύνθεσή της, να αποδομηθεί, καθώς δεν είναι πλήρως αναδιπλωμένη και είναι επιδεκτική σε πρωτεάσες, ή να συμπλεγματοποιηθεί με παρόμοιες γειτονικές αλυσίδες (Ellis RJ and Hartl F.U., 1999).



Η συμπλεγματοποίηση (*aggregation*) προκύπτει επειδή κάποιες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται και ξεδιπλώνονται μέσω ενδιάμεσων που εκθέτουν παροδικά στις επιφάνειές τους υδροφοβικά κατάλοιπα, τα οποία φυσιολογικά είναι προστατευμένα στο εσωτερικό του μορίου. Σε υδάτινα περιβάλλοντα, όπως είναι και το εσωτερικό των κυττάρων, τέτοιες υδροφοβικές περιοχές από διαφορετικά μόρια τείνουν να δεσμοποιούνται με αποτέλεσμα το σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Δηλαδή, κατά τη σταδιακή σύνθεση της αλυσίδας από ένα ριβόσωμα ή κατά τη διάρκεια του ξεδιπλώματος ώριμων πρωτεϊνών λόγω στρες, οι παροδικά εκτεθειμένες υδροφοβικές περιοχές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αντίστοιχες των γειτονικών αλυσίδων σχηματίζοντας μη λειτουργικά συμπλέγματα (Ellis RJ, 2000). Τα συμπλέγματα αυτά εμφανίζονται ως άμορφες δομές, όπως σώματα εγκλεισμού και κοκκία θερμικού σοκ, ή ως διατεταγμένες ίνες, όπως αμυλοειδείς πλάκες και σωμάτια μολυσματικών πρωτεϊνών (*prions*). Επιπροσθέτως στην απώλεια της λειτουργίας και στην κυτταρική επιβάρυνση, τα συσσωματώματα είναι γενικά πιο υδροφοβικά, και μπορούν να βλάψουν τη λειτουργία των μεμβρανών, όπως στην περίπτωση των νευροεκφυλιστικών αμυλοειδών πλακών (Ben-Zvi A. and Goloubinoff P., 2001).

Η μεγάλη συγκέντρωση μακρομορίων, δηλαδή ο μακρομοριακός συνωστισμός (*macromolecular crowding*), στο εσωτερικό των κυττάρων κάνει το φαινόμενο της συμπλεγματοποίησης πολύ έντονο. Για παράδειγμα, στο κύτταρο του *E.coli*, η συγκέντρωση πρωτεϊνών και RNA αγγίζει τα 340mg/ml. Η θεωρία του συνωστισμού προβλέπει ότι τέτοιες συγκεντρώσεις αυξάνουν τις σταθερές σύνδεσης των μακρομορίων από  $10^2$  σε  $10^3$  (Ellis R.J. and Ulrich H., 1999). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνικών επιφανειών μέσα στα κύτταρα γενούν την ανάγκη για την ύπαρξη μηχανισμών που θα αποτρέπουν τις λάθος αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε υδροφοβικές επιφάνειες. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η ύπαρξη πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν και δεσμεύονται μεταβατικά σε αυτές τις επιφάνειες και έτσι παρεμποδίζουν την πρόιμη ή ακατάλληλη αλληλεπίδραση. Αυτές οι πρωτεΐνες καλούνται μοριακοί συνοδοί (*molecular chaperones*) (Ellis R.J. and Ulrich H., 1996).

### 2.3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ

Ο όρος "μοριακός συνοδός" χρησιμοποιήθηκε αρχικά, για την περιγραφή της λειτουργίας της νουκλεοπλασμίνης, μίας πυρηνικής πρωτεΐνης που διευκολύνει τη



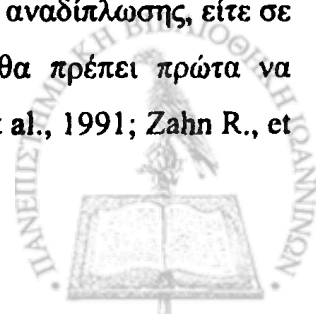


συγκρότηση της χρωματίνης, παρεμποδίζοντας ανορθόδοξες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών και του DNA (Laskey R.A., et al., 1978). Στη συνέχεια ο όρος γενικεύτηκε περιλαμβάνοντας ένα μεγάλο σύνολο ετερόλογων αλλά λειτουργικά συσχετιζόμενων πρωτεϊνών (πίνακας 1) οι οποίες υποβοηθούν την πρωτεϊνική αναδίπλωση και τη συγκρότηση άλλων πρωτεϊνών του κυττάρου (Ellis J., 1987). Προκειμένου μία πρωτεΐνη να χαρακτηριστεί ως μοριακός συνοδός, θα πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια:

α) Δέσμευση σε πρωτεΐνες που εκθέτουν στην επιφάνειά τους υδρόφοβα αμινοξέα. Η βασική ιδιότητα κάθε μοριακού συνοδού είναι η ικανότητά του να αναγνωρίζει και να δεσμεύει μετουσιωμένα ή μερικώς αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια (εικ.1Α). Κατά τα πρώιμα στάδια της *de novo* αναδίπλωσης ή όταν συμβεί λανθασμένη αναδίπλωση, υδρόφοβα αμινοξέα που κανονικά βρίσκονται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών, εκτίθενται στην επιφάνεια αυτών, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να έχουν τάση να συσσωματωθούν (εικ.1Ε) (Flynn G.C., et al., 1991; Landry S.J., et al., 1992). Η πιθανότητα της συσσωμάτωσης μειώνεται σημαντικά καθώς οι μοριακοί συνοδοί συνδέονται με τις υδρόφοβες αυτές περιοχές αποτρέποντας τέτοιου είδους ενδοπεπτιδικών και διαπεπτιδικών αλληλεπιδράσεων (Hartl F.U., et al., 1992).

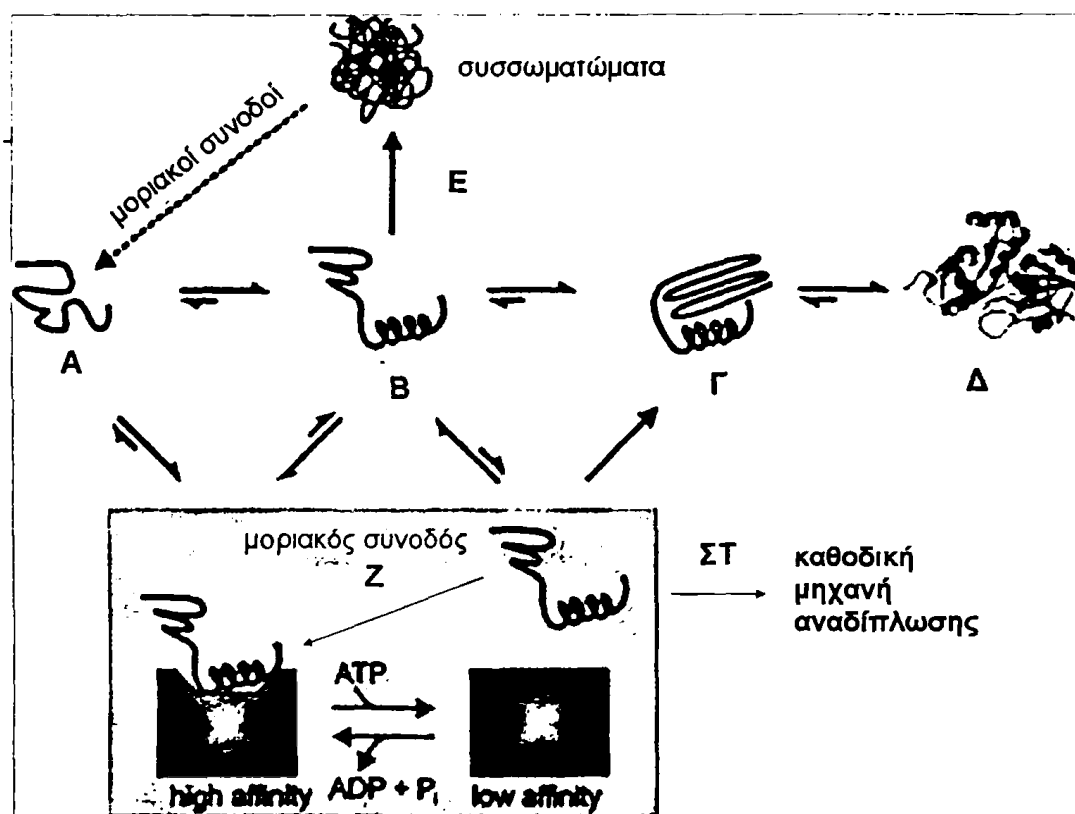
β) Ελεγχόμενη απελευθέρωση των προσδεδεμένων πολυπεπτιδίων. Η ικανότητα αυτή των μοριακών συνοδών, οφείλεται στη δυνατότητα που έχουν να κινούνται μεταξύ δύο εναλλακτικών καταστάσεων, μίας που έχει υψηλή συγγένεια για το υποστρώμα και μίας που έχει χαμηλή συγγένεια για αυτό. Η μετάβαση από την πρώτη στη δεύτερη κατάσταση, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του υποστρώματος και επιτυγχάνεται με κατανάλωση ενέργειας που προέρχεται από την υδρόλυση ATP (Palleros D.R., et al., 1993). Η δράση ενός μοριακού συνοδού προϋποθέτει την κυκλική εναλλαγή των δύο αυτών καταστάσεων του, με επαγόμενο αποτέλεσμα τη διαδοχική και αυστηρά ρυθμιζόμενη δέσμευση και αποδέσμευση του μετουσιωμένου υποστρώματος (εικ.1Ζ), μέχρι αυτό να αναδιπλωθεί (εικ.1Δ) ή να μεταφερθεί σε ένα άλλο συνοδό (εικ.1ΣΤ) (Szabo A., et al., 1994; Buchberger A., et al., 1996).

γ) Επαγωγή αλλαγών στη δομή των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Οι μοριακοί συνοδοί, κατά τη διάρκεια αυτών των διαδοχικών κύκλων δέσμευσης-αποδέσμευσης του υποστρώματος, επάγουν αλλαγές στη διαμόρφωσή του. Παράδειγμα αυτής της δράσης τους, αποτελεί το ελεγχόμενο ξεδίπλωμα (unfolding) πολυπεπτιδίων, τα οποία έχουν εγκλωβιστεί είτε σε ενδιάμεσες μη παραγωγικές μορφές (εικ.1Β, 1Γ) κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης, είτε σε συσσωματώματα μετά την πλήρη μετουσίωσή τους και τα οποία θα πρέπει πρώτα να ξεδιπλωθούν πριν επιχειρηθεί πάλι η αναδίπλωσή τους (Hubbard T.J., et al., 1991; Zahn R., et



al., 1994; Goloubinoff P., et al., 1999). Εδώ θα πρέπει να τονιστεί, ότι οι μοριακοί συνοδοί δε φέρουν καμία ειδική ή συμπληρωματική πληροφορία για την αναδίπλωση του υποστρώματος, παρά μόνο διευκολύνουν την υλοποίηση της πληροφορίας που περιλαμβάνεται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης-στόχου.

Για το λόγο αυτό, οι μοριακοί συνοδοί θα πρέπει να διακριθούν από τις πρωτεΐνες εκείνες που καλούνται "καταλύτες της αναδίπλωσης" (folding catalysts), όπως οι πεπτιδυλ-προλυλο-ισομεράσες (PPIases) και οι δισουλφιδο-ισομεράσες των πρωτεϊνών (PDIs), και οι οποίες προωθούν αποφασιστικά τη διαδικασία της αναδίπλωσης με την cis/trans ισομερίωση των καταλοίπων προλίνης (Schmid F.X., et al., 1993) και την ανακατάταξη των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες (Freedman R.B., et al., 1994) αντίστοιχα.

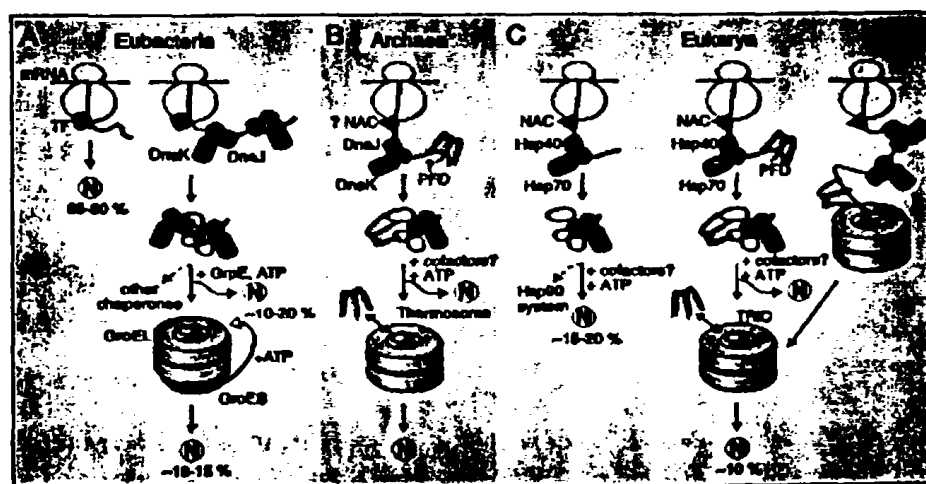


**Εικ. 1:** Πρωτεϊνική αναδίπλωση υποβοηθούμενη από μοριακούς συνοδούς. Τόσο η βιοσύνθεση πρωτεϊνών όσο και το κυτταρικό στρες μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία πολυπεπτιδίων τα οποία έχουν χάσει ή δεν έχουν χάσει την τριτοταγή τους διαμόρφωση (Α). Τα μόρια αυτά θα πρέπει να αναδιπλωθούν μέσω διαφόρων ενδιάμεσων μορφών (Β, Γ), μέχρις ότου φθάσουν τη φυσική και ταυτόχρονα λειτουργική τους διαμόρφωση (Δ). Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές, είναι δυνατό να εκθέτουν στην επιφάνειά τους υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία και τις καθιστούν ευαίσθητες στη συσσωμάτωση (Ε). Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με τις επιφάνειες αυτές και παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα, αναδεικνύουν τη δυνατότητα κάποιων μοριακών συνοδών να επαναδιαλυτοποιούν πρωτεΐνες που είναι εγκλωβισμένες στα συσσωματώματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μία ATP-εξαρτώμενη αλλαγή στη διαμόρφωση του



μοριακού συνοδού, σηματοδοτεί την αποδέσμευση του πολυπεπτιδίου, το οποίο βρίσκεται υπό αναδίπλωση. Κάποια από τα μόρια που αποδεσμεύονται, είναι σε θέση να καταλάβουν την ορθή τους διαμόρφωση χωρίς επιπλέον βοήθεια από τους μοριακούς συνοδούς, κάποια άλλα μεταφέρονται σε άλλη μηχανή αναδίπλωσης (ΣΤ), ενώ τέλος, τα υπολοίπωντα επαναδεσμεύονται στον ίδιο μοριακό συνοδό και συμμετέχουν σε ένα νέο κύκλο αναδίπλωσης (Ζ). (Με τροποποιήσεις, από Walter S. και Buchner J., 2002, *Angrew. Chem. Int. Ed.* 41,1101)

Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των μοριακών συνοδών, είναι υψηλά συντηρημένες, με ευρεία κατανομή από τα βακτήρια έως τα κύτταρα των θηλαστικών (εικ. 2). Ένα μεγάλο μέρος από αυτές αποτελούν οι πρωτεΐνες του στρες (stress proteins), οι οποίες παράγονται από τα κύτταρα σε υψηλές θερμοκρασίες ή μετά από έκθεσή τους σε συγκεκριμένους φυσικούς και χημικούς παράγοντες. Το φαινόμενο αυτό καλείται απόκριση θερμικού σοκ (heat shock response) ή απόκριση στρες (stress response) (Lindquist S., et al., 1998; Morimoto R.I., 1993; Khandjian E.W., 1983). Οι πρωτεΐνες αυτές κατατάσσονται σε μεγάλες οικογένειες με βάση το μοριακό τους βάρος, εκ των οποίων οι σπουδαιότερες είναι οι οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins ή hsps) των 100kDa, των 90 kDa, των 70 kDa, των 60 kDa, των 40 kDa καθώς και η οικογένεια των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Fink L.A., 1999). Στις οικογένειες αυτές περιλαμβάνονται πλέον και πολλά μέλη των οποίων η δράση είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.








Εικ. 2: Κατανομή των μοριακών συνοδών στα 3 βασίλεια

A. Ευβακτήρια

B. Αρχαία

Γ. Ευκάρυα

(Hartl F.U. and Hayer-Hartl M., 2002, *Science*)

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΔΟΜΗ	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ	ΑΤΡ	ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΙΟ		ΟΜΟ-ΣΥΝΟΔΟΙ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
				ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΕΣ	ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ		
<i>Hsp100</i>	6-7μερής		+	ClpB ClpA	Hsp104		-αποσυμπλεγματοποίηση σε συνεργασία με την Hsp70 -πρωτεόλυση σε συνεργασία με την πρωτεάση ClpP -θερμαιοχλή -αποσυμπλεγματοποίηση σε συνεργασία με την Hsp70
							HspG
<i>Hsp90</i>	Διμερής		+	DnaK	Hsp90	Hsp, p23, CDC37	-αντοχή σε stress. Έλεγχος της αναδίπλωσης και ενεργότητας των στεροειδών ορμονών και κινασών κ.α. -de novo πρωτεϊνική αναδίπλωση -αποτροπή συμπλεγματοποίησης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών -καταστροφή πρωτεϊνικών συμπλοκών με την βοήθεια της ClpB -ρύθμιση της heat shock απάντησης
<i>Hsp70</i>	Μονομερής		+	GroEL	Hsp70 Hsc70	Hsp40 Bag1 Hip Chip	-αποτροπή συμπλεγματοποίησης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών -καταστροφή πρωτεϊνικών συμπλοκών με την βοήθεια της ClpB -ρύθμιση της heat shock απάντησης -ρύθμιση ενεργότητας των αναδιπλωμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών (π.χ. TF και κινασών)
<i>Hsp60</i>	14μερής 16μερής		+	GroEL	CCT / TRIC	GroES	-de novo πρωτεϊνική αναδίπλωση -αποτροπή συμπλεγματοποίησης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών
<i>sHsp</i>	8-24μερής			IbpA IbpB	Hsp25 κρυσταλλίνη		-de novo αναδίπλωση ακτίνης και τουμπουλίνης -αποτροπή συμπλεγματοποίησης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών -δεσμεύουν σωματίδια εγκλεισμού -αποτροπή συμπλεγματοποίησης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών -στατικά του φακού ματιού σπονδυλωτού

Πίνακας 1: Λειτουργίες και γενικά χαρακτηριστικά των συνοδών και ομο-συνοδών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα.

### 2.3.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΥΝΟΔΩΝ ΚΑΙ ΟΜΟΣΥΝΟΔΩΝ

Η οικογένεια των μοριακών συνοδών αποτελείται από αρκετά μέλη, εκ των οποίων τα βασικότερα ανήκουν στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και αναφέρονται παρακάτω όπως επίσης και στον πίνακα 1 που ακολουθεί.

#### A. ΜΙΚΡΕΣ HEAT-SHOCK ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ $\alpha$ -ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΝΗ.

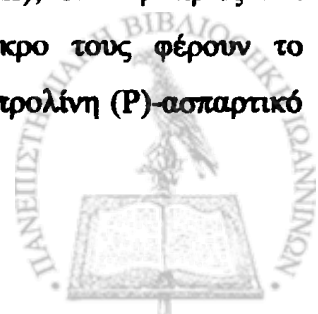
Τα μέλη αυτής της οικογένειας επάγονται μετά από στρες ενώ δεσμεύουν και σταθεροποιούν ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες για να διευκολύνουν την επαναδίπλωσή τους από τα συστήματα των «chaperonin» και της HSP70. Η  $\alpha$ -κρυσταλλίνη περιέχεται στο υγρό του οφθαλμικού φακού και συμμετέχει στην πρόληψη του καταρράκτη.

#### B. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP40

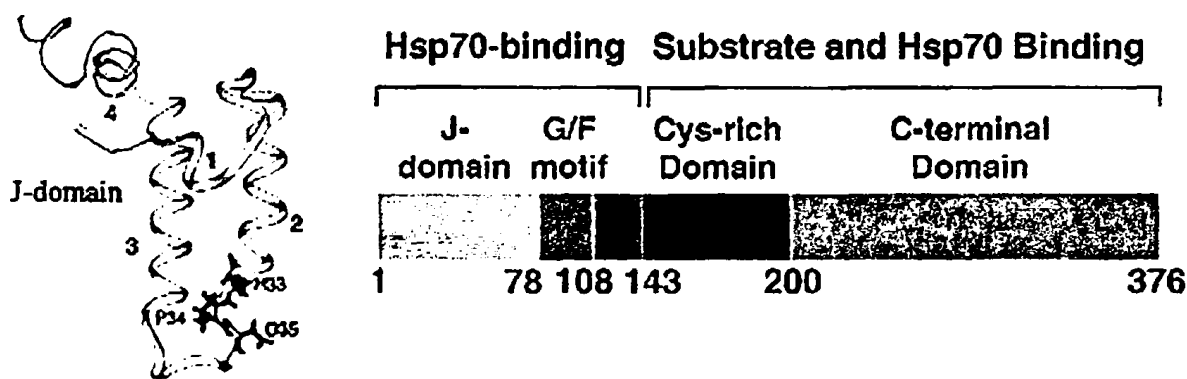
Η οικογένεια Hsp40 η οποία αποτελείται από τουλάχιστον 600 μέλη, χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια (Fink L.A., 1999). Το μοναδικό κριτήριο που απαιτείται για την κατάταξη μίας πρωτεΐνης στην ομάδα αυτή, είναι η παρουσία στην αλληλουχία της μίας λειτουργικής περιοχής μήκους ~70aa, γνωστή ως J (J domain), η οποία βρίσκεται συνήθως στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και η οποία έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τη δραστηριότητα ATPάσης των πρωτεϊνών Hsp70 (Carlan A.J., et al., 1993; Silver P.A., 1993). Η ιδιότητα αυτή δείχθηκε αρχικά για την J domain του βακτηριακού μέλους της οικογένειας που καλείται DnaJ και η οποία συμμετέχει στη μηχανή αναδίπλωσης της DnaK (Liberek K., et al., 1991).

Δομική ανάλυση της DnaJ (εικ. 3), έδειξε ότι αυτή αποτελείται από τέσσερις συντηρημένες περιοχές, οι οποίες προφανώς αντανακλούν λειτουργικές περιοχές. Αναλυτικά αυτές έχουν ως εξής:

A) J περιοχή. Αποτελεί την καλύτερα συντηρημένη περιοχή μεταξύ των Hsp40 πρωτεϊνών. Με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Pellechia M., et al., 1996; Qian Y.Q., et al., 1996), δείχθηκε ότι έχει το σχήμα ενός προεκτεταμένου δακτύλου, ο οποίος διαμορφώνεται από τέσσερις  $\alpha$ -έλικες. Οι δύο από αυτές (II και III), είναι μακριές και αντιπαράλληλες, περικλείουν ένα υδρόφοβο πυρήνα, ενώ στο άκρο τους φέρουν το λειτουργικά απαραίτητο πρότυπο των τριών αμινοξέων, ιστιδίνη (H)-προλίνη (P)-ασπαρτικό



οξύ (D). Το πρότυπο αυτό (HPD motif), βρίσκεται σε όλες τις πρότυπες πρωτεΐνες DnaJ που έχουν βρεθεί ως σήμερα, και φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη δράση της J περιοχής, αφού μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από τα τρία αυτά αμινοξέα, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία της πρωτεΐνης να διεγείρει τη δραστηριότητα ATPάσης της Hsp70 (Tsai J. & Douglas M.G., 1996). Η σταθεροποίηση των αντιπαράλληλων ελικών εξασφαλίζεται από την παρουσία των υπόλοιπων δύο βραχέων α-ελικών (I και IV), που καταλαμβάνουν θέσεις στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της J περιοχής αντίστοιχα, καθώς και από τις ενδοπεπτιδικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των υψηλά συντηρημένων αμινοξέων, που βρίσκονται προς το εσωτερικό του κυρίως σώματος του δακτύλου. Επιπλέον, λιγότερα συντηρημένα αμινοξέα, που απαντώνται στη θηλιά που σχηματίζουν οι έλικες II και III, όπως και εκατέρωθεν του τριπεπτιδίου HPD, θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων, μεταξύ μελών της οικογένειας και διαφόρων Hsp70 πρωτεϊνών (Schlenstedt G., et al., 1995; Hennessey F., et al., 2000). Τέλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αν η J περιοχή είναι επαρκής για την αλληλεπίδραση μεταξύ DnaJ και hsp70 πρωτεϊνών, αφού κάποιες αναφορές προτείνουν την εμπλοκή σε αυτή και της παρακείμενης G/F περιοχής (Wall D., et al., 1995; Karzai A.W. and McMacken R., 1996).



**Εικ. 3 :** Δομή της DnaJ της E.coli και αναπαράσταση των περιοχών της δομής της. (Bukau B and Horwich AL., 1998, Cell 92, 352-355)

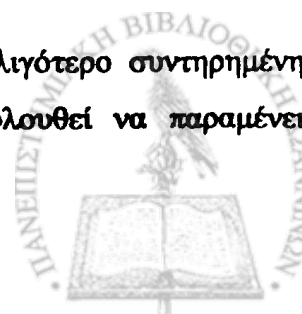
B) G/F περιοχή. Η περιοχή αυτή, μήκους συνήθως 30-40αα, είναι πλούσια σε γλυκίνη και φαινυλαλανίνη (40% και 15% αντίστοιχα), ενώ ο λειτουργικός της ρόλος δεν είναι αποσαφηνισμένος. Αρχικά θεωρήθηκε ότι αποτελεί απλά ένα ευλύγιστο σύνδεσμο μεταξύ της J περιοχής (Carlan A.J., et al., 1993; Silver P.A. and Way J.C., 1993) και του υπόλοιπου μορίου. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις, συμμετέχει αποφασιστικά στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης ολόκληρου του μορίου της DnaJ με την



DnaK, είτε άμεσα, ως συνδεόμενη η ίδια με την DnaK (Wall D., et al., 1995; Karzai A.W. and McMacken R. 1996), ρυθμίζοντας ταυτόχρονα την ειδικότητα αυτής της σχέσης (Yan W. and Graig E., 1999), είτε έμμεσα, επηρεάζοντας τη διαμόρφωση της J περιοχής προκειμένου αυτή να γίνει κατάλληλη για σύνδεση με την DnaK (Huang K., et al., 1999). Γενικά η δράση της, θεωρείται ενισχυτική προς αυτή της J περιοχής και περιορίζεται στις πρωτεΐνες Hsp40 τύπου I και II, που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Γ) CR περιοχή. Στη συνέχεια της G/F περιοχής βρίσκεται μία αλληλουχία πλούσια σε κυστεΐνες (Cystein Rich domain), στην οποία ανευρίσκεται το εξαιρετικά συντηρημένο αμινοξικό πρότυπο C-X-X-C-X-G-X-G (όπου C=κυστεΐνη, G=γλυκίνη, X=οποιοδήποτε αμινοξύ) να επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Μελέτες ανάλυσης βιοφυσικών δεδομένων (Bannecki B., et al., 1996; Szabo A., et al., 1996), έδειξαν ότι το πρότυπο αυτό, είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό δύο δακτύλων  $Zn^{2+}$ , καθώς και σε κάθε πρωτεϊνικό πρότυπο καθηλώνονται δύο άτομα  $Zn^{2+}$ , με τη βοήθεια ατόμων θείου που ανήκουν σε γειτονικές κυστεΐνες. Μεταξύ δε, των δύο δακτύλων  $Zn^{2+}$  σχηματίζεται ένας πυρήνας υδρόφοβων αμινοξέων. Πρόσφατη ανάλυση με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, αποκάλυψε ότι η CR περιοχή διατάσσεται στο χώρο σε σχήμα V, με τον κάθε δάκτυλο  $Zn^{2+}$  να καταλαμβάνει τη θέση του σε κάθε μία από τις δύο πτέρυγες του σχήματος (Martinez-Yamout M., et al., 2000). Επιπλέον δείχθηκε ότι η τοπολογία της τρισδιάστατης διαμόρφωσης της CR περιοχής, είναι μοναδική και χαρακτηριστική για τις πρωτεΐνες DnaJ και δεν προσομοιάζει με περιοχές κυστεϊνών άλλων πρωτεϊνών, που δεσμεύουν άτομα  $Zn^{2+}$  άλλων πρωτεϊνών (Martinez-Yamout M., et al., 2000) όπως αρχικά είχε θεωρηθεί (Szabo A., et al., 1996; Cyr D.M., et al., 1994). Με τη χρήση, μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης, που έφεραν ελλείμματα για την περιοχή αυτή (Bannecki B., et al., 1996), είτε με υπερέκφραση της δακτύλου  $Zn^{2+}$  σε κύτταρα θηλαστικών, απουσία των J και C/R περιοχών (Szabo A., et al., 1996), αποδείχθηκε ότι η δομή αυτής της αλληλουχίας της DnaJ, αποτελεί τμήμα και όχι το σύνολο της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος. Έτσι είναι εν μέρει υπεύθυνη, τουλάχιστον η περιοχή του πρώτου δακτύλου  $Zn^{2+}$  (Linke K., et al., 2003), για τις ιδιότητες μοριακού συνοδού που έχουν αποδοθεί στην πρωτεΐνη (Langer T., et al., 1992; Schroder H., et al., 1993). Σύμφωνα δε με σχετικά πρόσφατα στοιχεία, η περιοχή του δευτέρου δακτύλου  $Zn^{2+}$  μπορεί να αποτελεί μία νέα θέση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη DnaK (Linke K., et al., 2003).

Δ) Περιοχή καρβοξυτελικού άκρου. Η περιοχή αυτή αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας Hsp40. Ο ρόλος της εξακολουθεί να παραμένει



αμφιλεγόμενος. Παρόλα αυτά έχει δειχθεί ότι τμήματα αυτής της περιοχής, είναι υπεύθυνα για τη δράση της DnaJ, όσον αφορά την αναγνώριση και δέσμευση των πεπτιδικών υποστρωμάτων και την περαιτέρω αναδίπλωσή τους μέσω της DnaK (Goffin L., et al., 1998; Johnson J.L. et al., 2001). Ο ρόλος της αυτός επιτυγχάνεται πιθανά μέσω συνεργασίας με τη C/R περιοχή (Banecki B., et al., 1996; Lu Z. & Cyr D.M., 1998b). Η παραδοχή αυτή φαίνεται να ισχύει μόνο όσον αφορά τις πρωτεΐνες Hsp40 τύπου I, μία και σύμφωνα με κάποιες αναφορές, στις πρωτεΐνες Hsp40 τύπου II (που δεν περιλαμβάνουν C/R περιοχή), το καρβοξυτελικό άκρο αποδεικνύεται από μόνο του επαρκές στη δέσμευση μετουσιωμένου υποστρώματος (Lu Z. & Cyr D.M., 1998a). Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχουν δύο περιοχές σύνδεσης με το υπόστρωμα πάνω την αλληλουχία των πρωτεϊνών Hsp40: η μία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, αφορά όλους τους τύπους των πρωτεϊνών αυτών (I, II, III) και αποτελεί θέση πρόσδεσης χαμηλής συγγένειας που απαιτείται για τη δράση τους ως συν-συνοδά μόρια. Η άλλη βρίσκεται στον πρώτο δάκτυλο  $Zn^{2+}$  της περιοχής CR, μόνο των πρωτεϊνών Hsp40 τύπου I και αποτελεί θέση πρόσδεσης υψηλής συγγένειας. Η θέση αυτή απαιτείται προκειμένου μόνο οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας να παίζουν ρόλο μοριακού συνοδού, ανεξάρτητα από τη συνεργασία τους με πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp70 (Linke K., et al., 2003; Rudiger S., et al., 2001).

Με βάση την ομολογία που εμφανίζουν προς τις λειτουργικές περιοχές της βακτηριακής Hsp40 (DnaJ), τα μέλη της οικογένειας που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα κατατάσσονται σε τρεις τύπους (Cheetham M., et al., 1998):

Τύπος I: περιλαμβάνει εκείνες τις πρωτεΐνες που περιέχουν όλες τις περιοχές που απαντώνται στην πρωτεΐνη DnaJ.

Τύπος II: περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που περιέχουν στην αλληλουχία τους μόνο τις περιοχές J (στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης όπως συμβαίνει και στην DnaJ) και G/F (αν και η τελευταία τείνει εδώ να έχει μεγαλύτερο μέγεθος και πιο ποικίλο περιεχόμενο σε κατάλοιπα γλυκίνης, σε σύγκριση με τις ομόλογες περιοχές των πρωτεϊνών τύπου I).

Τύπος III: ανήκουν οι πρωτεΐνες που φέρουν μόνο την περιοχή J, η οποία μπορεί να βρίσκεται σε διαφορετικά θέση πέραν του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης.

Παρόλες όμως τις διαφορές που μπορεί να έχουν μεταξύ τους οι πρωτεΐνες Hsp40 των διαφόρων τύπων, σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, η δράση τους είναι η ίδια και συνοψίζεται στη θετική ρύθμιση των πρωτεϊνών Hsp70 μέσω των ATP-εξαρτώμενων κύκλων αναδίπλωσης των μετουσιωμένων υποστρωμάτων. Παρακάτω θα γίνει η περιγραφή του τρόπου με τον οποίο λαμβάνει χώρα η ρύθμιση αυτή.





## Γ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP60

Στην οικογένεια των HSP60 (chaperonins), συμπεριλαμβάνονται τόσο η οικογένεια της GroE (που περιλαμβάνει τις GroEL και GroES) όσο και η οικογένεια του συμπλόκου δακτυλίου του TCP-1. Η GroEL και τα ομόλογά της βρίσκονται στους προκαρυώτες, καθώς και στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες των ευκαρυωτών, ενώ ο TCP-1 και τα ομόλογά του στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Πολλοί από τους HSP60 συνοδούς είναι επίσης γνωστοί και ως «chaperonins» (cnp60) και είναι ολιγομερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα δακτυλιοειδούς μορφής με μία μεγάλη κεντρική κοιλότητα, όπου οι μη φυσιολογικές πρωτεΐνες δεσμεύονται και εγκλείονται.

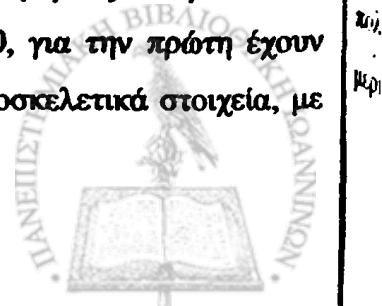
Η GroEL είναι ίσως ο πιο καλά μελετημένος μοριακός συνοδός και σε συνδυασμό με το cochaperonin του GroES και την παρουσία ATP διευκολύνει την πρωτεϊνική αναδίπλωση, όχι μόνο αποτρέποντας τη συμπλεγματοποίηση αλλά ταυτόχρονα επιτρέποντας σε κάποια μερικώς αναδιπλωμένα ενδιάμεσα να αναδιπλωθούν σε ένα περιβάλλον που συντελεί στη σταθεροποίηση της φυσικής τους κατάστασης.

## Δ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP70

Οι HSP70s είναι μία οικογένεια μοριακών συνοδών που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση καθώς και σε αρκετές άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Η οικογένεια αυτή αριθμεί πάρα πολλά μέλη τα οποία θα αναλυθούν εκτεταμένα παρακάτω.

## Ε. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP90

Τα μέλη της οικογένειας της HSP90 έχουν ιδιαίτερα συντηρημένη δομή και σημαντικοί αντιπρόσωποί τους βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι τους ανθρώπους. Παραδείγματα αποτελούν η κυτταροπλασματική μορφή στους ευκαρυώτες, Hsp90, η μορφή του ενδοπλασματικού δικτύου, Grp94, και το ανάλογο της E.coli, HtpG. Η Hsp90 των θηλαστικών υφίσταται σε μορφή διμερούς. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές ομοιότητες ανάμεσα στην Hsp90 και την Hsp70, για την πρώτη έχουν αναγνωρισθεί αρκετές εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις, π.χ. με κυττοσκελετικά στοιχεία, με



σηματοδοτικές πρωτεΐνες μεταγωγής και πρωτεϊνικές κινάσες. Η Hsp90 εντοπίζεται συχνά σε σύμπλοκα με άλλους μοριακούς συνοδούς.

## **ΣΤ. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ HSP100**

Τα θερμο-επαγόμενα μέλη της οικογένειας της HSP100 (ή Clp) έχουν έναν αριθμό περιέργων ιδιοτήτων και μοιράζονται την κοινή λειτουργία του να βοηθούν τους οργανισμούς να επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες. Επιδεικνύουν αρκετές διαφορετικές λειτουργίες, περιλαμβανομένης της πρωτεόλυσης. Είναι υψηλώς διατηρημένα και περιέχουν θέσεις δέσμευσης ATP και πολυπεπτιδίων. Σχηματίζουν εξαμελή σύμπλοκα δακτυλιδιών με διάμετρο στο εσωτερικό τους πολύ μικρότερη από αυτή της GroEL.

## **Ζ. ΚΑΛΝΕΞΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗ**

Η καλνεξίνη (calnexin) είναι ένας διαμεμβρανικός μοριακός συνοδός που εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η καλρετικουλίνη (calreticulin), που επιδεικνύει αλληλουχιακή ομολογία με την καλνεξίνη, είναι ένας διαλυτός ενδοπλασματικός συνοδός. Και οι δύο πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αναδίπλωση και στη συγκρότηση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο με έναν εξαρτώμενο από ασβέστιο τρόπο και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των γλυκοπρωτεϊνών και στον ποιοτικό έλεγχο στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

## **Η. ΠΕΠΤΙΔΥΛΟ-ΠΡΟΔΥΛΟ-ΙΣΟΜΕΡΑΣΗ (PPI) / ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (TF)**

Οι PPI είναι συμπικτινικά ένζυμα που στην ουσία βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς και όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Σε πολλές περιπτώσεις η παρουσία των PPI προάγει το ρυθμό αναδίπλωσης. Ο εκκινητικός παράγοντας είναι μία PPI με παρόμοια δραστηριότητα. Αλληλεπιδρά, *in vivo*, με την GroEL και προάγει τη δέσμευση αρκετών πολυπεπτιδίων. Το σύμπλοκο του με την GroEL δείχνει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια για μερικώς αναδιπλωμένα ενδιάμεσα από ότι η GroEL μεμονωμένη.



## **Θ. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΗ ΙΣΟΜΕΡΑΣΗ**

Η πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση (PDI) είναι ένας κρίσιμος συμπαράγοντας στην αναδίπλωση πολλών πρωτεϊνών που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτών. Έχει ισχυρή συγγένεια για μη αναδιπλωμένα πεπτίδια και πρωτεΐνες ενώ επίσης δεσμεύεται σε πολλά υδροφοβικά μόρια όπως τα στεροειδή και οι θυρεοειδείς ορμόνες.

## **I. ΟΜΟΣΥΝΟΔΟΙ ΤΗΣ HSP70**

Εκτός της DnaJ και της GrpE, οι οποίες δρουν ως ομο-συνοδοί της DnaK, έχουν ανακαλυφθεί και άλλοι πρωτεϊνικοί συμπαράγοντες που αλληλεπιδρούν με την Hsp70. Αυτοί περιλαμβάνουν την Hip (Hsp70 Interacting Protein), Hop (Hsp70/Hsp90 Organizing Protein), CHIP (Carboxy terminal Heat shock Interacting Protein), BAG-1 (Bcl-2 associated athanogene) και την αοξιλίνη (auxilin). Η ύπαρξη αυτών των συμπαράγοντων επιβεβαιώνει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού της Hsp70 στα κύτταρα.

## **ΙΑ. ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ**

Υπάρχουν πολλές μεγάλες και σύνθετες πρωτεϊνικές μηχανές στα κύτταρα οι οποίες σε κάποιες περιπτώσεις χρειάζονται για τη συγκρότησή τους εξειδικευμένους μοριακούς συνόδους όπως η Hsp47 και η RAP. (Flink A.L., 1999, Agashe V.R. and Hartl F.U., 2000)

### **2.3.2. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ 70kDa (Hsp70)**

Η Hsp70 είναι η πιο συντηρημένη πρωτεΐνη εξελικτικά (Lindquist, S. et al., 1988, Gupta, R.S. et al., 1994, Hunt, C. et al., 1985). Έχει βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς από τα αρχαιοβακτήρια και τα φυτά μέχρι τους ανθρώπους και μάλιστα η προκαρυωτική Hsp70, η DnaK, παρουσιάζει 50% ομολογία με τις ευκαρυωτικές Hsp70 πρωτεΐνες. Αναλογικά, η Hsp70 αποτελεί έναν υψηλά αξιόπιστο φυλογενετικά δείκτη εξέλιξης σε μοριακό επίπεδο. Έχει χρησιμοποιηθεί για να φανερώσει τη μονοφυλετική συγγένεια μεταξύ οργανισμών του



βασιλείου των μεταζώων, αλλά και ως ένας αδιάσειστος φυλογενετικός δείκτης συγγένειας (91%) μεταξύ των ζώων και των μυκητών (Gupta, R.S. et al, 1994; Borchellini, C., et al, 1998; Boorstein, W.R., et al.,1994) Η συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων αντανακλάται επίσης και από τις συντηρημένες λειτουργικές της ιδιότητες μεταξύ των ειδών. Για παράδειγμα, η Hsp70 της *Drosophila* όταν εκφράζεται σε θηλαστικά κύτταρα, είναι ικανή να προστατεύει ικανοποιητικά κατά του θερμικού σοκ (Pelham, H.R.B. 1984) ενώ και η Hsp70 των τρωκτικών μπορεί να συμπληρωθεί λειτουργικά από την ανθρώπινη Hsp70, η οποία προσφέρει κυτταρική προστασία κατά διαφόρων ειδών στρες και in-vitro ( Li, G.C., et al., 1991; Li, G.C., et al., 1992; Jaattela, M., et al., 1992) αλλά και σε διαγονιδιακά ζώα (Angelidis, C.E., et al., 1996; Plumier, J.C., et al, 1995; Radford, N.B. et al. 1996).

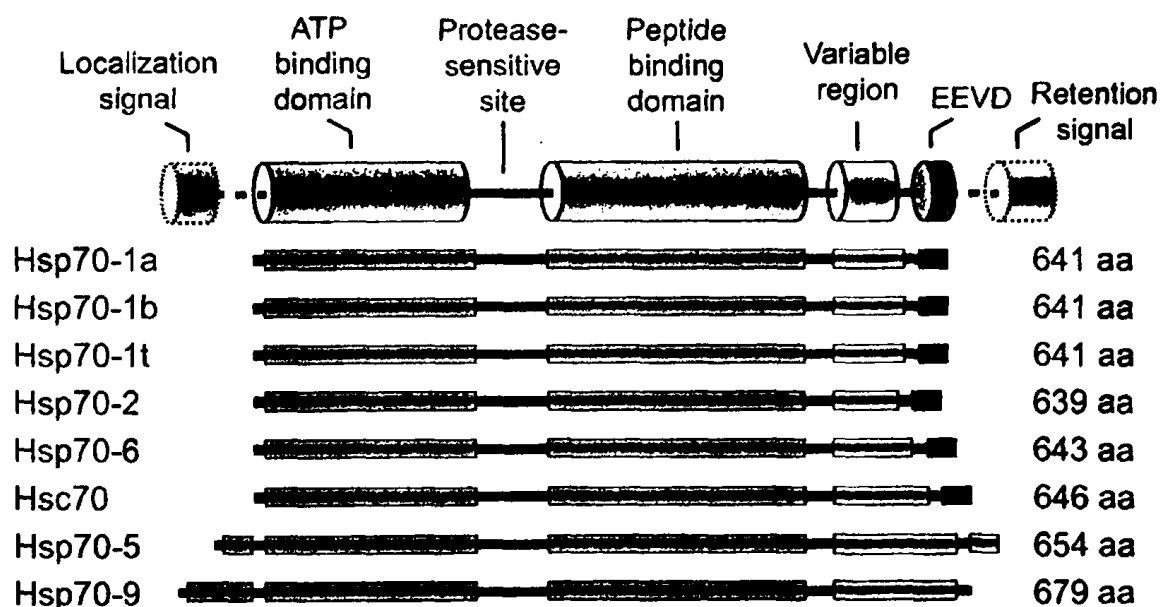
Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν περισσότερα από ένα γονίδια που κωδικοποιούν Hsp70 πρωτεΐνες. Για παράδειγμα στο μύκητα *Blastocladiella emersonii* υπάρχουν 10 υποτιθέμενα μέλη της οικογένειας με μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες Hsp70 της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* (Georg Rde, C. et al., 2007). Η ζύμη περιέχει οκτώ ομόλογες Hsp70, από τις οποίες οι έξι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (*Ssa1*, *Ssa2*, *Ssa3*, *Ssa4*, *Ssb1* και *Ssb2*) και δύο είναι ειδικά διαμερισματοποιημένες η *Ssc1* που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και η *Ssd1/Kar2* στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Werner-Washburne, M. et al., 1989). Γενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι τέσσερις *Ssa* πρωτεΐνες μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται, ενώ η ταυτόχρονη απαλοιφή τους είναι θανατηφόρα ((Werner-Washburne, M. et al., 1987). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η ζωτικής σημασίας λειτουργία των κυτταροπλασματικών *Ssa* πρωτεϊνών δεν μπορεί να αντικατασταθεί από τις *Ssb*, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας των Hsp70, έχουν και αλληλοκαλυπτόμενες αλλά και διαφορετικές λειτουργίες στη ζύμη (Boorstein, W.R., et al., 1994). Τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι παρόμοια με τη ζύμη, έτσι και στον άνθρωπο τα μέλη της οικογένειας των Hsp70 πρωτεϊνών έχουν πολλές αλλά και διαφορετικές λειτουργίες όπως θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

### 2.3.2.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ Hsp70 ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η οικογένεια των Hsp70 στον άνθρωπο περιέχει τουλάχιστον οκτώ γονιδιακά προϊόντα που διαφέρουν μεταξύ τους στην αλληλουχία αμινοξέων, στο επίπεδο έκφρασης και στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (πίν. 2) (Tavaria, M., et al., 1996). Ο εντοπισμός της



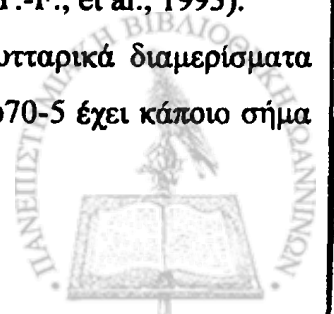
Hsp70-5 (Bip ή Grp78) και της Hsp70-9 (mtHsp70 ή Grp75) περιορίζονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και στην μήτρα του μιτοχονδρίου αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιπες έξι Hsp70 πρωτεΐνες κατανέμονται βασικά στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε έχουν ειδικότητα για την κάθε πρωτεΐνη που αποτελεί υπόστρωμά τους ή εμπλέκονται σε συγκεκριμένες λειτουργίες ανεξάρτητες από αυτές μίας συνοδούς πρωτεΐνης. Όπως συμβαίνει γενικά με όλα τα είδη των Hsp70 πρωτεϊνών, έτσι και με τις ανθρώπινες, η αλληλουχία των αμινοξέων τους αλλά και οι περιοχές της δομής τους είναι υψηλά συντηρημένες και είναι οι εξής:



**Εικ. 4:** Γραμμική αναπαράσταση της δομής των μελών της οικογένειας Hsp70 στον άνθρωπο (M. Daugaard et al. 2007)

- i) μία συντηρημένη περιοχή με λειτουργία ΑΤΡάσης στο αμινοτελικό άκρο
- ii) μία ενδιάμεση περιοχή με σημεία ευαισθητα στις πρωτεάσες
- iii) μία περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (18-kDa δίπλα στην ΑΤΡase περιοχή) και
- iv) μία περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο πλούσια σε γλυκίνη και προλίνη (G/P rich domain) όπως επίσης και ένα μοτίβο των αμινοξέων γλουταμινικό-γλουταμινικό-βαλίνη-ασπαραγινικό (EEVD motif) το οποίο και ενισχύει την πρόσδεση άλλων Hsp πρωτεϊνών αλλά και ομοσυννοδών πρωτεϊνών (εικ. 4) (Hartl, F.U. 1996; Bukau, B., et al., 2006; Tavarria, M., et al., 1996; Chappell, T.G., et al., 1987, Flaherty, K.M., et al., 1990; Wang, T.-F., et al., 1993).

Επιπλέον τα μέλη που βρίσκονται εντοπισμένα σε ειδικά κυτταρικά διαμερίσματα έχουν κάποιο σήμα εντοπισμού στο αμινοτελικό τους άκρο και η Hsp70-5 έχει κάποιο σήμα



συγκράτησης στο καρβοξυτελικό της άκρο που δεν της επιτρέπει να εκκριθεί από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Munro, S. et al., 1987). Η συντηρημένη δομή των περιοχών των Hsp70 πρωτεϊνών ενισχύει ουσιαστικά τη λειτουργία τους ως συνοδές πρωτεΐνες και τις καθιστά ικανές να συνδέονται, με έναν ATP-εξαρτώμενο τρόπο, με εκτεταμένες περιοχές υδροφοβικών αμινοξέων που εκτίθενται λόγω της λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στις οποίες ανήκουν, και στη συνέχεια να τις απελευθερώνουν (Hartl, F.U., 1996; Bukau, B., et al., 2006).

### 1. Hsp70-1a ΚΑΙ Η Hsp70-1b

Ένας τεράστιος όγκος πρόσφατα δημοσιευμένων δεδομένων, σχετικά με την οικογένεια των Hsp70 στον άνθρωπο, έχει να κάνει με τα βασικά μέλη της οικογένεια αυτής, δηλαδή την Hsp70-1a και την Hsp70-1b (κοινώς ονομαζόμενες Hsp70-1) οι οποίες και επάγονται από διάφορα είδη στρες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι υψηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες. Τα γονίδια HSPA1A και HSPA1B που κωδικοποιούν τις Hsp70-1a και Hsp70-1b αντίστοιχα, είναι στενά συνδεδεμένα, επάγονται από το στρες και δεν έχουν ιντρόνια (Wu B., et al 1985, Lindquist, S. & Craig, E.A. 1988, Morimoto, R.I., et al., 1990, Hightower, L.E., 1991). Επίσης ανήκουν στη ομάδα MHC III (μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας) που εντοπίζεται ανάμεσα στα γονίδια του συμπληρώματος και του TNF (Tumor Necrosis Factor) στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 (Wu, B., et al., 1985; Milner, C.M. et al., 1990).

Σύμφωνα με δημοσιευμένες ακολουθίες πρωτεϊνών οι Hsp70-1a (NM\_005345) και Hsp70-1b (NM\_005346) έχουν πάνω από 99% ομολογία αφού ουσιαστικά διαφέρουν μόνο σε δύο αμινοξέα (E110D, N499S) από τα 641 συνολικά. Κατά τη διάρκεια διαφόρων συνθηκών στρες, και τα δύο γονίδια των Hsp70-1 ενεργοποιούνται από την πρόσδεση ενός επαγόμενου από το στρες μεταγραφικού παράγοντα του HSF1 (Heat Shock Factor 1) πάνω σε ρυθμιστικά στοιχεία του θερμικού σοκ (Heat Shock Elements: HSE) που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα ανοδικά των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων (Milner, C.M. et al., 1990. Anckar, J. et al., 2007).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση των πρωτεϊνών Hsp70-1 εξαρτάται και από τον τύπο κυττάρων αλλά και από τη συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου αφού έχει παρατηρηθεί συσσώρευσή τους κατά την G1 και S φάση (Milarski, K.L. et al., 1986; Taira, T., et al., 1997). Ανάλογα και οι υποκινητές των Hsp70-1 γονιδίων περιέχουν διάφορες θέσεις

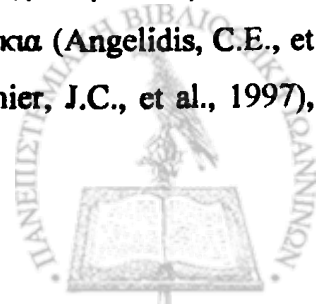


πρόσδεσης βασικών μεταγραφικών παραγόντων όπως οι TATA παράγοντες (TATA-factors), ο CTF (CCAAT-box-binding transcription factor) και ο SP1 (Greene, J.M., et al., 1987). Η βασική έκφραση των mRNA που παράγονται από τα γονίδια HSPA1A και HSPA1B διαφέρει ελάχιστα στους περισσότερους ιστούς και κυτταρικούς τύπους, αφού λίγο μεγαλύτερη έκφραση παρουσιάζει το HSPA1A. Οι επαγόμενες από στρες Hsp70-1 λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες και καθιστούν το κύτταρο ικανό να χειρίζεται τα βλαβερά συσσωματώματα των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του στρες αλλά και μετά από αυτό (Jaattela, M. 1999; Hartl, F.U. 1996).

Στο μοριακό επίπεδο, η Hsp70 είναι μία συνοδός πρωτεΐνη που καθοδηγεί τα μονοπάτια πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (Beckman, et al., 1990, Frydman, et al., 1994, Rudiger, et al., 1997), πρωτεϊνικής μετακίνησης (Chirico, et al., 1988, Murakami, et al., 1988, Imamoto, et al., 1992, Shi, et al., 1992) αλλά και πρωτεϊνικού καταβολισμού (Chiang, et al., 1989, Terlecky, et al., 1992). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι οι λειτουργίες της Hsp70 εκτελούνται σε συνεργασία με μία ομάδα ομο-συνοδών πρωτεϊνών, εκ των οποίων βασικά μέλη αποτελούν οι Hsp40 που αναλύθηκαν πριν, οι οποίες συνδυασμένες με την Hsp70 δημιουργούν λειτουργικές νανομηχανές συνοδών πρωτεϊνών (εικ. 5) (Cyr et al 1994; Minami et al 1996; Huang et al 2001; Bozidis et al 2002; Mayer M. P. and B. Bukau, 2005). Εντούτοις, η δημιουργία των ενεργών μηχανών των συνοδών πρωτεϊνών φαίνεται να εξαρτάται από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται η Hsp70. Στοιχεία σχετικά με τη ολιγομερή κατάσταση της Hsp70 οδήγησαν στις προτάσεις ότι η Hsp70 είναι ανενεργή στην ολιγομερή μορφή της, ενώ η λειτουργία της ως συνοδός πρωτεΐνη εκτελείται μόνο υπό τη μονομερή της μορφή (Benaroudj et al 1996; Angelidis C., et al 1999).

Αναλογικά, κατά την εφαρμογή διαφόρων ειδών στρες (θερμότητα, ισχαιμία και οξειδωτικό στρες) που προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή, η υπερέκφραση των Hsp70-1 πρωτεϊνών προσφέρει προστασία κατά του στρες σε κυτταροκαλλιέργειες (Li, G.C., et al., 1991; Jaattela, M. et al., 1993; Mestrlil, R., et al., 1994; Marber, M.S., et al., 1995; Wissing, D. et al., 1996; Bellmann, K., et al., 1996; Amin, V., et al., 1996; Chong, K.Y., et al., 1998; Kwak, H.J. et al. 1998) και εμπλέκεται με τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Angelidis C., et al. 1991, 1996) ή τον κυτταρικό θάνατο (Samali, A., 1996).

Στην περίπτωση εφαρμογής διαφόρων ειδών στρες (θερμότητα, ισχαιμία και οξειδωτικό στρες) που προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hsp70-1 προσφέρει προστασία κατά του στρες σε διαγονιδιακά ποντίκια (Angelidis, C.E., et al., 1996; Plumier, J.C., et al., 1995; Radford, N.B. et al. 1996; Plumier, J.C., et al., 1997),



αφού έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως το ισχαιμικό σοκ (Plumier, et al. 1995), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Cummings CJ, et al., 2001, Adachi H, et al., 2003) και ο καρκίνος (Scott and Frydman 2003), ενώ ο βασικός ρόλος των Hsp70-1 στην προστασία κατά των διαφόρων εξωτερικών στρες, ενισχύεται και από δεδομένα που προκύπτουν από ποντίκια που τους λείπουν οι πρωτεΐνες Hsp70.1 ή Hsp70.3, τα οποία ενώ ζουν και είναι γόνιμα και στις δύο περιπτώσεις, μόνο στην πρώτη δείχνουν αυξημένη ευαισθησία σε παγκρεατίτιδα, υπεριώδη ακτινοβολία (επιδερμίτιδα), οσμωτικό στρες (μυελώδης μοίρα νεφρού), ισχαιμία (εγκέφαλος) και μειωμένη ικανότητα να αποκτήσουν αντίσταση στην τοξικότητα του ήπατος από TNF αλλά και στο φλεγμονώδες σοκ αφού πριν έχουν υποστεί θερμική προεργασία (Lee S.H., et al., 2001; Van Molle W., et al., 2001; Shim E.H. et al., 2002; Kwon S.B. et al. 2002; Hwang J.H. et al. 2005).



**Εικ. 5.** Πιθανές νανομηχανές που συγκροτούνται από τη συνοδό πρωτεΐνη Hsp70 και τις ομοσυνοδούς πρωτεΐνες της που διαφέρουν ανάλογα με τη λειτουργία της νανομηχανής. (Αναπαράσταση από Hohfeld J. et al. 2001)

Επιπλέον η έλλειψη της Hsp70.1 ή Hsp70.3 σε κύτταρα τα οδήγησε σε θερμοευαισθησία (Huang L., et al., 2001). Αξιοσημείωτη είναι η ταυτόχρονη έλλειψη των πρωτεϊνών Hsp70.1 και Hsp70.3 σε διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία ενώ ήταν γόνιμα, έδειχναν ευαισθησία στη σήψη και μειωμένη ικανότητα ανθεκτικότητας στην καρδιακή ισχαιμία, ενώ τα κύτταρά τους είχαν γενομική αστάθεια και ευαισθησία σε ακτινοβολίες (Hampton C.R., et al., 2003; Hunt C.R., et al., 2004; M. Daugaard et al. 2007; Singleton K.D. et al., 2006). Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν την προσθετική και συνεργιστική





δράση των δύο αυτών πρωτεϊνών αλλά και την εξελικτική σημαντικότητα των πολλαπλών γονιδίων τους.

Στην περίπτωση θερμικού σοκ, έχει αποδειχτεί ότι η λειτουργία της Hsp70-1 ως συνοδού πρωτεΐνης είναι θεμελιώδης για την προστασία του κυττάρου, αφού έχει προταθεί ότι αναστέλλει τη συσσώρευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων αποσύροντας έτσι το ερέθισμα που θα οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο (Nollen, E.A., et al., 1999; Mosser, D.D., et al., 2000). Επίσης η Hsp70-1 προστατεύει τα μιτωτικά κύτταρα από ανωμαλίες διαίρεσης που συμβαίνουν εξαιτίας της επαγόμενης από θερμότητα καταστροφής του κεντροσώματος (Hut, H.M., et al., 2005). Όμως η Hsp70-1 επίσης προστατεύει τα ποντίκια κατά της παγκρεατίτιδας και του TNF (Van Molle, W., et al., 2001; Hwang, J.H. et al. 2005) και ενισχύει την επιβίωση των κυτταροκαλλιιεργειών που εκτίθενται σε διάφορα ερεθίσματα τα οποία όμως δεν είναι γνωστό ότι προκαλούν πρωτεϊνική αποδιάταξη και συσσωμάτωση, όπως είναι η ενεργότητα των υποδοχέων θανάτου της οικογένειας TNF υποδοχέων (Jaattela M., et al., 1992; Buzzard K.A., et al., 1998) της αστίας λόγω έλλειψης γλυκόζης (Williams R.S., et al., 1993), του κεραμιδίου (Buzzard K.A., et al., 1998), της δοξορουβικίνης (Karlseder J., et al., 1996), της υπεριώδους ακτινοβολίας (Simon M.M., et al., 1995), φαρμάκων που καταστρέφουν τους μικροσωληνίσκους (Kwak H.J. et al. 1998) και κυτταρικών αλλαγών που σχετίζονται με τον καρκίνο (Nylandsted J., et al., 2000, 2002; Rohde M., et al., 2005).

Νέα δεδομένα προτείνουν ότι στην προστασία κατά των παραπάνω ερεθισμάτων που αναφέρθηκαν, εμπλέκεται η Hsp70-1 η οποία εντοπίζεται και στο εσωτερικό της μεμβράνης των λυσοσωμάτων (Nylandsted J. et al. 2004; Gyrd-Hansen M., et al., 2004; Bivik C., et al., 2006; Mambula S.S. et al., 2006; Doulias P.T., et al., 2007). Σε αυτή τη θέση σταθεροποιεί τη λυσοσωμική μεμβράνη και αναστέλλει την απελευθέρωση των λυσοσωμικών υδρολασών στο κυτταρόπλασμα, όπου εκεί μπορούν να ξεκινήσουν κάποιο μονοπάτι αποπτωτικού θανάτου (Nylandsted J. et al. 2004; Leist M. et al., 2001; Kroemer G. et al., 2005). Η παραπάνω ιδέα ενισχύεται από το γεγονός ότι στο πάγκρεας διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη της Hsp70-1, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ποσότητας και δραστηριότητας της λυσοσωμικής καθεψίνης (lysosomal cathepsin) (Hwang, J.H. et al., 2005).

Τέλος η επαγωγή της Hsp70-1 από τη θερμότητα έχει αποδειχθεί ότι συνοδεύεται και από τη μετακίνησή της στον πυρήνα των κυττάρων με συγκεκριμένη μάλιστα συσσώρευση της στους πυρήνίσκους (Welch, W.J. et al. 1984). Για αρκετές δεκαετίες δεν ξέραμε τον πραγματικό λόγο για τον οποίο η Hsp70-1 μετακινείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα και



τον πυρηνίσκο κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ. Ένα από τα πιο πρόσφατα δημοσιευμένα στοιχεία, σχετικά με αυτό το σημείο, προτείνει ότι η Hsp70-1 οδηγεί τις αποδιαταγμένες λόγω θερμότητας πυρηνικές πρωτεΐνες στον πυρηνίσκο κατά τη διάρκεια του στρες προκειμένου να αποτραπεί σε πρώτη φάση η τυχαία συσσωμάτωσή τους μέσα στον πυρήνα και στη συνέχεια να επιτευχθεί η επαναδίπλωσή τους σε επιτρεπτά επίπεδα που αποτρέπουν την έμμεση βλάβη σε άλλα πυρηνικά συστατικά (Nollen E.A., et al 2001). Οι πυρηνίσκοι θεωρούνται από κάποιους ότι είναι ένας σημαντικός κυτταρικός αισθητήρας του στρες (Rubbi C.P. and Milner J., 2003). Επίσης, είναι γνωστό ότι οι πυρηνίσκοι είναι πολυλειτουργικές πυρηνικές περιοχές που εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών διαδικασιών όπως η βιογένεση των ριβοσωμάτων, η βιογένεση των μη-ριβοσωματικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, η κυτταρική γήρανση και ο κυτταρικός κύκλος. Κάθε πυρηνίσκος περιέχει πάνω από 700 πρωτεΐνες (Coute Y., et al., 2005) και οι περιοχές που περιέχουν τα γονίδια rDNA (NORs: nucleolar organizer regions, οργανωτής πυρηνίσκου) βρίσκονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21 και 22. Κάθε ένας NOR (οργανωτής πυρηνίσκου) περιλαμβάνει 30-50 επαναλαμβανόμενα γονίδια rDNA σε μία διαδοχική σειρά που χωρίζονται από ενδιάμεσα διαστήματα μη-μεταγραφόμενου DNA (Henderson A.S, et al., 1972).

## 2. Hsp70-1t

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την Hsp70-1t (HSPA1L) δεν έχει ιντρόνια και εδράζεται στην ίδια περιοχή (MHC class III region) όπως και τα γονίδια HSPA1A και HSPA1B (Milner C.M. et al., 1990; Goate A.M., et al., 1987). Η πρωτεΐνη είναι ομόλογη κατά 91% με την Hsp70-1a (πίνακας 2), αφού η βασική διαφορά τους εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο τους (εικ. 4). Το γονίδιο HSPA1L δεν περιέχει καθόλου ρυθμιστικά στοιχεία του θερμικού σοκ (Heat Shock Elements: HSE) στην περιοχή του υποκινητή του και εκφράζεται διαρκώς σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις ενώ σε χαμηλά επίπεδα σε άλλους ιστούς. Η λειτουργία και μεταγραφική της ρύθμιση είναι προς το παρόν άγνωστη.

## 3. Hsp70-2

Η πρωτεΐνη Hsp70-2, εκφράζεται διαρκώς σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς και σε υψηλά επίπεδα μόνο τους όρχεις και στον εγκέφαλο (Bonnycastle L.L., et al.,



1994; Son W.Y., et al., 2000). Το γονίδιο HSPA2 που την κωδικοποιεί εντοπίζεται στο 14 χρωμόσωμα ενώ η πρωτεΐνη δείχνει ομολογία 84% με την Hsp70-1a (πίνακας 2). Η έκφρασή της είναι συχνά μειωμένη στους άνδρες με ανώμαλη σπερματογένεση (Son W.Y., et al., 2000) και αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου HSPA2 είναι στείρα λόγω της μαζικής απόπτωσης των σπερματοζωαρίων τους (Dix D.J., et al., 1996). Στα σπερματογόνια των ποντικών έχουν προσδιοριστεί ειδικοί ρόλοι της Hsp70-2 ως θεμελιώδους συνοδούς πρωτεΐνης για το σύμπλεγμα κυκλίνης B/cdc2 κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης (Zhu D., et al., 1997; Dix D.J. et al. 1997) αλλά και για τις μεταβατικές πρωτεΐνες -1 και -2 (transition proteins -1 and -2) που εμπλέκονται στο πακετάρισμα του DNA κατά τη διαδικασία της μεταμειωτικής αναδιοργάνωσης του γενώματος (, J. et al. 2006). Επιπλέον η Hsp70-2 απαιτείται για την ανάπτυξη και την επιβίωση διαφόρων ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων (Rohde M., et al., 2005; Daugaard M., et al., 2007).

#### 4. Hsp70-5, Bip, Grp78

Το γονίδιο HSPA5 εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί μία συνεχώς εκφραζόμενη ειδικά διαμερισματοποιημένη (compartment-specific) πρωτεΐνη την Hsp70-5 (πίνακας 2). Η Hsp70-5 (γνωστή και ως Bip ή Grp78) βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και διευκολύνει τη μεταφορά των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και την περαιτέρω αναδίπλωσή τους (Munro S. et al., 1986; Hendershot L.M., et al., 1994; Gething M.J. 1999). Η Hsp70-5 περιέχει μία ειδική αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο μέσω της οποίας οδηγείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου και εντοπίζεται. Στο τέλος του καρβοξυτελικού της άκρου υπάρχει ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο των αμινοξέων "KDEL" το οποίο είναι σήμα συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι κοινό για όλες τις διαλυτές πρωτεΐνες του (εικ. 4) (Munro S. et al., 1987). Σύμφωνα με την πηγή πληροφοριών γονιδιακής έκφρασης SymAtlas (Su A.I. et al. 2004), η Hsp70-5 βρίσκεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αλλά έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε εκκριτικά κύτταρα όπως του θυρεοειδούς και των παγκρεατικών νησιδίων (islets). Σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου υπάρχει έλλειψη του γονιδίου Hspa5, τα έμβρυα πεθαίνουν σε 3,5 μέρες, γεγονός που εντάσσει την Hsp70-5 στην κατηγορία των πιο θεμελιωδών γονιδίων (Luo S., et al., 2006).



## 5. Hsp70-6

Η Hsp70-6 είναι ένα αυστηρά επαγόμενο από στρες μέλος της οικογένειας των Hsp70 και κωδικοποιείται από το γονίδιο HSPA6 το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1. Η Hsp70-6 έχει ομολογία 85% με την Hsp70-1a (Leung T.K., et al., 1990) (πίνακας 2) και επάγεται μόνο μετά από σκληρές συνθήκες στρες (Parsian A.J., et al., 2000). Αν και διαφέρει κατά 15% από τις δύο άλλες επαγόμενες από στρες Hsp70 πρωτεΐνες (Hsp70-1a και Hsp70-1b), είναι πολύ πιθανό η Hsp70-6 να λειτουργεί κατά ένα παρόμοιο τρόπο ως ένα εξάρτημα της γενικής απόκρισης στο στρες. Σύμφωνα με την πηγή πληροφοριών γονιδιακής έκφρασης SymAtlas (Su A.I. et al. 2004), η Hsp70-6 εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στο αίμα, ειδικά στα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells), τα μονοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες, αλλά σχεδόν απουσιάζει σε άλλα είδη κυττάρων του αίματος όπως επίσης και σε άλλους ιστούς. Διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της Hsp70-6 δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα και επομένως δεν είναι γνωστό εάν η Hsp70-6 έχει κάποιες συγκεκριμένες λειτουργίες στα κύτταρα του αίματος. Το χρωμόσωμα 1 περιέχει επίσης ένα ψευδογονίδιο, το HSPA7, το οποίο ενώ μεταγράφεται ως απόκριση σε στρες, δεν κωδικοποιεί κάποια λειτουργική Hsp70 πρωτεΐνη, λόγω προσθήκης ενός νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο στη θέση 340 το οποίο και δημιουργεί μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου με αποτέλεσμα να προκύπτει κωδικόνιο λήξης στη θέση 368 (Parsian A.J., et al., 2000; Leung T.K., et al., 1992).

## 6. Hsp70-8, Hsc70

Το γονίδιο HSPA8 εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και εκφράζεται συνεχώς στους περισσότερους ιστούς (Dworniczak B. et al., 1987). Το γονίδιο HSPA8 κωδικοποιεί το «συγγενές» (cognate) μέλος της Hsp70 οικογένειας την Hsc70 (Hsp70-8), η οποία παρουσιάζει 86% ομολογία με την Hsp70-1a (πίνακας 2). Έχει αναφερθεί ότι η Hsc70 εμπλέκεται σε ένα μεγάλο πλήθος θεμελιωδών λειτουργιών των συνοδών πρωτεϊνών όπως η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, πρωτεϊνική μεταφορά διαμέσου μεμβρανών, αυτοφαγοκυττάρωση σχετιζόμενη με συνοδές πρωτεΐνες, αποφυγή συσσωμάτωσης πρωτεϊνών υπό συνθήκες στρες και αποσυναρμολόγηση κυστιδίων περιβαλλομένων από κλαθρίνη (Lindquist S. et al., 1988; Bukau B., et al., 2006). Οπότε η Hsc70 θεωρείται ως ένα θεμελιώδες για την επιβίωση γονίδιο γι αυτό άλλωστε και δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα διαγονιδιακό ποντίκι που να παρουσιάζει έλλειψή της (Florin L., et



al., 2004). Αναλογικά και η γονιδιακή αποσιώπηση της Hsc70 με τεχνολογία siRNA σε διάφορους κυτταρικούς τύπους έχει οδηγήσει σε μαζικούς θανάτους (Rohde M., et al., 2005).

Πρόσφατα η Hsc70 έχει επωμιστεί έναν ενδιαφέροντα ρόλο στην εμπλεκόμενη από κυτοκίνη (cytokine) μετα-μεταγραφική ρύθμιση της Bim (μέλος της προαποπτωτικής οικογένειας Bcl-2) στα ανθρώπινα κύτταρα αίματος (Matsui H., et al., 2007). Η Hsc70 προσδέεται σε σημεία πλούσια σε AU στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της πρωτεΐνης Bim (Bcl2 interacting mediator of cell death) και έτσι το σταθεροποιεί με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία ομο-συνοδού πρωτεΐνης. Αυτό δείχνει ότι οι δυνατότητες της Hsc70, ως συνοδού πρωτεΐνης, δεν περιορίζονται μόνο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.

## 7. Hsp70-9

Το γονίδιο HSPA-9 εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και δεν επάγεται από στρες. Η πρωτεΐνη Hsp70-9 (mtHsp70) έχει ομολογία 52% με την Hsp70-1a (πίνακας 2) και 65% με

Πρωτεΐνη	Εναλλακτικά ονόματα	Ομολογία με την Hsp70-1a (%)	Locus	Χρωμοσωμική τοποθεσία	Κυτταρική τοποθεσία	Επαγόμενα από στρες
Hsp70-1a	Hsp70, Hsp72, Hsp70-1	100	HSPA1A	6p21.3	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας Λυσοσώματα	Ναι
Hsp70-1b	Hsp70, Hsp72, Hsp70-1	99	HSPA1B	6p21.3	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας Λυσοσώματα	Ναι
Hsp70-1t	Hsp70-hom	91	HSPA1L	6p21.3	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Όχι
Hsp70-2	Hsp70-3, HspA2	84	HSPA2	14q24.1	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Όχι
Hsp70-5	Bip, Grp78	64	HSPA5	9q33-q34.1	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Όχι
Hsp70-6	Hsp70B'	85	HSPA6	1cen-qter	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Ναι
Hsc70	Hsp70-8, Hsp73	86	HSPA8	11q23.3-q25	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Όχι
Hsp70-9	Grp75, mtHsp75, Mortalin	52	HSPA9	5q31.1	Μιτοχόνδρια	Όχι

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά στοιχεία των μελών της οικογένειας Hsp70 στον άνθρωπο όπως και ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους (Daugaard M., et al., 2007).



την SSC1 (αντίστοιχη μιτοχονδριακή Hsp70 στη ζύμη) (Domanico S.Z., et al., 1993; Bhattacharyya T., et al., 1995; Daugaard M., et al., 2007; Deocaris C.C., et al., 2006), κάτι που επιδεικνύει ότι, στις μιτοχονδριακές Hsp70 μεταξύ διαφόρων ειδών, υπάρχει υψηλότερο επίπεδο συντήρησης αλληλουχιών, παρά μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας των Hsp70 του ίδιου είδους. Ένα ειδικό σήμα 42 αμινοξέων στη δομή της μεταφέρει την Hsp70-9 στη μιτοχονδριακή μήτρα, όπου αλληλεπιδρά με τις εισερχόμενες πρωτεΐνες και τις βοηθάει στη σωστή αναδίπλωση μετά τη διαμεμβρανική μεταφορά τους (Deocaris C.C., et al., 2006; Mizzen L.A., et al., 1989). Η έλλειψη της Ssc1 στη ζύμη είναι θανατηφόρος (Craig E.A., et al., 1989), ενώ δεν έχει κατασκευαστεί ακόμη διαγονιδιακό ποντίκι με την ίδια έλλειψη.

## 2.4. ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ DNA

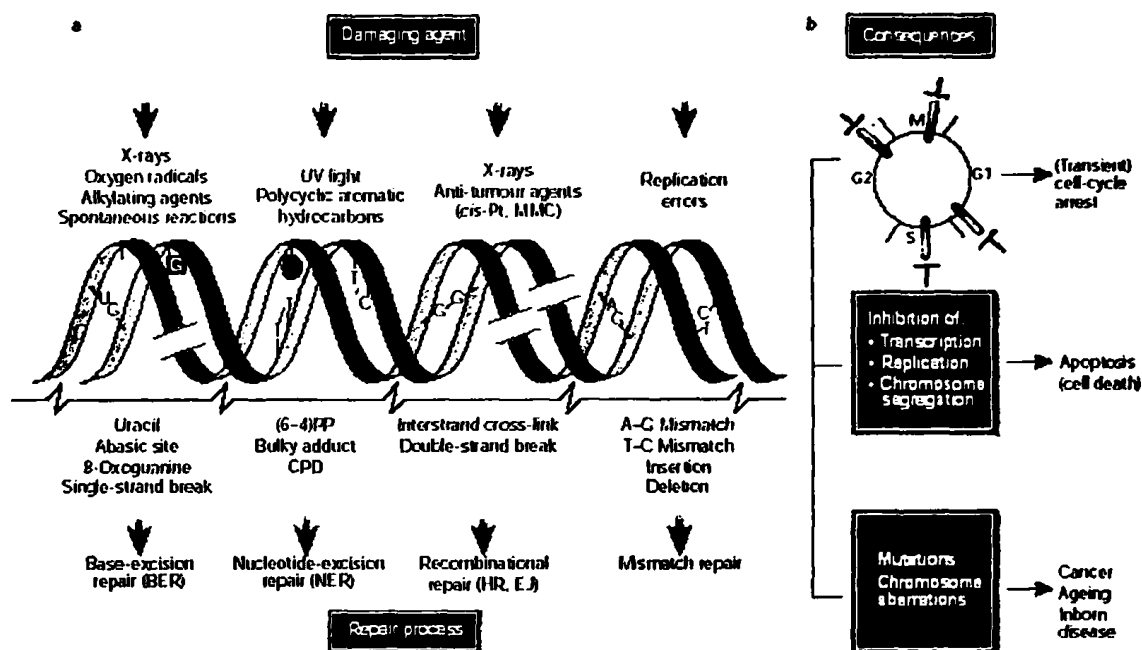
Η φυσικοχημική σύσταση των γονιδίων δεν μας προσφέρει εγγύηση για την σταθερή και ισόβια λειτουργία τους. Μία περίπλοκη ποικιλομορφία βλαβών του DNA προκύπτουν από τρεις βασικές αιτίες (εικ. 6). Κατ' αρχάς, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η ιοντική ακτινοβολία και πολυάριθμες γενοτοξικές χημικές ουσίες που προκαλούν μεταβολές στη δομή του DNA, οι οποίες, εάν παραμείνουν, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις που ενισχύουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Ένα έντονο παράδειγμα είναι η έκθεση στις γενοτοξικές ενώσεις του καπνού των τσιγάρων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το συχνότερο καρκίνο των ανθρώπων του Δυτικού κόσμου. Μελέτες επίσης με *in vitro* πειράματα κατέδειξαν ότι η υψηλή θερμότητα ενεργεί ως εξωτερικός παράγοντας πρόκλησης βλαβών του DNA, ενδεχομένως μέσω της επίθεσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που δημιουργούνται μέσω γλωριούχων αλάτων και διττανθρακικών ιόντων και οδηγούν τελικά σε οξειδωτική βλάβη του DNA (Reddy M.V., et al, 1992, Bruskov VI, et al, 2002).

Δεύτερον, μερικοί χημικοί δεσμοί του DNA τείνουν αυθόρμητα να αποδιοργανωθούν υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η υδρόλυση των νουκλεοτιδικών καταλοίπων αφήνουν τις περιοχές του DNA χωρίς βάσεις. Αυθόρμητη ή επαγόμενη απαμίνωση της κυτοσίνης, αδενίνης, γουανίνης ή της 5-μεθυλκυτοσίνης, μετατρέπει αυτές τις βάσεις σε ουρακίλη, υποξανθίνη, ξανθίνη και θυμίνη αντίστοιχα (Lindahl, T., 1993).

Τέλος, προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού αποτελούν έναν μόνιμο εχθρό της ακεραιότητας του DNA προερχόμενης από το εσωτερικό του ίδιου του κυττάρου. Σε αυτά περιλαμβάνονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ανιόν σουπεροξειδίου, ρίζα



υδροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου) που προέρχονται από την οξειδωτική αναπνοή και τα προϊόντα της υπεροξειδωσίας λιπιδίων. Πάνω από 100 οξειδωτικές τροποποιήσεις έχουν προσδιοριστεί στο DNA (Cadet J., et al., 1997).



**Εικ. 6: Καταστροφή του DNA, μηχανισμοί επιδιόρθωσης και συνέπειες.**

**a.** Κοινός καταστροφικός παράγοντας του DNA (πάνω): παραδείγματα βλαβών του DNA που προκαλούνται από αυτούς τους παράγοντες (μέση): και οι πιο σχετικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA που είναι υπεύθυνοι για την αποκατάσταση των βλαβών (κάτω).

**b.** Έντονα φαινόμενα από την καταστροφή του DNA στη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου που οδηγεί σε προσωρινή διακοπή στην G1, S, G2 και M φάση (πάνω) και στις μεταβολικές διαδικασίες σχετικές με το DNA (μέση). Μακροπρόθεσμες συνέπειες βλαβών του DNA (κάτω) συμπεριλαμβάνουν μόνιμες αλλαγές της αλληλουχίας του DNA (σημειακές μεταλλάξεις που συνδέονται με απλά γονίδια ή και χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εμπλέκουν πολλαπλά γονίδια) και τα βιολογικά τους φαινόμενα.

Συντομογραφίες: *cis*-Pt and MMC, cisplatin and mitomycin C, αντίστοιχα (και τα δύο είναι DNA-crosslinking agents); (6-4)PP and CPD, 6-4 photoproduct και cyclobutane pyrimidine dimer, αντίστοιχα (και τα δύο προκαλούνται από υπεριώδη ακτινοβολία); BER and NER, base and nucleotide-excision repair, αντίστοιχα; HR, homologous recombination; EJ, end joining. (Jan H. J. Hoeijmakers 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, Nature)

Η εξέλιξη έχει επενδύσει σημαντικά στη μείωση των ανεπιθύμητων επιδράσεων του ίδιου του μεταβολισμού εφαρμόζοντας ένα περίπλοκο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα στο οποίο συμμετέχουν μεταξύ άλλων και η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης και η περοξυρεδοξίνη όπως και μικρομοριακοί-σαρωτές, όπως η γλουταθειόνη (Finkel T., and Holbrook N. J., 2000).



Αν σκεφτεί κάποιος ότι οι συνέπειες των βλαβών του DNA είναι τόσο σημαντικές για την επιβίωση του κυττάρου, αφού σε αυτές συγκαταλέγονται ονομαστικά :

- η ακινητοποίηση του κυτταρικού κύκλου σε κάποια φάση
- η αναστολή της μεταγραφής, της αντιγραφής αλλά και του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων που οδηγούν τελικά στην απόπτωση και τέλος
- οι μεταλλάξεις και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που οδηγούν σε καρκίνο και πρόωρη εκ γενετής γήρανση

τότε λογικό είναι το κύτταρο για να προφυλαχτεί από αυτές να έχει εξοπλιστεί με μία πληθώρα επιδιορθωτικών πρωτεϊνών που αποτελούν τα λεγόμενα συστήματα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, τα οποία είναι τα εξής:

- Σύστημα επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής βάσεων (Base Excision Repair, BER), σύστημα επιδιόρθωσης σημειακών θραύσεων (Single Strand Break Repair, SSBR)
- Σύστημα επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής νουκλεοτιδίων (Nucleotide excision repair, NER)
- Συστήματα επιδιόρθωσης με ανασυνδυασμό (Recombinational Repair), τα οποία είναι το σύστημα του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination: HR) και το σύστημα μη ομόλογου ανασυνδυασμού τελικής σύνενωσης (Non-Homologous End-Joining: NHEJ)
- Σύστημα επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (Mismatch repair)

Στην εικ. 6 υπάρχουν σχηματικά όλα τα παραπάνω στοιχεία που αναφέρθηκαν.

#### **2.4.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ DNA ΜΕΣΩ ΑΠΟΚΟΠΗΣ ΒΑΣΕΩΝ (BER-SSBR)**

Σήμερα, είναι αποδεκτό ότι διάφορα γνωστά επιδιορθωτικά μόρια του DNA συνεργάζονται στην προστασία των κυττάρων από τις βλάβες του DNA. Μεταξύ αυτών η PARP-1, η XRCC1, η DNA polβ και η DNA λιγάση-III συνεργάζονται αποτελώντας βασικά συστατικά των συστημάτων BER και SSBR και επιδιορθώνουν σημειακές θραύσεις του DNA. Η μόνη διαφορά μεταξύ των παραπάνω συστημάτων είναι στην αρχή, συγκεκριμένα, ενώ στην περίπτωση του συστήματος BER μπορεί να δημιουργηθεί κάποια περιοχή χωρίς αζωτούχο βάση ή να προκύψει λάθος βάση, η οποία θα αφαιρεθεί από κάποια υδρολάση και στη συνέχεια θα σπάσει ο φωσφοδιεστερικός δεσμός από την APE1 (ενδονουκλεάση) για να επιδιορθωθεί η βλάβη, στην περίπτωση του συστήματος SSBR, έχουμε απευθείας δημιουργία





θραύσεως από εξωτερικούς παράγοντες η οποία στη συνέχεια επιδιορθώνεται με την ίδια διαδικασία όπως και στο σύστημα BER που θα περιγραφεί παρακάτω.

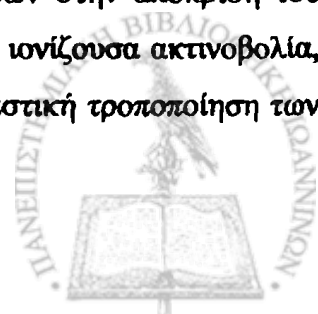
#### 2.4.1.1. PARP-1

Η PARP-1 [Poly(ADP-ribose) polymerase-1] είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που ενεργοποιείται με τη δέσμευσή της σε σημειακές και διπλές θραύσεις του DNA (Althaus F.R. and C. Richter, 1987, De Murcia G. and J. Ménessier de Murcia, et al. 1994). Περιέχει τα πυρηνικά σήματα εντοπισμού (nuclear localization signals) και δύο δακτύλους ψευδαργύρου (εικ. 7), ενώ καταλύει την αντίδραση πολυ-ADP-ριβουσύλιωσης (εικ. 9, 10), μέσω της οποίας μεταφέρει τα πολυμερή ADP-ριβόζης σε ιστόνες και σε έναν περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνικών αποδεκτών που συμμετέχουν στη δομή της χρωματίνης και το μεταβολισμό του DNA. Η PARP-1 μετατρέπει το νικοτινάμινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο ( $\text{NAD}^+$ ) σε πολυμερή ADP-ριβόζης [poly(ADP-ribose) (PAR)], τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση της πυρηνικής ομοιόστασης (Althaus F.R. and C. Richter 1987). Η ενεργοποίηση της PARP-1 εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, και η παρεμπόδιση του σχηματισμού πολυμερών ADP-ριβόζης εξασθενίζει την ενεργοποίηση της απόπτωσης (Masutani M., et al., 1999, Kaufmann S.H, 1993).

Συσσωρευμένα στοιχεία της τελευταίας δεκαετίας προτείνουν ότι η PARP-1 συμμετέχει κυρίως σε πυρηνικά και πυρηνισκικά γεγονότα συμπεριλαμβανομένου και της επιδιόρθωσης του DNA μέσω του συστήματος BER (εικ. 9, 10, 11, 12) (Shall S. et al., 1984, Molinete M. et al., 1993), της συντήρησης της χρωμοσωμικής σταθερότητας (Wang Z.Q. et al., 1997, and Trucco C. et al., 1999) και της απόπτωσης (Lazebnik Y.A. et al., 1994, Poltronieri P. et al., 1997, Kaufmann S.H. et al., 1993, Tewari M. et al., 1995). Εντούτοις, οι μοριακοί μηχανισμοί σχετικά με το μονοπάτι της ενεργοποίησης της PARP-1 και της επιδιόρθωσης βλαβών του DNA που προκαλούνται από θερμικό σοκ χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνηση.

### A. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ PARP-1 ΩΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ DNA

Μία από τις άμεσες αντιδράσεις των ευκαρυωτικών κυττάρων στην απόκριση του κυττάρου σε θραύσεις του DNA που προκαλούν παράγοντες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι αλκυλιωτικοί και οι οξειδωτικοί παράγοντες είναι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των

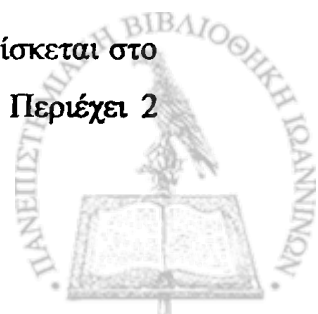


πυρηνικών πρωτεϊνών με πολυμερή ADP-ριβόζης (εικ. 10) (de Murcia G. and Shall S., 2000). Η αντίδραση καταλύεται συνήθως από την PARP-1 [poly(ADP-ribose) polymerase-1] η οποία είναι μία συνεχώς και σε αφθονία εκφραζόμενη πυρηνική πρωτεΐνη. Πριν μερικά χρόνια πειράματα σε ποντίκια που δεν εξέφραζαν την PARP-1, οδήγησαν στη διαφώτιση του πεδίου σχετικά με κάποιο νέο μέλος της οικογένειας PARP (που ονομάζεται PARP -2), καθώς επιτεύχθηκε κάποιο ποσοστό σύνθεσης πολυμερών ADP-ριβόζης μετά από επίδραση καταστροφικών παραγόντων του DNA. (Shieh W.M. et al, 1998). Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι αρκετά νέα πολυπεπίδια έχουν προσδιοριστεί με την ικανότητα σύνθεσης πολυμερών ADP-ριβόζης. Μαζί με την PARP-2 (Ame. J.C. et al, 1999; Johansson M., 1999), είναι και η PARP -3 (Johansson M., 1999), η vPARP, (Kickhoefer V.A. et al, 1999), η Τρανσανκυράση 1 και 2, που συσχετίζονται με την τελομερική πρωτεΐνη TRF1 (Chi N.W and Lodish H.F., 2000; Kaminker P.G. et al., 2001; Lyons R.J. et al., 2001; Smith S. et al., 1998) και η TiPARP (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible) (Ma Q. et. al, 2001). Αυτά τα μέλη της οικογένειας PARP έχουν όλα από κοινού μία καταλυτική περιοχή αρμόδια για τη σύνθεση πολυμερών ADP-ριβόζης. Όλα, εκτός από την PARP-1 και PARP-2, συνθέτουν πολυμερή ADP-ριβόζης ανεξάρτητα από την παρουσία του DNA.

Εντούτοις, το αμινοτελικό άκρο της PARP-1 και PARP-2 των θηλαστικών είναι ξεχωριστό (Ame J.C. et al, 1999). Αν και, στην PARP-1 καταλογίζεται το 90% της σύνθεσης πολυμερών ADP-ριβόζης, φαίνεται ότι η απουσία της PARP -2 σε κύτταρα ποντικών είναι τόσο δραματική όσο και η απουσία της PARP-1 σχετικά με την αποδοτικότητα της επιδιόρθωσης (Schreiber V. et al, 2002). Τελευταία προτείνεται ότι ίσως η PARP-1 και η PARP-2 μπορούν να δράσουν ως ετεροδιμερή όπου η απουσία της μίας ή της άλλης θα είχε την ίδια συνέπεια. Αν και περισσότερη έρευνα απαιτείται για να διασαφηνιστεί ο σχετικός ρόλος της πρόσφατα ανακαλυπτόμενης PARP-2, η PARP-1 έχει μελετηθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες και είναι μία καθιερωμένη βασική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA και της συντήρησης της γενομικής σταθερότητας κάτω από τη γενοτοξικούς παράγοντες.

Η ανθρώπινη PARP-1 είναι ένα ένζυμο μοριακού βάρους 113-kDa (EC 2.4.2.30), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ADPRT* που εδράζεται στην περιοχή 1q41-q42 (Cherney B.W. et al, 1987). Οι τρεις κύριες περιοχές που διακρίνονται στη δομή της PARP-1 και οι λειτουργίες τους αντίστοιχα είναι οι εξής (εικ. 7):

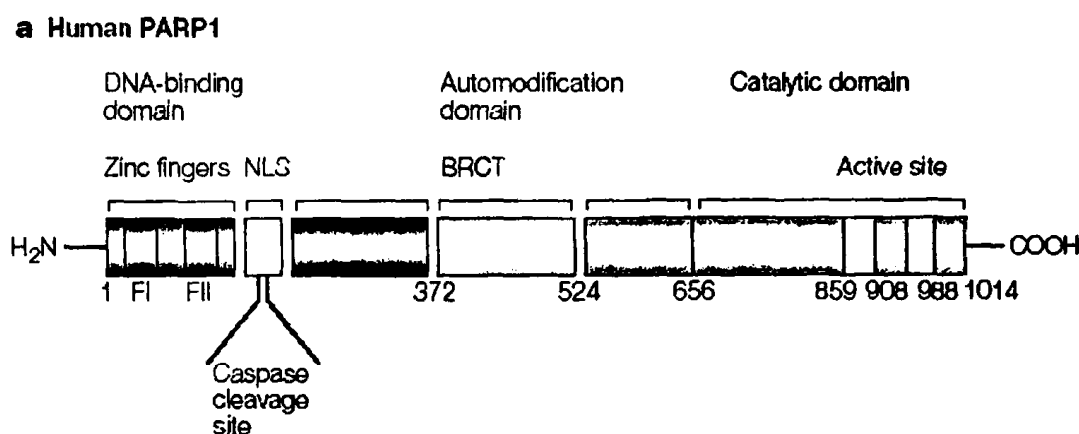
(I) περιοχή πρόσδεσης στο DNA [DNA-binding domain (DBD)]: περιοχή που βρίσκεται στο αμινοτελικό της άκρο και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση στο DNA. (εικ. 9). Περιέχει 2



δακτύλους ψευδαργύρου (FI, FII) και ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού NLS (Nuclear Localization Signal)

(II) περιοχή αυτοτροποποίησης [Automodification domain (AUTO)]: περιοχή όπου αυτοριβοσυλιώνεται η PARP-1 (εικ. 10) αλλά και μέσω της BRCT περιοχής που εμπεριέχεται στην AUTO, συνδέεται με άλλα μόρια PARP και διμερίζεται (εικ. 9) αλλά και με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν ή όχι παρόμοιες περιοχές BRCT.

(III) καταλυτική περιοχή [Catalytic domain (CD)]: περιοχή που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της και με την οποία ριβοσυλιώνει η PARP-1 τα υποστρώματά της όπως επίσης και τον εαυτό της.



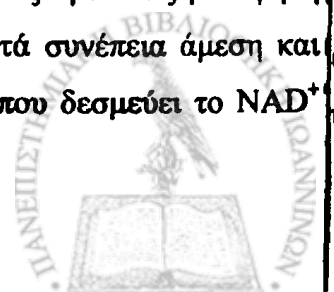
Εικ. 7: Γραμμική αναπαράσταση των περιοχών της ανθρώπινης PARP-1

**DNA-binding domain (DBD):** Περιοχή υπεύθυνη για την σύνδεση στο DNA. Περιέχει 2 δακτυλίους ψευδαργύρου (FI, FII) και ένα NLS (Nuclear Localization Signal)

**Automodification domain (AUTO):** Περιοχή όπου αυτοριβοσυλιώνεται η PARP-1 αλλά και μέσω της BRCT περιοχής της συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες αλλά και με άλλα μόρια PARP

**Catalytic domain (CD):** περιοχή με την οποία ριβοσυλιώνει η PARP-1 τα υποστρώματά της. (Jagtap P. and Szabo C. Nat. Rev. Drug Discov. 2005, 4:421)

Η PARP-1 εκφράζεται συνεχώς σε διαφορετικό όμως επίπεδο ανάλογα με τον τύπο ιστού ή κυττάρου αλλά η καταλυτική της δραστηριότητα εξαρτάται αυστηρά από τη δέσμευσή της στις θραύσεις του DNA γεγονός που μπορεί να αυξήσει την ενεργότητά της μέχρι και 500 φορές. Είναι ένα ένζυμο ιδιαίτερα συντηρημένο και έχει ανιχνευθεί στους περισσότερους ευκαρυώτες. Παρουσία θραύσεων του DNA (που προκαλούνται σε περιοχές χωρίς αζωτούχο βάση, οξειδωμένη ή αλκυλιωμένη βάση ή και άμεσα από ιοντική ακτινοβολία), η αμινο-τελική περιοχή PARP-1 (DBD) δεσμεύεται στις θραύσεις με υψηλή συγγένεια μέσω των δύο δακτύλων ψευδαργύρου, προκαλώντας κατά συνέπεια άμεση και δραστική ενεργοποίηση της καταλυτικής καρβοξυτελικής περιοχής που δεσμεύει το  $NAD^+$



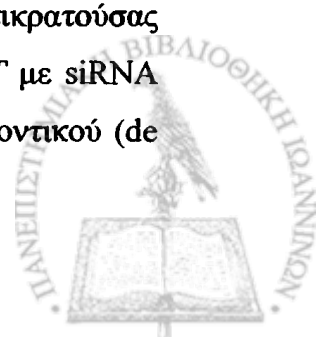
και το χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα. Αν και ήταν γνωστό για πολλά χρόνια ότι η PARP-1 είναι καταλυτικά ενεργή με τη διμερή της μορφή (Mendoza-Alvarez H. and Alvarez-Gonzalez R., 1993), μία πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η PARP-1 και η PARP-2 ομοδιμερίζονται ή ετεροδιμερίζονται και μορφοποιούν η μία την άλλη *in vitro* (Schreiber V. et al, 2002). Η σχεδόν ίδια διανομή της PARP-1 και της PARP-2 στους διάφορους ιστούς περαιτέρω προτείνει ότι και οι δύο πρωτεΐνες απαιτούνται ταυτόχρονα, αλλά η φυσιολογική σημασία του ετεροδιμερισμού PARP-1/PARP-2 δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Σε άθικτα κύτταρα, η PARP-1 η ίδια είναι η βασικότερη πρωτεΐνη που υφίσταται πολυ-(ADP-ριβουσύλιωση). Αυτή η αυτοτροποποίηση (automodification) εμφανίζεται κυρίως στην κεντρική περιοχή της που περιλαμβάνει επίσης ένα αμινικό μοτίβο αλληλεπίδρασης την BRCT περιοχή. Διάφορες επιπλέον πρωτεΐνες αποδέκτες ή και συνεργάτες της PARP-1 που συμμετέχουν στην αρχιτεκτονική του DNA ή στο μεταβολισμό του, είναι οι ιστόνες, οι τοποϊσομεράσες, η p53, η XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing group 1 protein), η YY-1 (μεταγραφικός παράγοντας Yin Yang 1), οι DNA πολυμεράσες, μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς και πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας. Μερικές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις συσχετίζονται προφανώς μέσω των πολυμερών ADP-ριβόζης που συνδέονται με την PARP-1 κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης αυτοτροποποίησης (de Murcia G and Shall S., 2000).

Είναι σημαντικό ότι η διάρκεια ζωής των πολυμερών ADP-ριβόζης σε άθικτα κύτταρα είναι σύντομη αφού τα συγκεκριμένα πολυμερή αποικοδομούνται αμέσως, υπό συνθήκες που προκαλούν θραύσεις στο DNA, λόγω του αποδοτικού καταβολισμού τους από την πολυ-(ADP-ριβόζη) γλυκοϋδρολάση [poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)] (εικ. 11) (Alvarez-Gonzalez R and Althaus F.R., 1989).

## **B. PARP-1 ΚΑΙ ΓΕΝΟΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει καταδείξει το βιολογικό ρόλο της πολυ(ADP-ριβουσύλιωσης) στην επαναφορά των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων μετά από χαμηλά ή μέτρια επίπεδα επεξεργασίας με γενετοξικούς παράγοντες όπως αλκυλιωτικοί ή ιονίζουσα ακτινοβολία (de Murcia J.M. et al., 1997; Kupper J.H. et al., 1995; Schreiber V. et al., 1995; Wang Z. Q. et al., 1997). Έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές καταστολής της πολυ(ADP-ριβουσύλιωσης), όπως ανασταλτικοί παράγοντες της PARP, έκφραση μίας επικρατούσας αρνητικής παραλλαγμένης μορφής PARP-1, γονιδιακή αποσιώπηση του *ADPRT* με siRNA τεχνολογία, ή διάσπαση του γονιδίου *Adprt1* σε σπερματική σειρά (germline) ποντικού (de



Murcia G and Shall S., 2000). Η λειτουργία της PARP-1 στο σύστημα BER, ένα επιδιορθωτικό μονοπάτι συγκεκριμένο για την αφαίρεση μικρής έκτασης βλαβών του DNA που προκαλούνται από τους παραπάνω παράγοντες, ήταν για αρκετό καιρό υποτιθέμενη μέχρι που αποδείχτηκε η άμεση εμπλοκή της στο σύμπλεγμα BER, αφού συνδέεται με την XRCC1 (Caldecott K.W. et al, 1996; Masson M. et al, 1998) και στην DNA πολυμεράση β (Dantzer F. et al, 2000).

Τα *in vivo* στοιχεία επιβεβαίωσαν τη συμμετοχή της PARP-1 στην επιδιόρθωση του DNA και τη συντήρηση της γενωμικής σταθερότητας, αφού ποντίκια που δεν εξέφραζαν PARP-1 ήταν εντυπωσιακά ευαίσθητα σε γ ακτινοβολία και τα κύτταρά τους επέδειξαν μία αυστηρή ατέλεια στην "επούλωση" των θραύσεων του DNA μετά από επεξεργασία με γενοτοξικούς παράγοντες (Dantzer F. et al, 1999). Μία από τις διαγονιδιακές σειρές ποντικών που δεν εξέφραζαν το γονίδιο *Adprt1* - παρουσίασε επίσης σημαντικά αυξημένη ευαισθησία σε μία νιτροδαμίνη, γεγονός που δίνει έμφαση στον προστατευτικό ρόλο της PARP-1 στην προκληθείσα καρκινογένεση από αλκυλιωτικούς παράγοντες (Tsutsumi M. et al, 2001). Επιπλέον διαγενετικά ποντίκια που στερούνταν της δραστηριότητας της PARP-1 στα T λεμφοκύτταρα λόγω της στοχευμένης υπερέκφρασης μίας επικρατούσας παραλλαγμένης μορφής της PARP-1 (Kupper J.H. et al, 1990), επέδειξε την ίδια αυξανόμενη ευαισθησία στην απόπτωση, παρόμοια παρεμπόδιση της επιδιόρθωσης του DNA και την ίδια θετική ρύθμιση της p53 ως απόκριση σε βλάβη του DNA, όπως και στα ποντίκια που δεν εξέφραζαν το γονίδιο *Adprt1* (Beneke R. et al, 2000). Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, η έκφραση και η δραστηριότητα της p53 βρέθηκαν υψηλότερα μετά από βλάβη του DNA αλλά η επιδιόρθωση του DNA εμποδίστηκε ανεξάρτητα από την κατάσταση του p53, κάτι που οδηγεί στην πρόταση ότι κάποια λειτουργική σύνδεση μεταξύ πολυ(ADP-ριβοσουλίσωσης) και συστήματος επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής βάσεων ανεξάρτητη της p53. Η PARP-2, το δεύτερο μέλος της οικογένειας PARP, βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του συστήματος BER, XRCC1, DNA λιγάση III και DNA ροιβ, και, οι οποίες επίσης δεσμεύονται ως συνεργάτες στην PARP-1 (Schreiber V. et al, 2002). Στην ίδια μελέτη, η απαίτηση του συστήματος BER για PARP-2, δείχτηκε *in vivo* με την χρήση της τεχνικής comet assay σε εμβρυϊκά κύτταρα ποντικού που δεν εξέφραζαν την PARP-2 και η σύνδεση μεταξύ XRCC1 και PARP-2 αποδείχθηκε ότι εξαρτάται από την παρουσία σύνθεσης πολυμερών (όπως και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης PARP-1/XRCC1).



Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχει κάποιος κοινός ρόλος των PARP-1/PARP-2 ως ετεροδιμερές στο σύστημα BER που συνδέεται πιθανώς με τη στρατολόγηση της XRCC1 και εξαρτάται από την πολυ (ADP-ριβοσυλίωση)

### Γ. Η PARP-1 ΩΣ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Σε αντίθεση με την προστασία που προσφέρει η PARP-1 σε κύτταρα πολλαπλασιαζόμενα υπό συνθήκες υποθανατηφόρες, στην περίπτωση μαζικής καταστροφής του DNA έχουμε υπερλειτουργία της PARP-1 γεγονός που οδηγεί το κύτταρο σε "αυτοκτονία" κάτι που παρατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμική αναδιάχυση (ischemia-reperfusion), το μυοκαρδιακό έμφραγμα και η φλεγμονή (εικ. 12) (Burkle A., 2001). Ποντίκια που δεν εξέφραζαν PARP-1 (*Adprt1*<sup>-/-</sup>) έδειξαν τον διπλό αυτό ρόλο της PARP-1, όπου παρατηρήθηκε το φαινόμενο "αυτοκτονίας" σε κυτταρικούς τύπους που δεν πολλαπλασιάζονται όπως σε εστίες παγκρεατικών κυττάρων (Heller B. et al, 1995) και σε νευρώνες (Eliasson M.J. et al, 1997). Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι αυτός ο θάνατος κυττάρων οφείλεται στην εξαντλητική κατανάλωση των επιπέδων NAD<sup>+</sup> σε λίγα λεπτά που προκαλούνται από την υπερβολική ενεργοποίηση της πολυ(ADP-ριβοσυλίωσης) (εικ. 12) (Berger N.A., 1985). Αυτή η "υπόθεση αυτοκτονίας" έχει επικυρωθεί σε πολυάριθμα *in vitro* μοντέλα γενετοξικού στρες και αναφέρεται ως αιτιώδες γεγονός που οδηγεί σε νέκρωση (Ha H.C and Snyder S.H., 1999).

Ένα άλλο θέμα που συζητείται είναι εάν ο θάνατος των κυττάρων που εξαρτάται από την πολυ (ADP-ριβοσυλίωση) είναι αποπτωτικού ή νεκρωτικού τύπου. Μία σχετικά πρόσφατη μελέτη καταδεικνύει τα κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα με αυτά της απόπτωσης (Yu S.W. et al, 2002). Η συμμετοχή του αποπτωτικού παράγοντα AIF (apoptosis-inducing factor), μία μιτοχονδριακή φλαβοπρωτεΐνη που απελευθερώνεται ως κυτταρική απόκριση σε θανατηφόρα ερεθίσματα, μελετήθηκε στον κυτταρικό θάνατο που συσχετίζεται με την PARP-1, σε ινοβλάστες που δεν εξέφραζαν PARP-1 (*Adprt1*<sup>-/-</sup>) αλλά και ινοβλάστες αγρίου τύπου, οι οποίοι εκτέθηκαν σε MNNG ή υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, παρατηρήθηκε ότι ο AIF μετακινήθηκε στον πυρήνα των κυττάρων μόνο του αγρίου τύπου και όχι των μεταλλαγμένων και ότι η ενεργοποίηση της PARP-1 ήταν απαραίτητη για τη δυνατότητα της μετακίνησής του. Επομένως αφού η διάσωση του κυττάρου από θάνατο που μεσολαβεί η PARP-1 είναι πιθανή μέσω καταστολής του AIF με αντισώματα, κατά συνέπεια η κατανάλωση NAD<sup>+</sup> και επομένως η ενεργειακή

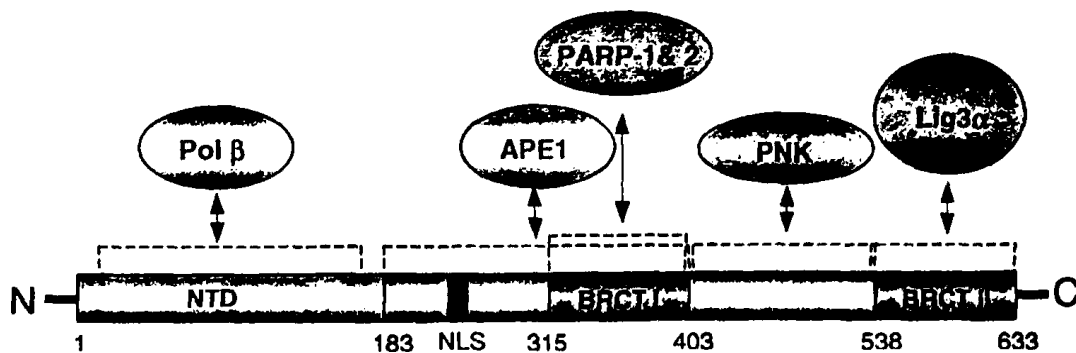


εκκένωση ίσως να μην είναι αρκετά και ενδεχομένως να ενεργούν ως σήμα που ξεκινά τον προγραμματισμένο θάνατο των κυττάρων μέσω της μετακίνησης του AIF στον πυρήνα.

Αυτός ο παθογενετικός ρόλος μη φυσιολογικής υψηλής ενεργοποίησης της PARP-1 έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανασταλτικών παραγόντων της PARP-1, που αποτελεί έναν τομέα έντονης έρευνας (Szabo C. and Dawson V.L, 1998) και αυτή η στρατηγική φαίνεται να αναδύεται ως ελπιδοφόρος θεραπευτική επιλογή για τη διάσωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια του ισχαιμικού εμφράγματος των ιστών ή των νευροεκφυλιστικών διαδικασιών γενικότερα.

#### 2.4.1.2. XRCC1

Η XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing group 1) συντονίζει και διευκολύνει τα συστήματα SSBR (επιδιόρθωση σημειακών σχάσεων / Single-Strand Break Repair) και BER (επιδιόρθωση μέσω αποκοπής βάσεων / Base Excision Repair) στα θηλαστικά κύτταρα (εικ. 11) (Nazarkina Z. K., et al, 2007). Οι λειτουργίες της έχουν αποδοθεί κυρίως στις αλληλεπιδράσεις της με τους πρωτεϊνικούς της συνεργάτες (εικ. 8).



Εικ. 8: Γραμμική αναπαράσταση των περιοχών της XRCC1 με τις οποίες συνδέεται με τις διάφορες πρωτεΐνες συνεργάτες της

Η XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing group 1) είναι μία πρωτεΐνη με βασικό ρόλο στη διευκόλυνση της επιδιόρθωσης των σημειακών θραύσεων του DNA, μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με διάφορους ενζυματικούς παράγοντες που συμμετέχουν στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς.

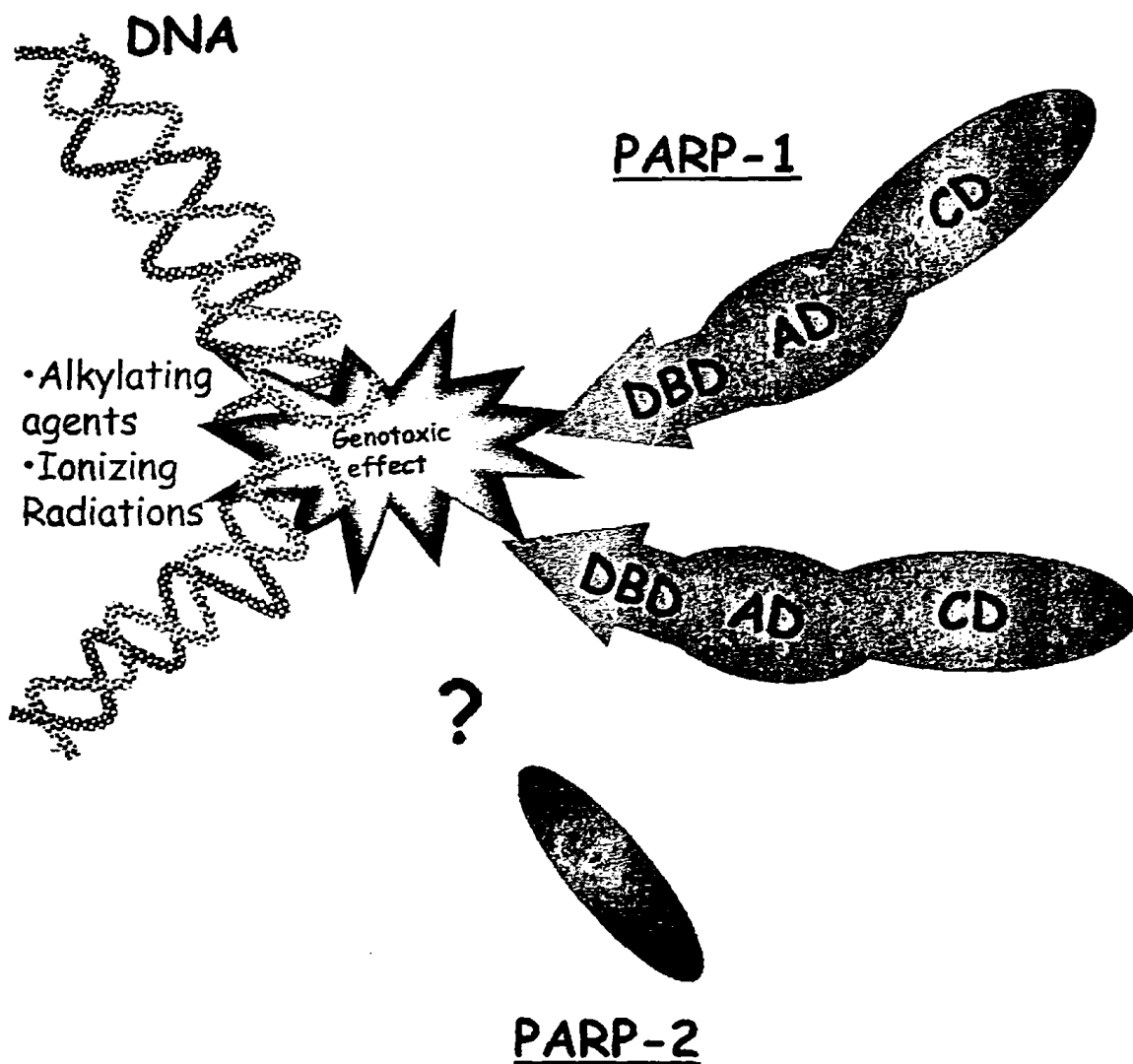
NTD: Περιοχή αμινοτελικού άκρου, σύνδεση με DNA πολυμεράση β

NLS: nuclear localisation signal

BRCT I: Περιοχή σύνδεση με PARP-1 και PARP-2

BRCT II: Περιοχή σύνδεση με DNA Λιγάση 3

(K.W. Caldecott , DNA Repair 2, 2003)

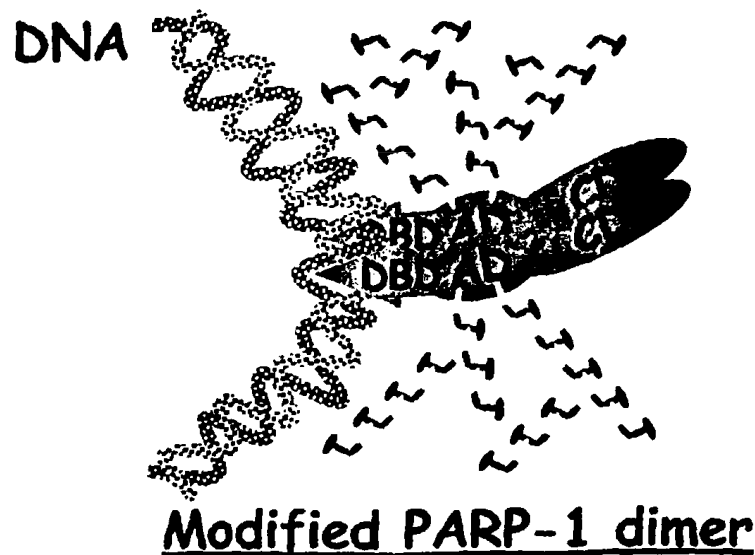
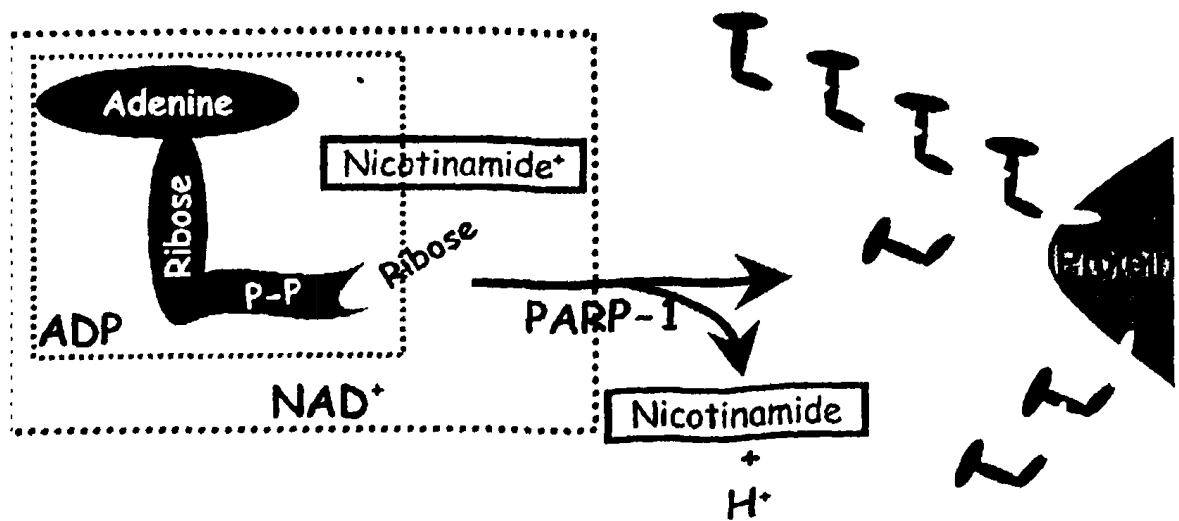


**Εικ. 9 :** Η PARP-1 ενεργοποιείται από τις σημειακές θραύσεις του DNA τα οποία και αναγνωρίζει και δεσμεύεται πάνω τους μέσω των δακτύλων ψευδαργύρου της DBD (DNA Binding Domain) περιοχής της. Η PARP-1 σχηματίζει ομοδιμερή με τον εαυτό της αλλά και ετεροδιμερή με την PARP-2. Ο ρόλος της PARP-2 δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί επακριβώς. (Marie-Laure Muiras, Ageing Research Reviews 2, 2003)

Κατά τη διάρκεια των συστημάτων BER και SSBR, αλληλεπιδρά με την πολυνουκλεοτιδική κινάση (Whitehouse CJ., 2001), την DNA polβ, την PARP-1 και την DNA λιγάση III (Caldecott KW, et al, 1996). Αποτελεί επίσης μία πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA, και αλληλεπιδρά με το δημιουργημένο άνοιγμα και την εγκοπή του DNA (εικ. 11, 12) (Marintchev A., et al, 1999, Mani RS., et al, 2004). Κύτταρα ανεπαρκή σε XRCC1 παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα χρωμοσωμικών θραύσεων και ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων σε σχέση με τα φυσιολογικά (Carrano A.V., et al, 1986, Dominguez I., et al, 1998).

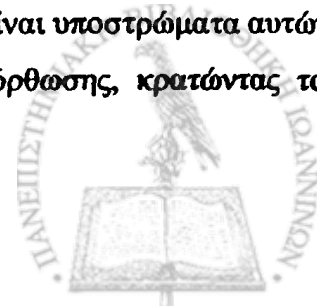


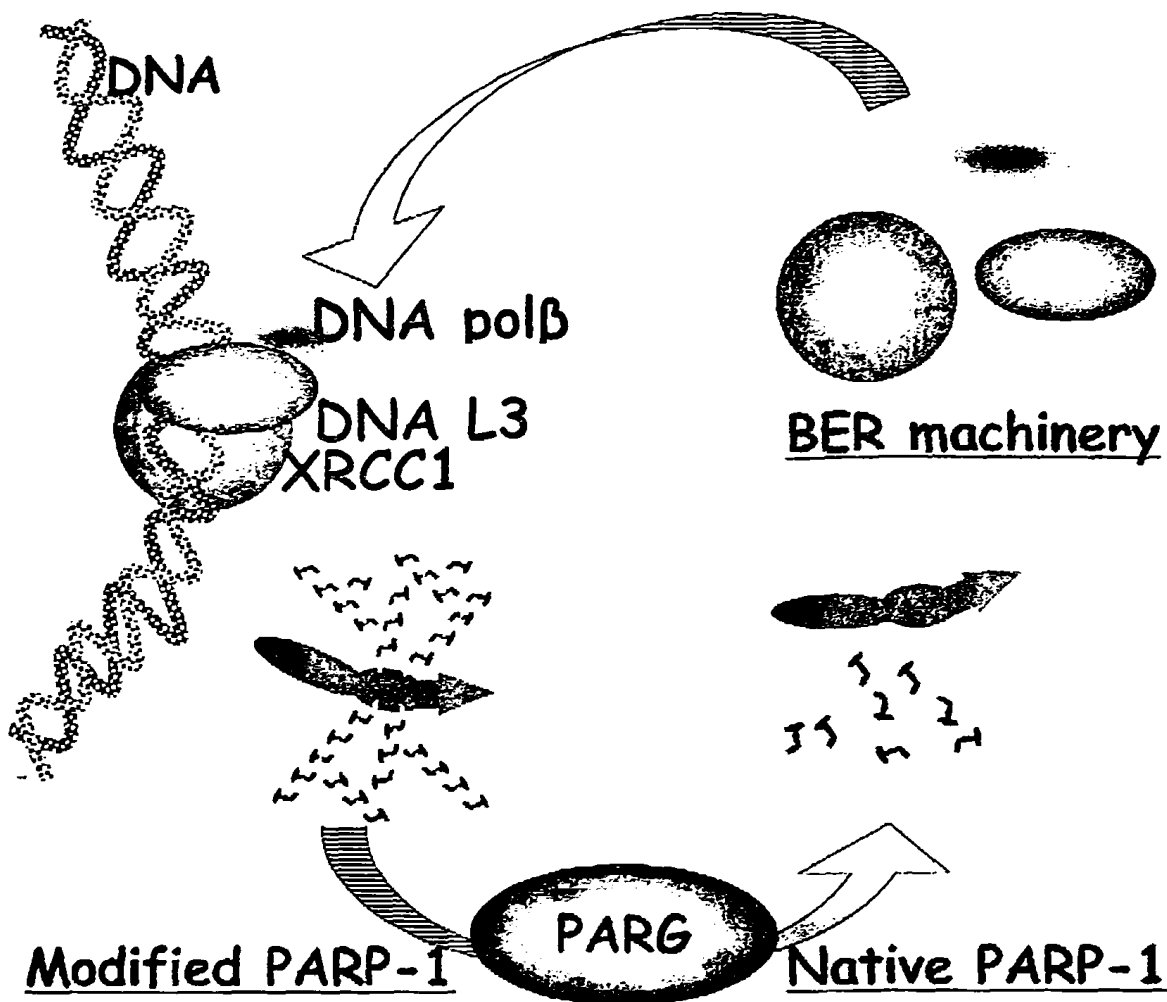




**Εικ. 10:** Η δραστηριότητα της PARP-1 εξαρτάται αποκλειστικά από τη δέσμευσή της πάνω στο DNA. Με την καταλυτική της περιοχή (CD), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το NAD<sup>+</sup>, συνθέτει πολυμερή ADP-ριβόζης πάνω σε διάφορες πρωτεΐνες (Τοποϊσομεράση, Ιστονές κ.α) όπως και στον εαυτό της προσθέτοντας τα συγκεκριμένα πολυμερή πάνω στην AD (Automodification Domain) περιοχή της. Υπολογίζεται ότι το 90% της πολυ ADP-ριβουσίωσης γίνεται από την PARP-1. (Marie-Laure Muiras, Ageing Research Reviews 2, 2003)

Τα κύτταρα που στερούνται λειτουργικής XRCC1 παρουσιάζουν ισχυρή υπερευαισθησία σε άλλους γενotoξικούς παράγοντες όπως το MMS, το EMS, την camptothecin, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), τα βαρέα μέταλλα, τις υπεριώδεις ακτινοβολίες UV-C και UV-A και τέλος τις ιονίζουσες ακτινοβολίες (Caldecott KW., et al., 2003). Προτείνεται ότι οι συνδυασμένες ικανότητες της XRCC1 να αλληλεπιδρά με τα επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA αλλά και με τα τμήματα DNA που είναι υποστρώματα αυτών των ενζύμων, επιτρέπουν μία αποδοτικότερη διαδικασία επιδιόρθωσης, κρατώντας το





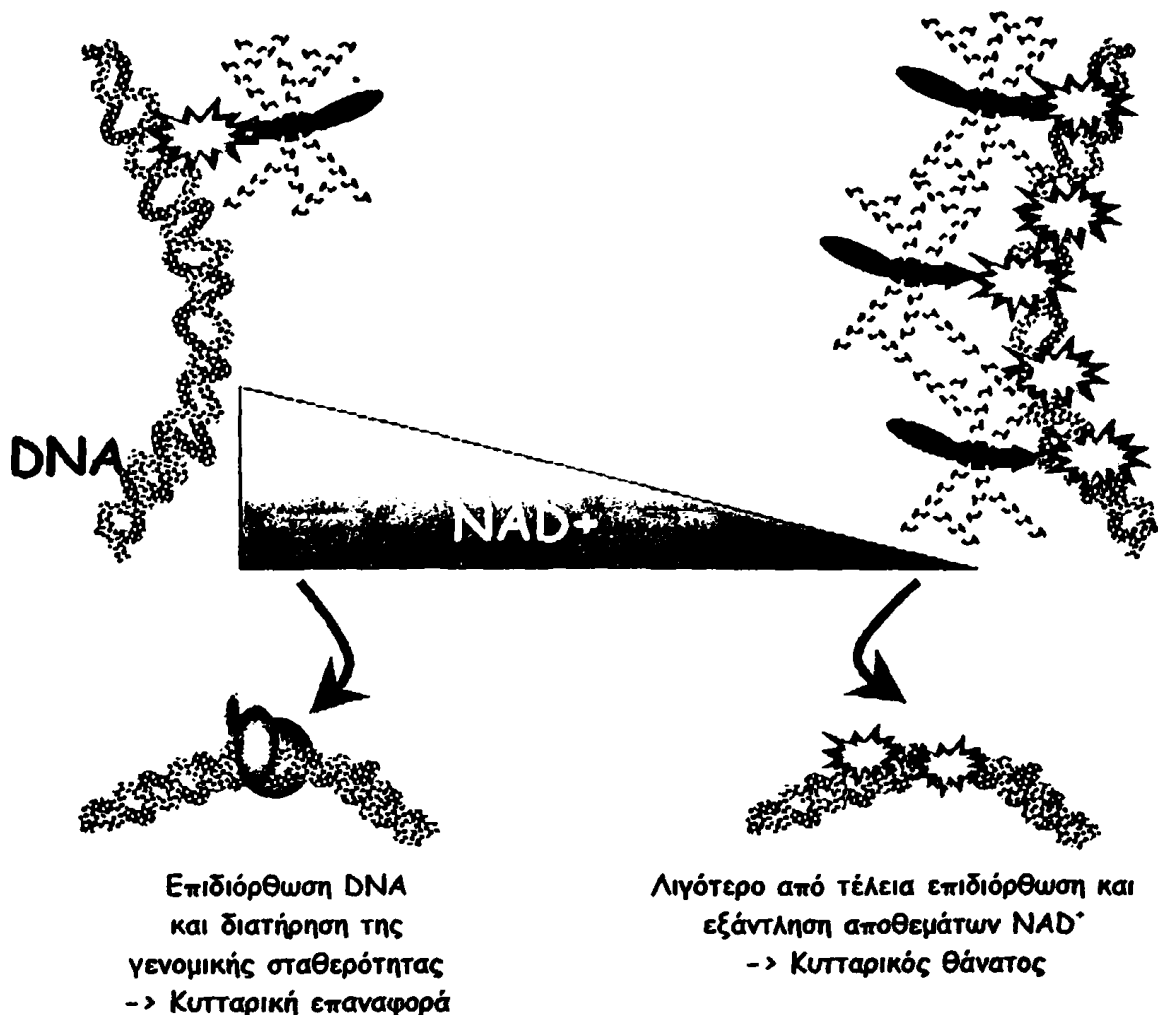
**Εικ. 11:** Η PARP-1 στρατολογεί στη σημειακή θραύση του DNA τις XRCC1, DNA L3 και DNA pol β για την ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης. Λόγω των πολυμερών ADP-ριβόζης, η PARP-1 φορτίζεται αρνητικά και απωθείται από το DNA απελευθερώνοντας έτσι την περιοχή της εγκοπής του DNA για να ολοκληρώσουν την επιδιόρθωση τα παραπάνω ένζυμα. Η πρόσθεση πολυμερών ADP-ριβόζης στις ιστόνες της περιοχής της σημειακής θραύσης ενδεχομένως να οδηγεί επίσης σε τοπικό ξετύλιγμα (relaxation) για να υποβοηθηθεί η επιδιόρθωσή του. Η PARP-1 επανέρχεται στη φυσιολογική της μορφή μέσω της PARG [poly(ADP-ribose) glycohydrolase] η οποία καταβολίζει τα πολυμερή ADP-ριβόζης.

(Marie-Laure Muiras, Ageing Research Reviews 2, 2003)

σπασμένο DNA μαζί (Rice PA., 1999), κάνοντας μία παροδική σφράγιση, και επομένως εξασφαλίζοντας ότι καμία εγκοπή του DNA δεν αφήνεται μη επιδιορθωμένη (εικ. 11).

Η περιοχή BRCT (BRCA1 C-Terminus), είναι μία 95 αμινοξέων δομή που χρησιμεύει για την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών και βρίσκεται σε έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, τον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση του DNA (Zhang X., et al, 1998, Huyton T., 2000). Πρωτοανακαλύφθηκε στο γονίδιο BRCA1 καταστολέα του καρκίνου του μαστού (Koonin et al, 1996) και αργότερα σε πολλά άλλα όπως την XRCC1, την DNA λιγάση III και την PARP-1. Η DNA λιγάση III δεσμεύεται





**Εικ. 12:** Η PARP-1 συμμετέχει στον εντοπισμό θραύσεων του DNA, στην επιδιόρθωση του DNA μέσω αποκοπής βάσεων (συστήματα BER και SSBR), στη ρύθμιση γονιδιακής σταθερότητας, στη μεταγραφή και στην απόπτωση. Τα παθοφυσιολογικά φαινόμενα προξενούνται λόγω υπερλειτουργίας της PARP-1, η οποία ενδεχομένως προκαλεί εξάντληση των αποθεμάτων  $NAD^+$  και τελικά "κυτταρική αυτοκτονία". Τα τελευταία φαινόμενα ίσως παρατηρηθούν σε ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου I, των ισχαιμικών εμφράκτων και του σηπτικού ή αμοφαγικού σοκ.

(Marie-Laure Muiras, Ageing Research Reviews 2, 2003)

έντονα στην XRCC1 διαμορφώνοντας ετεροδιμερές, μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των BRCT περιοχών τους που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Nash et al., 1997). Επίσης, μία επιπλέον περιοχή BRCT στο αμινοτελικό άκρο της XRCC1 αλληλεπιδρά με την PARP1 (Poly-[ADP-ribose] polymerase) (εικ. 8) (Masson et al, 1998). Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι οι περιοχές BRCT κατέχουν ικανότητες αλληλεπιδράσης μεταξύ των πρωτεϊνών και μπορούν είτε να συνδέονται μεταξύ διαφορετικών περιοχών BRCT είτε να αλληλεπιδρούν με άλλες άγνωστες πρωτεϊνικές πτυχές.



## 2.5. ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να αποκωδικοποιήσουμε μερικώς μία ερώτηση που έχει παραμείνει αναπάντητη από το 1984 (Welch W.J, Feramisco JR. et al., 1984). Ποιος είναι ο ρόλος της μετακίνησης και συσσώρευσης της Hsp70 στο πυρηνόπλασμα και τους πυρηνίσκους κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ; Με μία εκτεταμένη ματιά στη βιβλιογραφία μπορούμε να παρατηρήσουμε έναν περιορισμένο αριθμό μελετών που προτείνουν μία πιθανή σχέση μεταξύ των επιπέδων Hsp70 και των βλαβών του DNA (Niu P., 2006, Galvano F., et al., 2002, Calini V., et al., 2003). Επίσης, κάποια εργαστήρια προτείνουν ότι η Hsp70 ίσως να εμπλέκεται στα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA (Mendez F., et al., 2003, Bases R., et al., 2006). Πρόσφατες μελέτες επίσης έδειξαν ότι η Hsp70 ενισχύει το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA μέσω αποκοπής βάσεων (BER) στα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα μετά από ακτινοβολία ιονισμού (Bases R. et al, 2006, Mendez F, 2003). Η ομάδα μας επίσης έχει αποδείξει ότι η Hsp70 εμπλέκεται στο μηχανισμό βλαβών του DNA που προκαλούνται από υπεροξείδιο του υδρογόνου (Doulidas P-T. et al, 2007)

Συνειδητοποιώντας ότι ο πυρηνίσκος είναι βασικό οργανίδιο του συντονισμού της σύνθεσης και της οργάνωσης των ριβοσωματικών υπομονάδων (Andersen JS, et al, 2005), αναρωτιέται κανείς αν αυτή η περιοχή είναι υπό έλεγχο ενός προστατευτικού μοριακού μηχανισμού κατά των θραύσεων του DNA παρόμοιου με αυτόν του πυρηνόπλάσματος και αν κατά οποιονδήποτε τρόπο η Hsp70 συμμετέχει και στους δύο από αυτούς.

Ξεκινώντας την προσπάθειά μας τροποποιήσαμε δύο μεθόδους, μίας για την απομόνωση πυρηνίσκων και μίας για τις θραύσεις του DNA. Και οι δύο τεχνικές καθιστούν μία νέα ισχυρή μέθοδο για περαιτέρω μελέτη της πυρηνικής αποπτωτικής διαδικασίας. Χρησιμοποιώντας αυτές τις μεθόδους κατορθώσαμε να μελετήσουμε τις διαφορές στις θραύσεις του πυρηνισκικού DNA υπό φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ. Η τεχνική Comet assay σε πυρηνίσκους ("Nucleolar Comet Assay", NCA) αποκάλυψε ότι στο πυρηνισκικό DNA (rDNA), μαζί και στο πυρηνικό DNA, προκαλούνται σημειακές θραύσεις του DNA κατά τη διάρκεια της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλή θερμότητα ενώ κύτταρα ανεπαρκή σε Hsp70 ήταν πιο ευαίσθητα στην εμφάνιση βλαβών του DNA (σημειακές θραύσεις του DNA). Επιπλέον προσδιορίσαμε ότι η Hsp70 συνεντοπίζεται, στο πυρηνόπλασμα και τον πυρηνίσκο, με την PARP-1 και την XRCC1 με τις οποίες αλληλεπιδρά ταυτόχρονα. Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπ' όψιν, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η Hsp70 συσσωρεύεται στο πυρηνόπλασμα και τους



πυρηγίσκους προκειμένου να διευκολύνει τα μόρια επιδιόρθωσης του DNA επιταχύνοντας το ρυθμό δημιουργίας των επιδιορθωτικών μηχανών. Αυτό το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται ενδεχομένως μέσω των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της Hsp70 και των περιοχών BRCT της PARP-1 και της XRCC1.

3



3. ΥΛΙΚΑ

ΚΑΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ



### 3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

##### 3.1.1. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των διαφόρων κυτταρικών σειρών έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room), ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλοι οι χειρισμοί οι σχετικοί με τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής (GELMAN Instrument Laminar Air Flow class 100). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Nuaire, Autoflow, CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator) σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Ανάλογα με τις απαιτήσεις, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φιάλες, τρυβλία ή σε πολυτρυβλία, όλα μίας χρήσης. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus IM) ενώ η μακρόχρονη συντήρησή τους έγινε σε δοχείο υγρού αζώτου (-192 °C).

##### 3.1.2. Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας

###### α) Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (SIGMA). Το θρεπτικό υλικό διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O, με ταυτόχρονη προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου NaHCO<sub>3</sub> (3.7 g/l). Στη συνέχεια αποστειρώθηκε με διήθηση σε συσκευή της MILIPORE (cat.no. XX6700P10) με τη βοήθεια προφίλτρων (MILIPORE: Filter type AP cat. no. AP1504200) και φίλτρων (MILIPORE: Filter type HA 0.45 μm cat. no. HATF04700) και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C. Πριν τη χρησιμοποίηση του προστέθηκε L-γλουταμίνη (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 4 mM καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (SEROMED) σε συγκεντρώσεις 5x10<sup>4</sup> U και 5x10<sup>5</sup> μg αντίστοιχα ανά λίτρο.



## β) Διάλυμα έκπλυσης (PBS)

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS), ελλειμματικού σε ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.2: 139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.16 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα αποστειρώνεται για 25 λεπτά, στους  $121^\circ\text{C}$ , σε αυτόκαυστο (Dr Morand S.A., Switzerland) και διατηρείται στους  $4^\circ\text{C}$ .

## γ) Ορός, FCS

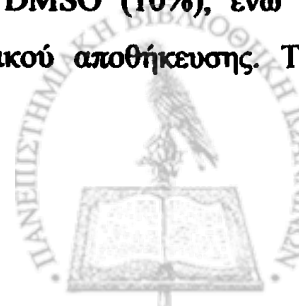
Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται αμέσως πριν τη χρήση του με ορό εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum-SEROMED, Sera Lab, GIBCO BRL) σε τελική συγκέντρωση 10%. Η προσθήκη του ορού είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού με αναπτυξιακούς παράγοντες αναγκαίους για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

## δ) Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Trypsin/EDTA)

Η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο των σκευών κυτταροκαλλιέργειας επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (Trypsin/EDTA solution, BIOCHROM KG, Berlin) 0.05%/0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS ελλειμματικού σε ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ .

### 3.1.3. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών

Κατά την αποθήκευση των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS (1X). Στη συνέχεια προστίθεται στο ταπήτιο διάλυμα θρυψίνης και τα κύτταρα μετά την αποκόλλησή τους συλλέγονται σε θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε κατάλληλο υλικό αποθήκευσης, το οποίο αποτελείται από FCS (90%) και DMSO (10%), ενώ η πυκνότητα των κυττάρων είναι  $5-6 \times 10^6$  κύτταρα ανά 1 ml υλικού αποθήκευσης. Το





εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο ψύξης (cryovial), το οποίο μεταφέρεται αρχικά στους  $-70^{\circ}\text{C}$  για 24 h και στη συνέχεια σε δοχείο υγρού αζώτου ( $-192^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.1.4. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων

Παίρνουμε ποσότητα 800 μl βακτηριακής καλλιέργειας που έχει αναπτυχθεί ολονύκτια υπό ανάδευση 250 rpm σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  σε τροχιακό επωαστήρα και τη μεταφέρουμε σε ειδικό σωληνάριο ψύξης (cryovial, CML) όπου προσθέτουμε και 200 μl γλυκερόλη. Αναδεύουμε ήπια το δείγμα και το αποθηκεύουμε στους  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Λύση κυττάρων-Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών

Προκειμένου να απομονωθεί το συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Κύτταρα που σχηματίζουν μονή στοιβάδα σε τρυβλίο, αφήνονται να αναπτυχθούν, έως ότου καταλάβουν το 100% περίπου της επιφάνειας του ταπητιού ενός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος PBS (1X).

Με ένα φύλο σιλκόνης τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου, συλλέγονται σε 10 ml PBS (1X), μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φυγοκεντρικά σωληνάκια και φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ).

Μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρείται το υπερκείμενο, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε 1 ml PBS (1X) και μεταφέρονται σε erpendorf μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια. Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5-7 δευτερόλεπτα (short spin) στις 11000 rpm στη φυγόκεντρο Eppendorf centrifuge 5417C, σε Θ.Δ. Αφαιρείται το υπερκείμενο πλήρως με αναρρόφηση υπό κενό και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300 μl διαλύματος RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 1% (w/v) Sodium deoxycolate, 0.1% (w/v) SDS ] παρουσία 1 mM PMSF, 1 μg/ml leupeptin και 1 μg/ml pepstatin.

Το εναιώρημα επωάζεται για 15 λεπτά στον πάγο, με αναδεύσεις ανά 5 λεπτά. Για την τελική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, το εναιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου και εφαρμόζονται σε αυτό διαδοχικοί παλμοί των 10 sec στα 50 Watt, οι οποίοι εναλλάσσονται με ισόχρονα διαστήματα εναπόθεσης στον πάγο (για να αποφευχθεί η υπερθέρμανσή του) και



για συνολικό χρόνο 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα.

### 3.3. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών (Bio-Rad protein assay)

Η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών, σε κάθε περίπτωση, έγινε με χρήση υλικών της εταιρείας Bio-Rad. Ο τρόπος υπολογισμού της πρωτεΐνης βασίζεται στη μέθοδο Bradford, κατά την οποία μία χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250) αλλάζει μέγιστο απορρόφησης από τα 460 nm στα 595 nm, όταν αυτή δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη. Έτσι μετρώντας σε ένα φασματοφωτόμετρο τις τιμές απορρόφησης στα 595 nm διαφορετικών αραιώσεων μίας πρωτεΐνης αγνώστου συγκέντρωσης και συγκρίνοντας αυτές με μία πρότυπη καμπύλη τιμών απορρόφησης που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις μίας πρωτεΐνης (συνήθως καθαρής αλβουμίνης βοός), είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού μας διαλύματος.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

Παρασκευάζουμε διαδοχικές αραιώσεις (από 1 μg/ml ως 25 μg/ml) της πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης, καθώς και κατάλληλες αραιώσεις της άγνωστης πρωτεΐνης. Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε dH<sub>2</sub>O και έχουν τελικό όγκο 0,8 ml. Ταυτόχρονα ετοιμάζουμε και ένα δείγμα που περιέχει μόνο dH<sub>2</sub>O και το οποίο θα αποτελέσει τον μάρτυρα κατά τη φωτομέτρηση.

Στη συνέχεια προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα 0,2 ml διαλύματος χρωστικής και τα αναδεύουμε ήπια αρκετές φορές.

Μετά από 5 λεπτά επώασης, ακολουθεί φωτομέτρηση (BECKMAN DU520) σε μήκος κύματος 595 nm και με δείγμα αναφοράς αυτό του μάρτυρα, κατασκευή πρότυπης καμπύλης και υπολογισμός της άγνωστης συγκέντρωσης.

### 3.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών, υπό μετουσιωτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση μίας διαστάσεως σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli. Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων



πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζονται η πηκτές πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες χωρίζονται σε δύο μέρη:

i) την πηκτική επιστοιβαξης, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μεγάλο μέγεθος πόρων και

ii) την πηκτική διαχωρισμού, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 10% [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μικρότερο μέγεθος πόρων.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου-SDS σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (Laemmli U.K., 1970). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζεται η πηκτική πολυακρυλαμιδίου η οποία χωρίζεται σε δύο μέρη, την πηκτική επιστοιβαξης [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτική διαχωρισμού [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μικρότερο μέγεθος πόρων.

Τα μίγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη TEMED (SIGMA). Ο πολυμερισμός της πηκτικής έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα των πρωτεϊνών ξηραίνονται σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού, επαναιωρούνται σε 20-30 μl διάλυμα φόρτωσης [62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenol blue] και θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100° C. Ακολούθως, φορτώνονται στην πηκτική και η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται σε περίπου 250V σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris- HCl, 192 mM Glycine, 0.1% SDS). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές με χρώση της πηκτικής για 30 λεπτά περίπου, υπό ανάδευση, σε διάλυμα χρωστικής Coomassie [0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 9.2% (v/v) acetic acid, 45.5% methanol]. Ο αποχρωματισμός γίνεται, υπό ολονύκτια ανάδευση, σε διάλυμα αποχρωματισμού [25% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid].

### 3.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και εφόσον λάβει χώρα η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, η πηκτική καταβυθίζεται σε διάλυμα μεταφοράς [0.58% (w/v) Tris-HCl, 0.292% Glycine, 20% (v/v) Methanol] για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο ίδιο



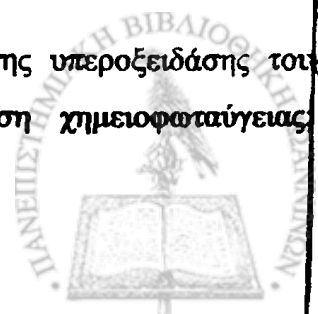
διάλυμα μεταφέρονται και 4 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού Whatmann 3MM, καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης Hybond C (AMERSHAM), τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής.

Στη συνέχεια και προκειμένου για πηκτές μικρών διαστάσεων (mini gels), τα κομμάτια τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς, φέρονται στην επιφάνεια του ακίνητου ηλεκτροδίου συσκευής ημι-ξηρής πρωτεϊνικής ηλεκτρομεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BIORAD) με την ακόλουθη σειρά: 2 κομμάτια χαρτιού Whatmann-μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-πηκτική-2 κομμάτια χαρτιού Whatmann. Με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, απομακρύνουμε τις φυσαλίδες μεταξύ των κομματιών και εν συνεχεία εφαρμόζουμε στην επιφάνειά τους το δεύτερο ηλεκτρόδιο της συσκευής (αρνητικός πόλος). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε σταθερή τάση 15 Volt για 30 λεπτά. Μετά το τέλος αυτής, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα PBSw (western blot, 1X) παρουσία σκόνης μη λιπαρού γάλακτος [3% (w/v)], και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 2h προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές συνδέσεις της μεμβράνης.

Ακολούθως η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, με 300 ml διαλύματος PBSw (1X). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε σε 10 ml διαλύματος PBSw (1X), παρουσία BSA [3% (w/v)], σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1h υπό ανακίνηση.

Μετά το τέλος της επώασης, η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, με 300 ml διαλύματος PBSw (1X), παρουσία Tween-20 [0.05% (w/v)], προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους προέλευσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Η επώαση γίνεται σε 10 ml διαλύματος PBSw (1X), παρουσία σκόνης μη λιπαρού γάλακτος [2.5% (w/v)], και διαρκεί για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-Hsp70 (Stressgen, SPA-810) (αραίωση 1:2500), anti-Hsc70 (Stressgen, SPA-815) (αραίωση 1:2500), anti-Hsp40 (Stressgen, SPA-810) (αραίωση 1:500), anti-PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , H-250, sc-7150) (αραίωση 1:1000), anti-XRRC1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , H-250, sc-7150) (αραίωση 1:1000), anti- $\alpha$  tubulin (Sigma, T 5168) (αραίωση 1:10000), anti-GST (Amersham) (αραίωση 1:1000)

Το δευτεροταγές αντίσωμα φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας



Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-mouse IgG (H+L) Peroxidase conjugated (Pierce, 31430) (αραίωση 1:5000), anti-rabbit IgG (H+L) Peroxidase conjugated (Pierce, 31460) (αραίωση 1:5000) , anti-goat IgG (H+L) Peroxidase conjugated (Jackson ImmunoResearch, 67771) (αραίωση 1:5000).

Μετά το τέλος και της δεύτερης επώασης, η μεμβράνη υφίσταται 2 εκπλύσεις με τις ίδιες συνθήκες, όπως παραπάνω, και ακολουθεί η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και η ανίχνευση της πρωτεΐνης.

### 3.6. Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation)

Προκειμένου να ελέγξουμε τις ειδικές αλληλεπιδράσεις των προς εξέταση πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της ανοσοκαθίζησης, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιούμε τα εξής:

Λαμβάνεται ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που καλύπτουν πλήρως την επιφάνεια του ταπητιού τρυβλίου διαμέτρου 10 cm.

Στο κυτταρικό εκχύλισμα προσθέτουμε 20 μl εναιωρήματος μίγματος πρωτεϊνών A και G (σε αναλογία 1:1) συνδεδεμένων σε σφαιρίδια σεφαρόζης. Ακολουθεί επώαση υπό ανακίνηση, στους 4 °C για 2 h, προκειμένου να επιτευχθεί η προ-προσρόφηση του κυτταρικού εκχυλίσματος, κατά την οποία απομακρύνονται πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται μη ειδικά με τις πρωτεΐνες A και G.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 rpm, στους 4 °C για 5 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προστίθεται ποσότητα 1 μg του αντισώματος έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης, καθώς και διάλυμα BSA (1 mg/ml) για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Το δείγμα επωάζεται υπό ανακίνηση, στους 4 °C για τουλάχιστον 12 h. Στο δείγμα προστίθενται 20 μl εναιωρήματος αποτελούμενο από σφαιρίδια σεφαρόζης και μίγμα πρωτεϊνών A/G και η επώαση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για επιπλέον 2 h.

Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 rpm, στους 4 °C για 5 λεπτά. 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.



Μετά το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 40 μl διάλυμα φόρτωσης SDS-PAGE (1.5X). Πριν την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE, το δείγμα υφίσταται αφενός μεν, βρασμό στους 100 °C και ισχυρή ανάδευση ώστε να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια σεφαρόζης, αφετέρου δε, φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5 sec σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf έτσι ώστε να ιζηματοποιηθούν πάλι τα σφαιρίδια και να μείνουν στο υπερκείμενο οι πρωτεΐνες.

### 3.7. Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (Immunofluorescence)

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των εξεταζομένων πρωτεϊνών κατέστη δυνατός με τη χρήση της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού, σύμφωνα με την οποία ακολουθούμε τα εξής:

Κύτταρα τοποθετούνται πάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες (2x2 cm) εντός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm, σε πυκνότητα  $2,5 \cdot 10^6$  κύτταρα/τρυβλίο και αφήνονται να αναπτυχθούν για δύο ημέρες.

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 λεπτά με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης [2% (w/v) σε PBS] σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την μονιμοποίησή τους, τα κύτταρα εκπλένονται 2-3 φορές με διάλυμα PBS (1X) και επώάζονται με παγωμένη καθαρή μεθανόλη για 3-5 λεπτά στους 20 °C. Ακολουθεί ξανά έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS (1X) και επώαση αυτών με διάλυμα PBS (1X) παρουσία BSA [3% (w/v)] για 30-60 λεπτά στους 37 °C για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες επώάζονται με κατάλληλη αραιώση του ειδικού αντισώματος, έναντι της πρωτεΐνης που εξετάζουμε, σε διάλυμα PBS (1X), παρουσία BSA [1% (w/v)] για 30-40 λεπτά στους 37 °C. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-Hsp70 (Stressgen, SPA-810) (αραίωση 1:200), anti-Hsp40 (Stressgen, SPA-810) (αραίωση 1:200), anti-PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , H-250, sc-7150) (αραίωση 1:200), anti-XRRC1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , H-250, sc-7150) (αραίωση 1:200).

Ακολουθεί ξανά έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS (1X) και επώαση αυτών με κατάλληλη αραιώση αντισώματος, έναντι ανοσοσφαιρινών είδους προέλευσης του πρώτου αντισώματος και συγκεκριμένα anti-mouse IgG FITC conjugate (Sigma – Aldrich, F 5897) (αραίωση 1:400) ή anti-rabbit IgG TRIC conjugate (Texas Red) (Sigma – Aldrich, T 6778)

(αραίωση 1:400). Το αντίσωμα βρίσκεται σε διάλυμα PBS (1X), παρουσία BSA [1% (w/v)] και η επώαση γίνεται στους 37 °C και διαρκεί για 30-40 λεπτά.

Τέλος οι καλυπτρίδες εκπλένονται με διάλυμα PBS (1X), μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nicon Microphot-FXA) και φωτογράφιση σε φιλμ Fujicolor 400 ASA.

### 3.8. Απονόμωση πυρήνων-πυρηνίσκων από κύτταρα

Συλλέγουμε τα κύτταρα ( $3 \cdot 10^8$  κύτταρα) σε παγωμένο PBS και τα τοποθετούμε στον πάγο. Τα φυγοκεντρούμε σε 500 g για 5 λεπτά.

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε δεκαπενταπλάσιο όγκο (1,5 ml) υποτονικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl και 1 mM  $MgCl_2$ ) και αφήνονται στον πάγο για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε δείγμα 0,3% Nonidet P-40 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) και κάνουμε ομογενοποίηση.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1200 g για 3 λεπτά και οι πυρήνες (ίζημα) επαναιωρούνται σε δεκαπλάσιο όγκο (500  $\mu$ l) διαλύματος 0,25 M σουκρόζης, 10 mM  $MgCl_2$ , ενώ το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό κλάσμα) μπορεί να συλλεχθεί για περαιτέρω ανάλυση.

Οι πυρήνες καθαρίζονται, περνώντας τους από 500  $\mu$ l διαλύματος 0,88 M σουκρόζης, 0,05  $\mu$ M  $MgCl_2$  αφού φυγοκεντρηθούν σε 1200 g για 10 λεπτά. Οι καθαροί πυρήνες επαναιωρούνται σε δεκαπλάσιο όγκο (250  $\mu$ l) διαλύματος 0,34 M σουκρόζης και 0,05 mM  $MgCl_2$ . Στην συνέχεια η πυρηνική μεμβράνη τους διασπάται με υπέρηχους. Το διάλυμα που προκύπτει, μετά τους υπέρηχους, το περνάμε από 250  $\mu$ l διαλύματος 0,88 M σουκρόζης, 0,05  $\mu$ M  $MgCl_2$  φυγοκεντρώντας σε 2000 g για 20 λεπτά.

Οι καθαροί πυρηνίσκοι (ίζημα) επαναιωρούνται σε 100  $\mu$ l διαλύματος 0,34 M σουκρόζης, 0,05 mM  $MgCl_2$  ή σε διάλυμα RIPA αν είναι να χρησιμοποιηθούν για πειράματα ανοσοκαθίζησης, ενώ το υπερκείμενο (πυρηνικό κλάσμα) μπορεί να συλλεχθεί για περαιτέρω αναλύσεις.



### 3.9 Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων πυρήνων-πυρηνίσκων σε πηκτή αγαρόζης (Comet Assay in nucleus-nucleolus, NCA)

Τα δείγματά μας (πυρήνες, πυρηνίσκοι) επαναιωρούνται σε 100 μl 1,5% αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (L.M.P. Agarose) σε PBS, pH 7.4, στους 37 °C.

Τα δείγματά μας με την αγαρόζη (L.M.P) τοποθετούνται με την πιπέτα επάνω σε μία αντικειμενοφόρο που έχει επικαλυφθεί με μία στρώση 1% κανονικής αγαρόζης σε PBS και αμέσως τοποθετούμε από πάνω μία καλυπτρίδα χωρίς να την πιέσουμε. (Στρώση αντικειμενοφόρων: το δ/μα κανονικής αγαρόζης θερμαίνεται σε ποτηράκι και το ύψος του όγκου του δ/τος φροντίζουμε να είναι ίσο με το ύψος μίας καλυπτρίδας, έτσι ώστε όταν βουτήξουμε την αντικειμενοφόρο μέσα στο δ/μα κανονικής αγαρόζης να σχηματιστεί μία 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 λεπτά και στη συνέχεια αφαιρούμε τις καλυπτρίδες προσεκτικά και εμβαπτίζεται σε διάλυμα λύσης (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, NaOH to pH 10, και 1% Triton X-100) στους 4 °C για 60 λεπτά, για την απομάκρυνση των κυτταρικών πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια το σύνολο πλένεται με ψυχρό PBS pH 7.4 (3 πλύσεις των 5 λεπτών) και τοποθετείται στο δοχείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής που φέρει ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (unwinding buffer) 0.3 M NaOH και 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH>13), (το δ/μα αυτό φτιάχνεται πάντα φρέσκο). Αφήνουμε για 40 λεπτά στους 4 °C. (Καλό είναι να υπάρχει σκοτάδι γιατί το φως προκαλεί καταστροφή στο DNA. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται με την ίδια φορά πάνω στη συσκευή).

Ηλεκτροφορούμε με το ίδιο διάλυμα στα 30 V και 300 mA για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C (η θερμοκρασία δεν πρέπει να ξεπεράσει τους 15 °C).

Μετά οι αντικειμενοφόροι με τα δείγματα πλένονται με ψυχρό PBS pH 7.4 (3 πλύσεις των 5 λεπτών) και στη συνέχεια βάφουμε με 50 μl DAPI (5 μg/ml PBS). Ξεπλένουμε με ψυχρό PBS pH 7.4 μία φορά (5 λεπτά) και παρατηρούμε τα δείγματα στο φωτόμετρο (350 nm).





### 3.10. DNA fragmentation (laddering) of nucleus-nucleolus

Συλλέγουμε τα κύτταρα ( $3 \cdot 10^8$  κύτταρα) σε παγωμένο PBS και τα τοποθετούμε στον πάγο. Τα φυγοκεντρούμε σε 500 g για 5 λεπτά.

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε δεκαπενταπλάσιο όγκο (1,5 ml) υποτονικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl και 1 mM  $MgCl_2$ ) και αφήνονται στον πάγο για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε δείγμα 0,3% Nonidet P-40 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) και κάνουμε ομογενοποίηση.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1200 g για 3 λεπτά και οι πυρήνες (ίζημα) επαναιωρούνται σε δεκαπλάσιο όγκο (500  $\mu$ l) διαλύματος 0,25 M σουκρόζης, 10 mM  $MgCl_2$ , ενώ το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό κλάσμα) μπορεί να συλλεχθεί για περαιτέρω ανάλυση.

Οι πυρήνες καθαρίζονται, περνώντας τους από 500  $\mu$ l διαλύματος 0,88 M σουκρόζης, 0,05  $\mu$ M  $MgCl_2$  αφού φυγοκεντρηθούν σε 1200 g για 10 λεπτά.

Οι καθαροί πυρήνες (ίζημα) επαναιωρούνται σε 100  $\mu$ l παγωμένο DNA Lysis Buffer (1X) [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA pH 8, 0.5% Triton X-100]. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.

Στη συνέχεια το διάλυμα που προκύπτει (σπασμένοι πυρήνες) το περνάμε από διάλυμα 0,88 M σουκρόζης, 0,05  $\mu$ M  $MgCl_2$  φυγοκεντρώντας σε 2000 g για 20 λεπτά στους 4 °C.

Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (νουκλεοπλασματικό DNA) σε νέο erpendorf και επαναιωρείται σε παγωμένο DNA Lysis Buffer (6X), ενώ το ίζημα (πυρηνίσκοι) επαναιωρείται σε παγωμένο DNA Lysis Buffer (1X). Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.

Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C.

Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (DNA) σε καθαρά erpendorf και τα δείγματα επώάζονται στους 37 °C παρουσία 0,2 mg/ml RNase A για 2 h, και στη συνέχεια για άλλες 2 h στις ίδιες συνθήκες παρουσία 0,25 mg/ml Proteinase K.

Προσθέτουμε 20  $\mu$ l διαλύματος 5M NaCl και 120  $\mu$ l ισοπροπυλικής αλκοόλης (οι όγκοι αυτοί αντιστοιχούν σε 100  $\mu$ l δείγματος) και τα δείγματα αφήνονται στους 20 °C O/N.

Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C, αφαιρούμε το υπερκείμενο, ξηραίνουμε το ίζημα και τέλος το επαναιωρούμε προσεκτικά σε 15  $\mu$ l διαλύματος TE pH 7,4.



Προσθέτουμε στα δείγματα DNA loading buffer και τα ηλεκτροφορούμε σε 1,2% πηκτή αгарόζης.

### 3.11. Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA (PARIS kit, AMBION)

1.α) Τρυψινοποίηση. Επαναιώρηση σε 10 ml DMEM σε universal. Φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 3 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε 1 ml DMEM σε erpendorf.

β) Φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 3 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε 1 ml PBS. Αφήνεται το δείγμα στον πάγο.

2. α) Φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 3 λεπτά και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 300 μl Cell Fractionation Buffer. Διατηρείται στον πάγο.

β) Πιπετάρουμε ήπια.

3) Επώαση για 10 λεπτά πάγο.

4) Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4 °C σε 500xg.

5) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το βάζουμε σε erpendorf (στον πάγο).

6) Προσθέτω 300 μl 2x Lysis/Binding Solution σε θερμοκρασία δωματίου. Πιπετάρουμε ήπια.

7) Προσθέτουμε 300 μl 100% αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Πιπετάρουμε ήπια.

8) Εφαρμόζουμε το Filter cartridge στο Collection tube. Βάζουμε το πολύ 700 μl δείγματος στο Filter cartridge και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Πετάμε το υγρό που φιλτραρίστηκε και βάζουμε το υπόλοιπο δείγμα να φιλτραριστεί ακριβώς με τον ίδιο τρόπο. Πετάμε και το υπόλοιπο φιλτραρισμένο υγρό ενώ κρατάμε το Collection tube.

9) Βάζουμε σε κάθε Filter cartridge 700 μl Wash Solution 1 και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Πετάμε το φιλτραρισμένο υγρό.

i) Προσθέτουμε 500 μl Wash Solution 2/3 και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Πετάμε το φιλτραρισμένο υγρό.

ii) Προσθέτουμε ξανά 500 μl Wash Solution 2/3 και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Πετάμε το φιλτραρισμένο υγρό.

iii) Φυγοκεντρούμε για 30sec για να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη του Wash Solution 2/3.

10) Εφαρμόζουμε καινούριο Collection tube στα Filter cartridges.



i) Προσθέτουμε 40  $\mu$ l Elution Solution το οποίο πριν έχει θερμανθεί στους 95 °C (για να καταστραφούν οι RNAses αν υπάρχουν ενώ στη συνέχεια το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου). Το ρίχνουμε στο κέντρο του Filter cartridge και φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 30 sec.

ii) Προσθέτουμε ξανά 10  $\mu$ l Elution Solution και φυγοκεντρούμε όπως και πριν.

11) Αποθηκεύουμε το RNA που υπάρχει στα Collection tubes στους -80 °C.

### 3.12. Καθαρισμός RNA με DNase.

Προσθέτουμε 5  $\mu$ l DNase (free RNase) σε 50  $\mu$ l RNA (διάλυμα). Επωάζουμε για 30 λεπτά σε 37 °C.

Προσθέτουμε 50  $\mu$ l ακόμη Elution Solution για να έχουμε μεγαλύτερο όγκο δείγματος (100  $\mu$ l).

Προσθέτω ίδιο όγκο (100  $\mu$ l) φαινόλης και πιπετάρουμε.

Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 2 λεπτά σε 4 °C.

Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο, όπου υπάρχει διαλυμένο το RNA, και το βάζω σε eppendorf στον πάγο.

Προσθέτουμε 100  $\mu$ l διαλύματος 49/1 χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη και ανακατεύουμε.

Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 2 λεπτά σε 4 °C.

Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο (RNA διαλυμένο) και το βάζουμε σε νέο eppendorf στον πάγο.

Προσθέτουμε 50  $\mu$ l οξικό αμμώνιο 7.5 M και 250  $\mu$ l απόλυτη αιθανόλη και πιπετάρουμε.

Αφήνουμε το μίγμα να επωασθεί για 1 ώρα σε -80 °C.

Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 15 λεπτά σε 4 °C. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα (RNA) σε 1 ml παγωμένη αιθανόλη.

Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 15 λεπτά σε 4 °C. Πετάμε το υπερκείμενο, ξηραίνουμε το ίζημα (RNA) στους 37 °C και τέλος το επαναιωρούμε σε 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O.

### 3.13. RT-PCR

Η μελέτη των επιπέδων RNA της Hsp70 έγινε με τη βοήθεια των οδηγιών του πακέτου QIAGEN One Step RT-PCR:



- Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήσαμε 1 µg RNA, 3,4 µl πρότυπων εκκινητών (100 ng/µl), 2 µl dNTPs (10 mM), 10 µl 5x QIAGEN One Step RT-PCR Buffer, 2 µl QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix και συμπληρώσαμε με νερό αποστειρωμένο σε τελικό όγκο 50 µl και στη συνέχεια προσθέσαμε 40 µl αποστειρωμένου λαδιού.

Οι συνθήκες για την RT-PCR αντίδραση ήταν οι παρακάτω:

- Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription): 50 °C , (30 λεπτά)
- Αρχικό βήμα ενεργοποίησης PCR (initial PCR activation step): 95 °C, (15 λεπτά)
- Θερμική αποδιάταξη (denaturation): 94 °C , (1 λεπτό).
- Πρόσδεση εκκινητών (annealing) : 66 °C , (1 λεπτό)
- Επιμήκυνση αλυσίδων (elongation) : 72 °C , (1 λεπτό)
- Αριθμός θερμικών κύκλων : 25
- Τελική επιμήκυνση (final elongation): 72 °C, (10 λεπτά)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν :

για την Hsp70

(5'-Hsp70-UTR, 5'-TTCCAGCCCCCAATCTCAGAGCCGAGCCGACAGAGA-3' και 3'-TRG, 5'-CATGAAGCACTGGCCTTCCAGGTGATCAACGACGGAGAC),

για την dj2

(Dnaj 5' SalI, 5'- ACCGGCAGTCGACGATGGTG AAAGAAACAACCTTA-3'; και 3'-Jdom-EcoRI, 5'-CCCTCTTTGAATTCCTGTTCTCCTCCTTTG- 3').

### 3.14. Διαδικασία δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων BL21/ED

Εμβολιάζουμε μικρή ποσότητα (περίπου 50 µl) με βακτήρια BL21/ED<sub>3</sub> σε ποσότητα 20 ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας βακτηρίων LB (Luria Broth, 10 gr Bacto-Tryptone, 5gr Yeast extract και 10 gr NaCl σε 1L H<sub>2</sub>O το οποίο και αποστειρώνεται) χωρίς αμπικιλίνη κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Αφήνουμε την καλλιέργεια να αναπτυχθεί υπό ανάδευση 250 rpm σε θερμοκρασία 37 °C σε τροχιακό επωαστήρα, έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έχει τιμή A<sub>600</sub>= 0.3-0.6 (περίπου 2 ώρες). Μοιράζουμε το διάλυμα των 20 ml σε δύο σωληνάκια των 10 ml κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 2 ml διαλύματος CaCl<sub>2</sub> (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, 10 mM PIPES) για κάθε σωληνάκι. Φυγοκεντρούμε στις 3500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 2 ml διαλύματος  $\text{CaCl}_2$  για κάθε σωληνάκι. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 3500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  κατάλληλου όγκου ανάλογα με τον αριθμό των aliquots που θέλουμε στη συνέχεια να μοιράσουμε τα κύτταρα (κάθε aliquot έχει 100  $\mu\text{l}$ ). Τέλος αποθηκεύουμε τα aliquots των επιδεκτικών κυττάρων στους  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.15. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων (Transformation)

Τοποθετούμε τα aliquots με τα επιδεκτικά κύτταρα στον πάγο για να ξεπαγώσουν σιγά-σιγά. Στη συνέχεια μεταφέρουμε τα 100  $\mu\text{l}$  από κάθε aliquot σε σωληνάκι των 10 ml και προσθέτουμε 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι. Επωάζουμε 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ  $42^\circ\text{C}$  σε υδατόλουτρο για 2 λεπτά. Τοποθετούμε στον πάγο για 1 λεπτό και στη συνέχεια προσθέτουμε 1 ml διαλύματος LB σε κάθε δείγμα το οποίο και αναδεύουμε ήπια με το χέρι. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους  $37^\circ\text{C}$  σε υδατόλουτρο για 1 ώρα. Κατόπιν απλώνουμε σε τρυβλία με άγαρ (περιέχει αμπικιλίνη 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) κάποια ποσότητα κυττάρων από το κάθε δείγμα (συνήθως 25-100  $\mu\text{l}$ ) και επωάζουμε ολονύκτια στον κλίβανο στους  $37^\circ\text{C}$  (τοποθέτηση των τρυβλίων ανάποδα). Εάν επιθυμούμε να έχουμε αρνητικό control τότε σε κάποιο δείγμα αντί για πλασμίδιο προσθέτουμε 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.16. Παρασκευή πλασμδιακού DNA μικρής κλίμακας (Plasmid Mini-Preparation DNA).

Μεταφέρουμε, υπό ασηπτικές συνθήκες, από κάθε τρυβλίο με άγαρ όπου υπάρχουν οι βακτηριακοί κλώνοι, μία μοναδιαία αποικία και την εμβολιάζουμε σε μία ποσότητα 3 ml θρεπτικού υλικού LB που περιέχει αμπικιλίνη 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  σε σωληνάκι των 10 ml. Αφήνουμε την καλλιέργεια να αναπτυχθεί υπό ανάδευση 250 rpm σε θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$  σε προχιακό επωαστήρα ολονύκτια, (τα τρυβλία με άγαρ που περιέχουν τους βακτηριακούς κλώνους αποθηκεύονται στους  $4^\circ\text{C}$ , μέχρι να επιβεβαιωθούν ότι οι αποικίες που πήραμε είναι οι κατάλληλες και στη συνέχεια να αποθηκευτούν).

Από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια παίρνουμε 1 ml και το μεταφέρουμε σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια. Φυγοκεντρούμε σε 13000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία



δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και στη συνέχεια προσθέτουμε σε κάθε κυτταρικό ίζημα 70 μl διαλύματος STET buffer (8% sucrose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8 και 50 mM Tris-HCl pH 8) στο οποίο και επαναιωρούμε τα κύτταρα. Στη συνέχεια προσθέτουμε 25 μl λυσοζύμη (από stock 10 mg/ml) και κάνουμε vortex 3-5 sec. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και βρασμός για 45 sec για να απενεργοποιηθεί η λυσοζύμη. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε σε 13000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέγουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Προσθέτουμε 100 μl ισοπροπανόλη και κάνουμε vortex για 2-3 sec. Ακολουθεί επώαση στους -70 °C για 15 λεπτά και τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 13000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα (πλασμίδιο) να στεγνώσει για 15 λεπτά. Τέλος επαναιωρούμε το ίζημα σε 20 μl TE (1x) (ίσως χρειαστεί να θερμανθεί το ίζημα στους 37 °C για 5 λεπτά για την καλύτερη επαναδιαλυτοποίησή του) και το αποθηκεύουμε στους -20 °C.

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

### 3.17. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη σε μικρή κλίμακα

Για την επαγωγή της έκφρασης των χμιαϊκών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BL21/ED<sub>3</sub> της E.coli ως πλέον κατάλληλο για την υπερέκφραση των κλωνοποιημένων cDNAs (GST fusion proteins). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε (Ausubel et al., 1994) με τις κατάλληλες τροποποιήσεις έχει ως εξής:

Από τις αποικίες που προήλθαν μετά το βακτηριακό μετασχηματισμό ενοφθαλμίστηκαν 7 υγρές καλλιέργειες LB με αμπικιλίνη των 5 ml σε βακτηριακού σωλήνες, ένα για κάθε υπό μελέτη κλώνο cDNA, οι οποίες αναπτύχθηκαν ολονύκτια υπάναδευση 250 rpm σε θερμοκρασία 37 °C σε τροχιακό επωαστήρα. 100 μl από κάθε καλλιέργεια ενοφθαλμίστηκαν σε 10 ml καλλιεργητικού μέσου LB με αμπικιλίνη (100 μg/ml) και αφέθηκαν να αναπτυχθούν υπό ανάδευση 250 rpm σε θερμοκρασία 37 °C σε τροχιακό επωαστήρα έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας έχει τιμή A<sub>600</sub> = 0.6-0.8 (περίπου 3 ώρες), γεγονός που σηματοδοτεί ότι η βακτηριακή καλλιέργεια βρίσκεται σε εκθετική φάση, εξασφαλίζοντας έτσι τη μέγιστη πρωτεϊνική έκφραση. Οι αρχικές υγρές καλλιέργειες υγρού LB αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.



Στις καλλιέργειες των αποικιών των οποίων η οπτική πυκνότητα έφτασε τις επιθυμητές τιμές, έγινε προσθήκη IPTG (ISOPROPYL β-D-THIOGALACTOPYRANOSIDE) σε συγκέντρωση 1 mM. Μετά την προσθήκη του IPTG οι καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν στις ίδιες συνθήκες για ακόμη 3 ώρες.

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έγινε συλλογή δειγμάτων όγκου 1 ml από τις καλλιέργειες πριν την προσθήκη IPTG και μετά το πέρας 1, 2 και 3 ωρών από την προσθήκη του. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες, φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά στις 12000 rpm, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C για να ακολουθήσει αργότερα η εκχύλιση των πρωτεϊνών τους και ανάλυση με SDS PAGE.

### **3.18. Εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες σε μικρή κλίμακα υπό αποδιατακτικές συνθήκες.**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε (Ausubel et al., 1994) με τις κατάλληλες τροποποιήσεις έχει ως εξής:

Τα ιζήματα των δειγμάτων που προέκυψαν από την επαγωγή έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών επαναιωρήθηκαν σε 100 μl διαλύματος λύσης ουρίας (8 M ουρία, 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.01 M Tris base, pH 8 ρύθμιση με NaOH). Ακολούθησε επώαση 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με διαδοχικές επαναιωρήσεις ανά 5 λεπτά.

Ακολούθησε υπερηχοβολισμός (sonication) του επαναιωρημένου ιζήματος σε μηχανή sonicator Branson με πλάτος (amplitude 40% για 3 sec, 10 φορές με ενδιάμεσες παύσεις σε πάγο).

Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο για 10 λεπτά στις 12000 rpm στους 4 °C και τα υπερκείμενα (100 μl) μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάκια που περιείχαν 25 μl διαλύματος Laemmli buffer (5x), θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS PAGE και να δούμε την επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών αλλά και τη βέλτιστη χρονική στιγμή που επάγονται. Μετά την εξακρίβωση της επιτυχίας της επαγωγής των χιμαιρικών πρωτεϊνών, έγινε επανακαλλιέργεια των αρχικών καλλιεργειών που είχαν κρατηθεί και αποθήκευσή τους σε γλυκερόλη στους -70 °C.



### 3.19. Επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη σε μεγάλη κλίμακα

Η διαδικασία της επαγωγής της έκφρασης που ακολουθήθηκε (Ausubel et al., 1994) με τις κατάλληλες τροποποιήσεις έχει ως εξής:

Έγινε ενοφθαλμισμός 5 ml υγρής καλλιέργειας LB/αμπικιλίνης για κάθε βακτηριακό κλώνο σε 500 ml LB/αμπικιλίνης καλλιεργητικού υλικού. Οι βακτηριακοί κλώνοι προέρχονταν από ανακαλλιέργεια των υγρών καλλιεργειών που αποθηκεύτηκαν κατά την επαγωγή έκφρασης σε μικρή κλίμακα.

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε τροχιακό επωαστήρα υπό ανάδευση 250 rpm σε θερμοκρασία 37 °C μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να έχει τιμή  $A_{600} = 0.6$ . Στη συνέχεια έγινε προσθήκη IPTG σε συγκέντρωση 1 mM σε κάθε καλλιέργεια.

Ακολούθησε ανάπτυξη των βακτηρίων για ακόμη 3 ώρες στις ίδιες ακριβώς συνθήκες και τελικά τα βακτηριακά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Sorvall (κεφαλή JA14) σε πλαστικούς σωλήνες (250 ml) για 15 λεπτά στις 5500 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

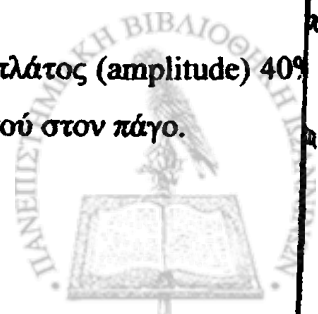
Κατά τη διαδικασία ελήφθησαν δείγματα βακτηριακής καλλιέργειας 1 ml πριν την προσθήκη IPTG και 3 ώρες μετά την προσθήκη, με τον ίδιο τρόπο όπως και στην επαγωγή σε μικρή κλίμακα, για να εξακριβωθεί η επιτυχία της επαγωγής έκφρασης των χμιαϊκών πρωτεϊνών.

### 3.20. Εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες σε μεγάλη κλίμακα υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Τα ιζήματα των βακτηριακών καλλιεργειών που προέκυψαν από την επαγωγή σε μεγάλη κλίμακα επαναιωρήθηκαν σε 13 ml διαλύματος λύσης (0.058 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride, Δ/της PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2, Pepstatin, Leupeptin 1 ‰) σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου των 25 ml. (Για κάθε gr κυτταρικού βάρους χρησιμοποιούμε περίπου πενταπλάσιο όγκο διαλύματος λύσης).

Στη συνέχεια προστέθηκε λυσοζύμη σε συγκέντρωση 1 mg/ml και ακολούθησε επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.

Ακολούθησε υπερηχοβολισμός (sonication) του μίγματος με πλάτος (amplitude) 40% για 30 δευτερόλεπτα, 10 φορές με ενδιάμεσες επώσεις του ενός λεπτού στον πάγο.





Κατόπιν προστέθηκε απορρυπαντικό Triton-X 100 σε συγκέντρωση 1% v/v και τα μίγματα αφέθηκαν υπό ήπια ανάδευση στους 4 °C για 30 λεπτά.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο Sorvall (κεφαλή SW27) για 30 λεπτά στις 25000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C και τα υπερκείμενα χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για καθαρισμό πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης της εταιρίας Amersham. Για κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε 1 ml σφαιριδίων (μικτό διάλυμα, ενώ ο καθαρός όγκος σφαιριδίων είναι 500 μl) τα οποία πλύθηκαν ως εξής:

Φυγοκέντρηση σε 500 g για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου, προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου και ήπια (με το χέρι) επαναιώρηση των σφαιριδίων σε 500 μl διαλύματος λύσης (χωρίς Triton X-100). Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και στο τέλος τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα (προερχόμενο από την εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες σε μεγάλη κλίμακα υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες) και ακολούθησε επώαση υπό ήπια ανάδευση στους 4 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να γίνει η πρόσδεση της χιμαιρικής GST-πρωτεΐνης πάνω στα σφαιρίδια.

Στη συνέχεια το μίγμα (GST-πρωτεΐνης και σφαιριδίων) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένη πλαστική στήλη με φίλτρο στο άκρο και ελεγχόμενη ροή. Αφέθηκε για λίγα λεπτά να δημιουργηθεί ένα στρώμα σφαιριδίων στο κάτω μέρος της στήλης και ακολούθως υπό χαμηλή ροή εκλούσθηκε το διάλυμα που περιείχε όσες πρωτεΐνες δεν δεσμεύθηκαν στα σφαιρίδια (flow trough) και αποθηκεύτηκε στους -70 °C.

Ακολούθησε πλύση των σφαιριδίων με 10 ml διαλύματος λύσης με Triton X-100 (1% v/v) το οποίο στη συνέχεια συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -70 °C.

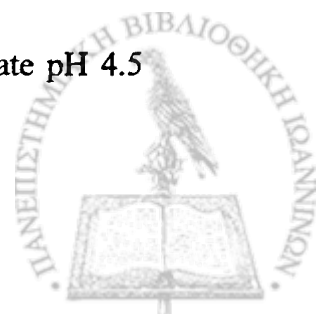
Κατόπιν τα σφαιρίδια πλύθηκαν με 10 ml διαλύματος PBS/PMSF (1 mM) το οποίο στη συνέχεια συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -70 °C.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 ml διαλύματος έκλουσης (Elution buffer) στο οποίο πλύθηκαν να επωαστούν τα σφαιρίδια για 5 λεπτά και μετά συλλέχθηκαν υπό χαμηλή ροή σε 40 μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες δείγματα καθαρής πρωτεΐνης 500 μl το καθένα.

Ακολούθησε πλύση της στήλης με 10 ml διαλύματος PBS/PMSF (1 mM) το οποίο στη συνέχεια συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -70 °C.

Τέλος έγινε η αναγέννηση των σφαιριδίων για πιθανή επαναχρησιμοποίησή τους ή αποθήκευση ως εξής:

Πλύση σφαιριδίων με 2 ml διαλύματος χαμηλού pH (0.1 M Sodium acetate pH 4.5 και 0.5 M NaCl), επώαση για 2 λεπτά και αφήνουμε να τρέξει η στήλη.



Πλύση σφαιριδίων με 2 ml διαλύματος υψηλού pH (0.1 M Tris-HCl pH 8.5 και 0.5 M NaCl), επώαση για 2 λεπτά και αφήνουμε να τρέξει η στήλη.

Πλύση σφαιριδίων με 10 ml διαλύματος PBS και αφήνουμε να τρέξει η στήλη.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Στο τέλος προσθέτουμε 5 ml διαλύματος PBS, 0.02% Sodium azide στο οποίο και αποθηκεύονται τα σφαιρίδια σε θερμοκρασία 4 °C.

### **3.21. Καθαρισμός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από μικρά μόρια μέσω διαπίδυσης (dialysis)**

Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες διαπίδυσης (SIGMA dialysis tubing) οι οποίες τεμαχίστηκαν σε κομμάτια μεγέθους περίπου 10cm και θερμάνθηκαν στους 100 °C για 10 λεπτά σε 1 λίτρο υδατικού διαλύματος που περιείχε 2% w/v NaHCO<sub>3</sub> και 1 mM EDTA.

Στη συνέχεια οι μεμβράνες πλύθηκαν με δις απεσταγμένο νερό και θερμάνθηκαν στους 100 °C για 10 λεπτά σε 1 λίτρο υδατικού διαλύματος που περιείχε 1 mM EDTA και μετά αφήθηκαν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

Τα επιλεγμένα πρωτεϊνικά εκλούσματα τοποθετήθηκαν σε μεμβράνη κατάλληλου μεγέθους (χωρητικότητα μεμβράνης περίπου 2 ml/cm) και στεγανοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικών σφιγκτήρων (clips).

Ακολούθησε επώαση σε ένα λίτρο διαλύματος διαπίδυσης (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 0.25M ή 85% Sucrose, 0.1 mM DTT και 1 mM PMSF) υπό ήπια ανάδευση στους 4 °C για 12 ώρες περίπου.

Τέλος τα πρωτεϊνικά διαλύματα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια και αποθηκεύτηκαν στους -70 °C.

### **3.22. Συγκατακρήμνιση καθαρών πρωτεϊνών in vitro (Pull down of GST fusion proteins) (Makatsori D, et al., 2004).**

Φυγοκεντρούμε τα πρωτεϊνικά δείγματα σε 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C (preclearing) και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια. Ηλεκτροφορούμε κάποια ποσότητα των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε SDS-PAGE έτσι ώστε να τις εξισορροπήσουμε μεταξύ τους για να τις χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια στο pull down.



Εξισορροπούμε το συνολικό όγκο σφαιριδίων (για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιούμε 30 μl) σε 1 ml διαλύματος διαπίδυσης χωρίς Triton X-100 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 0.25 M ή 85% Sucrose, 0.1 mM DTT και 1 mM PMSF). Επαναιωρούμε ήπια τα σφαιρίδια και φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 20 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε την παραπάνω διαδικασία 3 φορές.

Χωρίζουμε τα σφαιρίδια σε όσα δείγματα θέλουμε να μελετήσουμε (για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιούμε 30 μl σφαιριδίων) και προσθέτουμε κάποια ποσότητα πρωτεΐνης (την οποία έχουμε υπολογίσει μετά το SDS-PAGE), 30 μl ζελατίνης δέρματος ψαριού (fish skin gelatin) και συμπληρώνουμε με διάλυμα διαπίδυσης (με Triton X-100 1% v/v) μέχρι τελικό όγκο 200 μl.

Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 20 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε ήπια σε 1 ml διαλύματος διαπίδυσης (με Triton X-100 1% v/v). Η παραπάνω πλύση επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Στη συνέχεια προσθέτουμε σε κάθε δείγμα κατάλληλη ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης Hsp70 (η ποσότητα της πρωτεΐνης που μελετάμε την πρόσδεσή της στις διάφορες *gst* πρωτεΐνες υπολογίζεται και αυτή από το SDS-PAGE που αναφέραμε πριν για την εξισορρόπηση) και συμπληρώνουμε με διάλυμα διαπίδυσης (με Triton X-100 1% v/v) μέχρι τελικό όγκο 200 μl.

Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 20 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε ήπια σε 1 ml διαλύματος διαπίδυσης (με Triton X-100 1% v/v). Η παραπάνω πλύση επαναλαμβάνεται 6 φορές, ενώ η τελευταία γίνεται με διάλυμα διαπίδυσης χωρίς Triton X-100.

Προσθέτουμε στο τελικό ίζημα 40 μl διαλύματος Laemmli buffer (1x), βράζουμε τα δείγματα στους 100 °C για 5 λεπτά και τα φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 20 sec σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για SDS-PAGE για την εξακρίβωση της σύνδεσης της υπό μελέτη πρωτεΐνης (π.χ. Hsp70) με τις ενδοκυτταρικές *gst*-πρωτεΐνες.



### 3.23. Καθαρισμός His χμαιοικών πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας

Ο καθαρισμός των επαγόμενων His χμαιοικών πρωτεϊνών από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας πραγματοποιήθηκε υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η διαδικασία καθαρισμού περιλαμβάνει τα ίδια στάδια με τον καθαρισμό Gst χμαιοικών πρωτεϊνών με τις εξής τροποποιήσεις:

Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της χρωματογραφία συγγενείας ακινητοποιημένου μετάλλου (immobilized-metal affinity chromatography-IMAC) με νιτριλοτριοξικό οξύ (nitrilotriacetic acid-NTA). Το NTA είναι μία τετραεδρική χηλική ένωση η οποία καταλαμβάνει τέσσερις από τις έξι διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης του συνδεδεμένου ιόντος του νικελίου, αφήνοντας ελεύθερες δυο θέσεις, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους δακτύλους των πρόσθετων έξι ιστιδινών της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Η δέσμευση των πρωτεϊνών στη στήλη Ni-NTA είναι ανεξάρτητη της διαμόρφωσής τους και δεν επηρεάζεται από τις περισσότερες μετουσιωτικές και απορρυπαντικές ουσίες. Οι δεσμευμένες στη στήλη Ni-NTA πρωτεΐνες εκλύονται παρουσία καθαρού ιμιδαζολίου σε υψηλή συγκέντρωση. Ο δακτύλιος του ιμιδαζολίου αποτελεί τμήμα της δομής της ιστιδίνης και για το λόγο αυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις ανταγωνίζεται πιο αποτελεσματικά, για τις ίδιες θέσεις δέσμευσης, τις έξι ιστιδίνες της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης.

Χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα SB (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF) για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Εναλλακτικά χρησιμοποιήσαμε διάλυμα SB υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (300 mM NaCl) όπου αυτό ήταν αναγκαίο. Η εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni-NTA έγινε με διάλυμα SB, ενώ μετά το πακετάρισμα των σφαιριδίων στη στήλη τα εκπλύναμε με περίσσεια WB (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM PMSF). Τέλος πραγματοποιήσαμε τη έκλυση των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών με τη χρήση διαλύματος SB υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (100-250 mM).

Η επεξεργασία της μεμβράνης διαπίδυσης γίνεται με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω ενώ το διάλυμα διαπίδυσης που χρησιμοποιήσαμε ήταν το εξής: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0, 150-300 mM NaCl, 250 mM sucrose, 1 mM PMSF).



### 3.24. Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα με το σύστημα του βακυλοϊού

#### 3.24.1. Δημιουργία και απομόνωση ανασυνδυασμένων βακεμιδίων.

Προκειμένου να κατασκευάσουμε ανασυνδυασμένα βακεμίδια ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο Bac-To-Bac Baculovirus Expression System, της GIBCO BRL, Life Technologies. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Αρχικά, κλωνοποιούμε το γονίδιο ενδιαφέροντος στο MCS (Multiple Cloning Site) του κατάλληλου φορέα pFastBac-HT. Το σημείο εισδοχής βρίσκεται καθοδικά του δυνατού υποκινητή πολυεδρίνης του βακυλοϊού *A. californica* (ιός πολυέδρωσης AcNPV).

Στη συνέχεια, με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίζουμε επιλεκτικά κύτταρα του στελέχους DH10BAC του βακτηρίου *E. coli*. Στο φορέα pFastBac-HT υπάρχουν, εκατέρωθεν του υποκινητή πολυεδρίνης και του MCS, αλληλουχίες του mini-*attTn7* μεταθετού στοιχείου (Tn7Right και Tn7Left). Οι ίδιες αλληλουχίες υπάρχουν και στα βακτήρια του στελέχους DH10BAC και συγκεκριμένα στο ιικό γενομικό DNA (βακεμίδιο) που διαθέτουν, με αποτέλεσμα κατά το μετασχηματισμό να πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός *in vivo*, μεταξύ των ομόλογων Tn7 αλληλουχιών. Αυτό οδηγεί στην εισδοχή του ετερόλογου γονιδίου στο γονιδίωμα του ιού. Για την πραγματοποίηση του γενετικού ανασυνδυασμού απαιτούνται επίσης πρωτεΐνες μετάθεσης (transposition proteins) που παρέχονται από ένα βοηθητικό πλασμίδιο, (pMON7124 helper plasmid) το οποίο βρίσκεται και αυτό εντός των DH10BAC κυττάρων. Οι αλληλουχίες Tn7Right και Tn7Left του βακεμιδίου εντοπίζονται εντός του γονιδίου *lacZα* με αποτέλεσμα, όταν συμβεί μετάθεση με το επιθυμητό γονίδιο, αυτό να εισέρχεται εντός της κωδικής περιοχής του *lacZα* γονιδίου. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης, κάτι που μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη του τροποποιημένου σακχάρου X-gal (5 βρωμο-4 χλωρο-3 υδρολυλ-β-D-γαλακτοσίδιο), σε κατάλληλα τρυβλία επιλογής.

Στη συνέχεια μοιράζουμε ποσότητα 100 μl επιλεκτικών κυττάρων DH10BAC σε αποστειρωμένους σωλήνες όγκου 15 ml. Στον κάθε σωλήνα προσθέτουμε ποσότητα 5 ng του ανασυνδυασμένου φορέα και επωάζουμε για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ, με κάαση των δειγμάτων στους 42 °C, για 45 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια επωάζουμε για 2 πλεόν λεπτά στον πάγο.



Κατόπιν, στον κάθε σωλήνα προσθέτουμε 400 μl θρεπτικού υλικού SOC και τα μίγματα επωάζονται σε τρῶχιακό επωαστήρα θερμοκρασίας 37 °C για 4 ώρες.

Στη συνέχεια επιστρώνουμε 100 μl από κάθε σωλήνα σε προθερμασμένα τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό Luria Broth Agar, 50 μg/ml καναμυκίνη (ανθεκτικότητα από το βακεμίδιο), 10 μg/ml τετρακυκλίνη (ανθεκτικότητα από το helper) και 7 μg/ml γενταμυκίνη (ανθεκτικότητα από τον φορέα), ενώ στην επιφάνειά τους είχαμε, προηγουμένως, τοποθετήσει 50 μl του επαγωγέα IPTG (100 mM) και 30 μl X-gal (100 μg/μl). Τα τρυβλία επωάζονται ολονύκτια στους 37 °C και κατόπιν για δύο ώρες στους 4 °C, για την ανάπτυξη χρώματος. Τα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο βακεμίδιο δίνουν άσπρο χρώμα.

Επιλέγουμε όλες τις λευκές αποικίες από τα τρυβλία και τις αναπτύσσουμε ολονύκτια, υπό ανάδευση, στους 37 °C, σε αποστειρωμένους σωλήνες των 10 ml, που περιέχουν 2 ml LB με 50 μg/ml καναμυκίνη, 10 μg/ml τετρακυκλίνη, 7 μg/ml γενταμυκίνη. Μεταφέρουμε ποσότητα 1.5 ml από κάθε καλλιέργεια σε νέα αποστειρωμένα μικροσωληνάρια, φυγοκεντρούμε, στις 12000 rpm, για 1 λεπτό και επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε 0.3 ml διαλύματος I (15 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 μg/ml Rnase A).

Ακολούθως προσθέτουμε 0.3 ml διαλύματος II (0.1 N NaOH, 1% SDS) και επωάζουμε το μίγμα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προσθέτουμε 0.3 ml NaOH (pH 5.5) και επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά.

Φυγοκεντρούμε το μίγμα στις 12000 rpm, για 10 λεπτά, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο μικροσωληνάριο και προσθέτουμε σε αυτό 0.6 ml ισοπροπανόλη.

Τοποθετούμε το διάλυμα στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και εκπλένουμε το ίζημα (που περιέχει DNA) δύο φορές με 70 % αιθανόλη και το επαναδιαλύουμε σε 40 μl Tris-HCl pH 8. Τέλος, επιβεβαιώνουμε την απομόνωση DNA μεγάλου μοριακού βάρους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,5%.

### **3.24.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).**

Η μετάθεση του προς μελέτη γονιδίου στο DNA του βακεμιδίου, επιβεβαιώθηκε με PCR, με τη βοήθεια του πακέτου KLENTAQ LA CORE της SIGMA, η οποία έχει ως εξής:



Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήσαμε 5 μl απομονωμένου βακεμιδίου, 4 μl πρότυπων εκκινητών pUC/M13 (5 ng/μl), 1 μl dNTPs (100 mM) και ρυθμιστικό διάλυμα σε τελικό όγκο 50 μl και στη συνέχεια προσθέσαμε 40 μl αποστειρωμένου λαδιού.

Προθερμάναμε το μίγμα στη συσκευή PCR (Thermal Cycler της Perkin Elmer) στους 96 °C για 3 λεπτά προκειμένου το δίκλωνο βακεμιδιακό DNA να αποδιαταχθεί. Κατόπιν, προσθέσαμε σε κάθε αντίδραση 0.5 μl (2.0 Units) πολυμεράσης KLENTAQ LA Polymerase mix, που επιτρέπει την ενίσχυση εκμαγείων μεγάλου μοριακού βάρους. Οι συνθήκες για τη PCR αντίδραση ήταν οι παρακάτω:

Θερμική αποδιάταξη (denaturation): 94 °C, (1 λεπτό).

Πρόσδεση εκκινητών (annealing) : 60 °C, (1 λεπτό)

Επιμήκυνση αλυσίδων (elongation) : 72 °C, (5 λεπτά)

Αριθμός θερμικών κύκλων : 25

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν :

pUC/M13 πρόσθιος (Forward) : 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAAAC-3'

pUC/M13 ανάστροφος (Reverse) : 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'.

### 24.3 Δημιουργία ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών

Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών ακολουθήσαμε το εξής πρωτόκολλο:

Αιαιολύνουμε Κύτταρα Sf9 με ανασυνδυασμένο βακεμίδιο όπως περιγράφεται στη σχετική ενότητα. Μετά το πέρας της επώασης συλλέγουμε τα ανασυνδυασμένα σωματίδια του ιού, από το υπερκείμενο της κάθε καλλιέργειας. Για τη δημιουργία αποθέματος ανασυνδυασμένου ιού, φυγοκεντρούμε ήπια (στις 1500 rpm, για 5 λεπτά) το υπερκείμενο των καλλιεργειών. Σε μικρή ποσότητα του υπερκειμένου (1 ml) προσθέτουμε FCS σε τελική συγκέντρωση 2% και αποθηκεύουμε το προκύπτον δείγμα στους 4 °C, σε σκοτεινό δοχείο, ενώ φυλάσσουμε το υπόλοιπο υπερκείμενο στους -80 °C.

### 24.4. Τίτλοποίηση αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου (H42Q SV40) ιού SV40 (plaque assay).

Προκειμένου να ελέγξουμε το τίτλο του ιού SV40 (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου), ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία:



Διαμοιράζουμε CV1 κύτταρα σε πολυτρυβλία εσωτερικής διαμέτρου 35 mm σε πυκνότητα περίπου 150.000 κύτταρα /τρυβλίο και αφήνουμε να αναπτυχθούν για 24 h. Σημαντικό βήμα στη πειραματική διαδικασία αποτελεί η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο ταπήτιο του τρυβλίου.

Στη συνέχεια αραιώνουμε 100 μl από το στοκ του ιού, σε 900 μl θρεπτικού υλικού που περιέχει 2,5% ορό. Ακολουθούν άλλες 19 διαδοχικές αραιώσεις έτσι ώστε η τελική αραιώση του ιού στο θρεπτικό μέσο να είναι  $1/10^{20}$ .

Κατόπιν, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια εκπλένουμε τρεις φορές με παγωμένο διάλυμα PBS (1x) και τα διαμολύνουμε με 1 ml από κάθε αραιώση. Η διαμόλυνση επαναλαμβάνεται εις διπλούν για κάθε αραιώση.

Ακολούθως επωάζουμε τα κύτταρα για μιάμιση ώρα και στη συνέχεια προσθέτουμε σε κάθε τρυβλίο 2 ml διαλύματος που αποτελείται από DMEM με 2,5% ορό και 4% αγαρόζης, το οποίο διατηρούμε στους 45 °C.

Επιστρέφουμε τις καλλιέργειες στον επωαστικό κλίβανο και αφήνουμε για 6 με 10 ημέρες, μέχρις ότου αρχίσει η λύση των κυττάρων και ο σχηματισμός πλακών.

Μετά από περίπου 10 μέρες, προσθέτουμε στα κύτταρα 2,5 ml διαλύματος που αποτελείται από DMEM με 2% ορό και 1% χρωστικής neutral red. Αφήνουμε για επώαστη τρεις με τέσσερις ώρες στους 37 °C, αφαιρούμε το διάλυμα της χρωστικής και γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των πλακών για κάθε αραιώση.

Για την τελική τιτλοποίηση του ιού χρησιμοποιούμε τον παρακάτω τύπο:

$$\text{rfu/ml αρχικού στοκ} = \frac{1}{\text{του ιού}} \times \text{αριθμός} \times \frac{1}{\text{αραίωση} \quad \text{πλακών} \quad \text{ml ιού/τρυβλίο}}$$

### 3.24.5. Παραγωγή πρωτεϊνών από διαμολυσμένα με βακilloϊό εοκαρωτικά κύτταρα.

Προκειμένου να παρασκευάσουμε χμαιοτικές πρωτεΐνες με τη βοήθεια ανασυνδυασμένων βακilloϊών πραγματοποιήσαμε την εξής διαδικασία:

Ποσότητες 150 μl από τους αποθηκευμένους ανασυνδυασμένους βακilloϊους χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση Sf9 κυττάρων. Συγκεκριμένα, καλλιεργούμε κύτταρα Sf9 σε τρυβλία 6 φρεατίων, όπου σε κάθε φρεάτιο προσθέτουμε 150 μl ανασυνδυασμένους βακilloϊών και αφήνουμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν στους 27 °C.





Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (6, 7, 8, 9 και 10 ημέρες), μετά τη διαμόλυνση, συλλέγουμε τα κύτταρα σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια και φυγοκεντρούμε ήπια στις 1500 rpm, για 5 λεπτά.

Απορρίπτουμε το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και επαναιωρούμε το κάθε κυτταρικό ίζημα σε διάλυμα λύσεως (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 100 mM KCl, 1% Nonident P-40, 1 mM PMSF). Μετά από ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 20 λεπτά, φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm, για 10 λεπτά.

Μεταφέρουμε τα υπερκείμενα από κάθε μικροσωλήνα σε καινούρια σωληνάκια και αναμειγνύουμε με κατάλληλες ποσότητες διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών (Laemmli buffer). Το περιεχόμενό τους ελέγχεται για την ύπαρξη χμαιορικής πρωτεΐνης (π.χ. 6His-Hsc70) σε πήκτωμα 10% SDS- πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

#### 2.24.6. Καθαρισμός πρωτεϊνών από διαμολυσμένα με βακιλλοϊό ευκαρυωτικά κύτταρα με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας.

Σε τρυβλία των 100 mm καλλιεργούμε κύτταρα εντόμων Sf9, τα οποία διαμολύνουμε με 600 μl ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών και επωάζουμε σε κλίβανο στους 27 °C, για 6-8 ημέρες. Στη συνέχεια συλλέγουμε τα κύτταρα, τα φυγοκεντρούμε ήπια και επαναιωρούμε το κάθε κυτταρικό ίζημα σε διάλυμα λύσεως, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί ιμιδαζόλιο σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο που περιέχει ιικά σωματίδια αποθηκεύεται στους -70 °C.

Κατόπιν προσθέτουμε το αιώρημα της κυτταρικής λύσεως σε φυγοκεντρικό σωληνάριο που περιέχει 0.05 g σφαιριδίων αγαρόζης-νικελίου-νιτριλοξικού οξέος, η απορρόπηση των οποίων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (πρωτόκολλο tac-To-Bac Baculovirus Expression Systems, της GIBCO BRL, Life Technologies).

Επωάζουμε τα μίγματα, υπό διαρκή ανακίνηση, στους 4 °C, για 2 ώρες. Η διαδικασία καθαρισμού περιλαμβάνει τα ίδια στάδια με τον καθαρισμό His χμαιορικών πρωτεϊνών με τις εξής τροποποιήσεις:

Αρχικά πλένουμε τα σφαιρίδια με 10 ml διαλύματος A (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 mM ιμιδαζόλιο, 500 mM KCl, 10% γλυκερόλη), στη συνέχεια με 15 ml διαλύματος B (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 20 mM ιμιδαζόλιο, 500 mM KCl, 10% γλυκερόλη) και ακολουθεί έκλουση των προσδεμένων



πρωτεϊνών με διάλυμα έκλουσης (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 M KCl, 60 mM ιμιδαζόλιο 10% γλυκερόλη).

Συλλέγουμε δείγματα των 100 μl από κάθε έκλουση, προσθέτουμε σε αυτά Laemmli buffer και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 10% δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου.

Επωάζουμε το πήκτωμα με χρωστική Coomassie brilliant για 2 h και στη συνέχεια με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining buffer) για άλλες 2 h. Τέλος, στα σφαιρίδια πραγματοποιούμε αναγέννηση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 3.25. Κυτταρομετρία ροής

Η ανάλυση της έκφρασης της Hsp70 στους κυτταρικούς κλώνους που κατασκευάστηκαν μέσω siRNA τεχνολογίας έγινε και με κυτταρομετρία ροής (Partec CyFlow ML). Κύτταρα HeLa ή HeLa-siRNA-Hsp70 πλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 1% παραφορμαλδεΐδη/PBS σε συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml και επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ανάλυση FACScan κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιώντας ποσότητα 1.5 μg από MAb C92 όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα από τους Dressel R, et al., 1998.

Η απόπτωση των κυττάρων HeLa-siRNA-Hsp70 που δεν εκφράζουν Hsp70 σε σύγκριση με τα πατρικά κύτταρα HeLa αναλύθηκε και με κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 αφού εκτέθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30 και 60 λεπτά σε θερμικό σοκ 45 °C και επανήλθαν για 90 λεπτά σε 37 °C, επώαστηκαν σε 20 μg/ml χρωστικής Hoechst 33342 για 60 λεπτά και αναλύθηκαν με κατάλληλο πρόγραμμα για την απόπτωση που εμφάνιζαν (Partec FloMax software).



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Very faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Very faint, illegible text in the middle section of the page.

# ΠΑΤΑΡΙ ΣΑΛΙΟ

Very faint, illegible text in the lower middle section of the page.

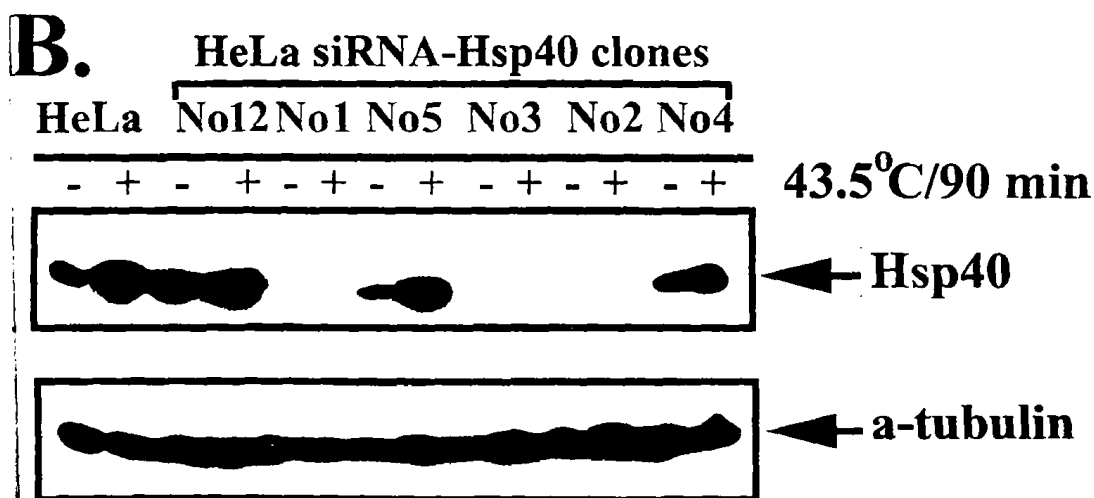
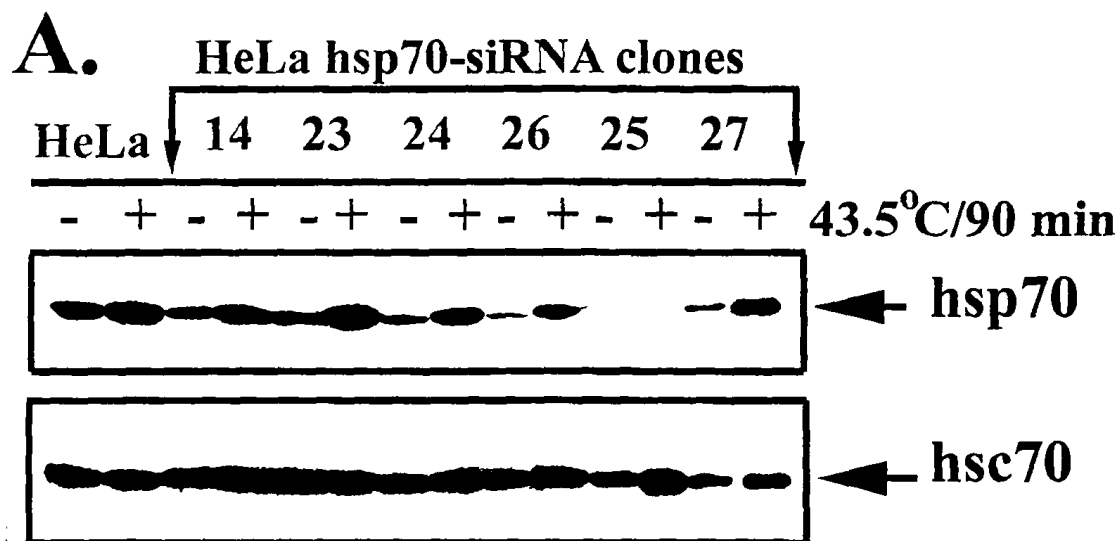
Very faint, illegible text at the bottom of the page.



Vertical text along the right edge of the page, including the letters Α, Η, Β, Η and some Greek characters.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### 4.1. Επιλογή κυτταρικών κλώνων γονιδιακής αποσιώπησης με τεχνολογία siRNA για τις πρωτεΐνες Hsp70 (A) και Hsp40 (B).



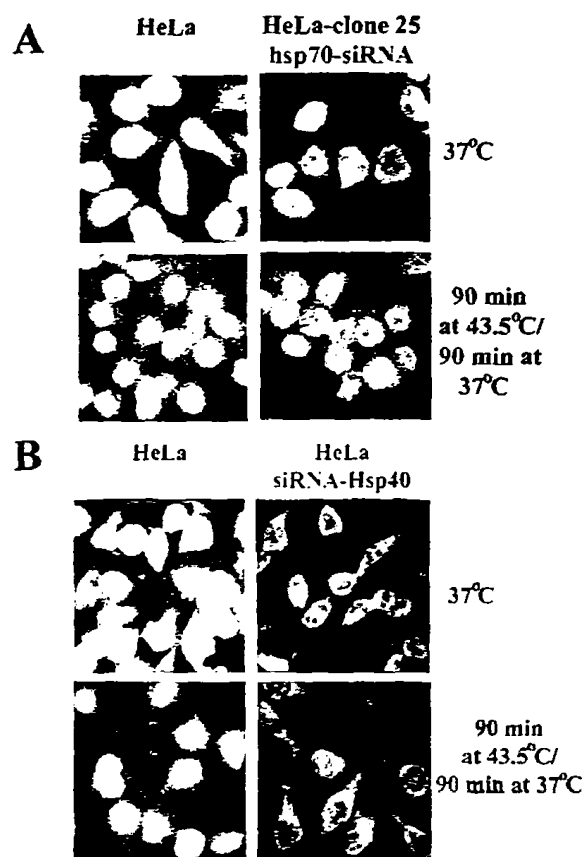
Εικ. 13: Επιλογή κυτταρικών κλώνων HeLa που δεν εκφράζουν τις Hsp70 και Hsp40. Οι σταθερές μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές HeLa, που δεν εκφράζουν τις Hsp70 και Hsp40 κατασκευάστηκαν με διαμόλυνση (transfection) των γονικών κυττάρων με τα πλασμίδια που φέρουν hsp70 (Ένθετο A, επάνω) και Hsp40 siRNAs (Ένθετο B, επάνω). Οι κλώνοι επιλέχθηκαν μετά από αλληλέργεια των κυττάρων παρουσία του αντιβιοτικού όπως περιγράφεται στα υλικά και τις μεθόδους. Τα εκχυλίσματα κυττάρων από διάφορους αντιπροσωπευτικούς κλώνους που εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (43.5 °C για 90 λεπτά και επαναφορά σε 37 °C για 90 λεπτά) προετοιμάστηκαν και αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα αντίστοιχα αντισώματα για κάθε πρωτεΐνη όπως επίσης και για την Hsc70 (Ένθετο A, κάτω) και α-τουμπουλίνη (Ένθετο B, κάτω) για τον έλεγχο φόρτωσης. Οι κλώνοι 25 (ένθετο A) και 1, 2 και 3 (ένθετο B) παρουσιάζουν έλλειψη των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp40 αντίστοιχα και χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα πειράματα.

Η διαμόλυνση κυττάρων HeLa έγινε με το πλασμίδιο pSUPER που έφερε τα ειδικά siRNAs για τις πρωτεΐνες Hsp70 και Hsp40 και η επιλογή των σταθερών μετασχηματισμένων κλώνων έγινε με το αντιβιοτικό Hygromycin. Τα εκχυλίσματα των κλώνων που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντι-Hsp70 και αντι-Hsp40 ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση κάθε πρωτεΐνης στους κυτταρικούς κλώνους σε φυσιολογικές αλλά και συνθήκες θερμικού σοκ. Η χρησιμοποίηση του αντισώματος για την Hsc70 (ένθετο Α) έγινε όχι μόνο για την ισοφόρτωση των δειγμάτων αλλά και για τον έλεγχο της ειδικότητας του siRNA της Hsp70, αφού η συγκεκριμένη αλληλουχία (oligos) που επιλέχθηκε για την κατασκευή του διέφερε μόνο σε δύο νουκλεοτίδια με το αντίστοιχη αλληλουχία της Hsc70. Αυτό που αποδείχθηκε είναι το ότι είμαστε σε θέση να παραγάγουμε σταθερά μετασχηματισμένους κυτταρικούς κλώνους στους οποίους απουσιάζει η Hsp70 είτε η Hsp40 χωρίς να επηρεάζεται εμφανώς ο κυτταρικός τους κύκλος (αποτελέσματα τα οποία δεν παρουσιάζονται) και η απόπτωσή τους κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης όπως θα δούμε παρακάτω. Σαφώς όμως επηρεάζονται κάποια ρυθμιστικά κυρίως μ ονοπάτια στα οποία οι δύο πρωτεΐνες συμμετέχουν όπως φαίνεται σε επόμενα αποτελέσματα. Οι κυτταρικές αυτές σειρές χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα σαν κυτταρικό σύστημα μελέτης της λειτουργίας κυρίως της Hsp70 στο πυρηνικό ή πυρηνισκικό τμήμα των κυττάρων.

#### **4.2. Ανάλυση με ανοσοφθορισμό των κλώνων HeLa-siRNA-Hsp70 και HeLa-siRNA-Hsp40 για τον έλεγχο της παραγωγής και κατανομής των πρωτεϊνών Hsp70 (Α) και Hsp40 (Β) κάτω από φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ.**

Με σκοπό να αναλύσουμε περαιτέρω και με άλλες τεχνικές την απουσία των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp40 στα κυτταρικά μας συστήματα χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του διπλού ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa και οι κυτταρικοί κλώνοι HeLa-siRNA-Hsp70 και HeLa-siRNA-Hsp40 που επιλέχθηκαν για ανάλυσή τους με τη τεχνική του ανοσοφθορισμού. Όλα τα κύτταρα εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς σε 37 °C) στερεοποιήθηκαν με φορμαλδεϋδη 2% και συνεχώς ακολούθησε ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα για την Hsp70 (Α) και Hsp40 (Β). Παρατηρήθηκε στα HeLa ότι και οι δύο πρωτεΐνες υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα κυρίως, ενώ μετά από θερμικό σοκ συσσωρεύονται στο πυρηνόπλασμα και κυρίως στους πυρηνίσκους.





Εικ. 14: Έλεγχος με ανοσοφθορισμό της ύπαρξης και επαγωγής μετά από θερμικό σοκ της Hsp70 στον κλώνο HeLa-siRNA-Hsp70 (A) και της hsp40 στον κλώνο HeLa-siRNA-Hsp40 (B). (A) κύτταρα HeLa (αριστερά άνω και κάτω ένθετα) και κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 (δεξιά άνω και κάτω ένθετα) εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς σε 37 °C) στερεοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη 2% και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα της Hsp70 όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. (B) κύτταρα HeLa (αριστερά άνω και κάτω ένθετα) και κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp40 (δεξιά άνω και κάτω ένθετα) εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς σε 37 °C) στερεοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη 2% και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα της Hsp40 όπως περιγράφεται στα "υλικά και μέθοδοι".

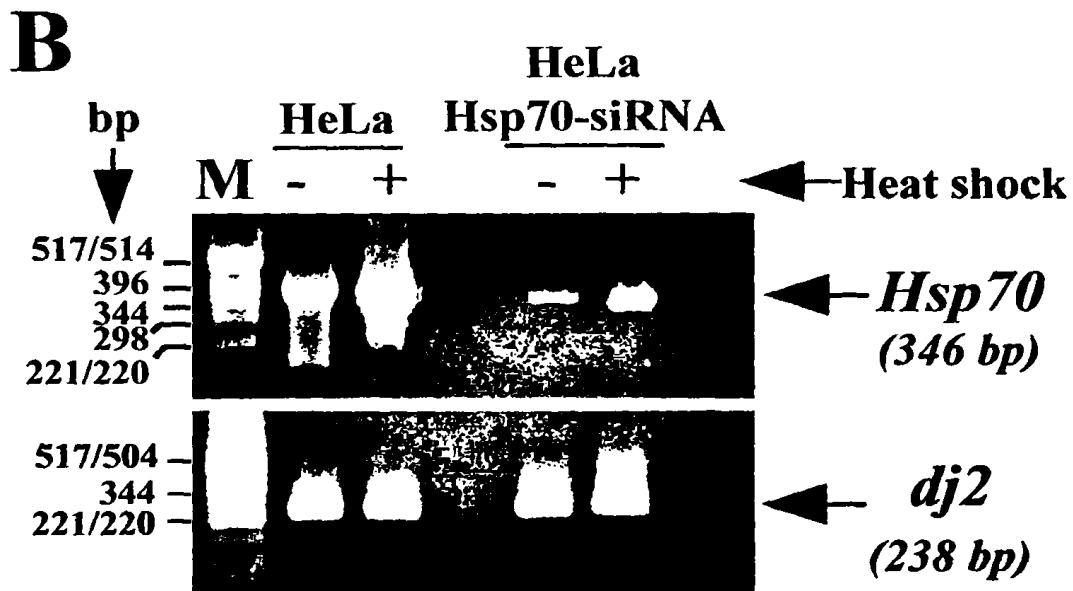
τα HeLa-siRNA-Hsp70 και HeLa-siRNA-Hsp40 δεν παρατηρείται καθόλου Hsp70 και hsp40 αντίστοιχα σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά ακόμη και μετά από θερμικό σοκ (ο μέγιστος φθορισμός που υπάρχει στους κυτταρικούς κλώνους είναι λόγω του δευτερογενούς αντισώματος mouse-FITC που χρησιμοποιείται).

### 3. Ανάλυση με RT-PCR των επιπέδων κυτταροπλασματικού RNA της Hsp70 στον κυτταρικό κλώνο HeLa-siRNA-Hsp70 κάτω από φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ.

Τέλος, μετά από τις 2 αξιόπιστες τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε για τον έλεγχο των πρωτεϊνών, εννοούμε το western blotting και τον διπλό ανοσοφθορισμό,



Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 τα οποία αφού πρώτα εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς σε 37 °C) επεξεργάστηκαν (Amprion, Paris TM kit, βλέπε υλικά και μεθόδους) και απομονώθηκε το κυτταροπλασματικό τους RNA. Στη συνέχεια, φωτομετρήθηκε κάθε δείγμα και ποσότητα 1 μg RNA από το καθένα υποβλήθηκε σε RT-PCR χρησιμοποιώντας ειδικά πρωταρχικά τμήματα για την Hsp70 που φαίνονται παρακάτω:



Εικ. 15: Σύγκριση με RT-PCR της συσσώρευσης του κυτταροπλασματικού Hsp70 RNA σε φυσιολογική θερμοκρασία και μετά από θερμικό σοκ στα HeLa κύτταρα και στον κλώνο HeLa siRNA-Hsp70. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς σε 37 °C), απομονώθηκε το κυτταροπλασματικό RNA (Amprion Paris TM kit, βλέπε υλικά και μεθόδους), φωτομετρήθηκαν και 1 μg RNA από κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε RT-PCR χρησιμοποιώντας ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για την Hsp70 (Επάνω ένθετο) και για τον έλεγχο ισοφόρτωσης την dj2 (Κάτω ένθετο). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκαν.

**5'-Hsp70-UTR:**

[5'-TTCCAGCCCCCAATCTCAGAGCCGAGCCGACAGAGA-3'] και

**3'-TRG:**

[5'-CATGAAGCACTGGCCTTTCCAGGTGATCAACGACGGAGAC-3']

Για την dj2 (ομοσυννοδός πρωτεΐνη που δεν επάγεται από θερμικό σοκ, δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων) τα ειδικά πρωταρχικά τμήματα ήταν:





### Dnaj 5' SalI:

[5'-ACCGGCAGTCGACGATGGTGAAAGAAACAACCTTA-3'] και

### 3'-Jdom-EcoRI:

[5'-CCCTCTTTGAATTCCTGTTCTCCTCCTTTG-3']

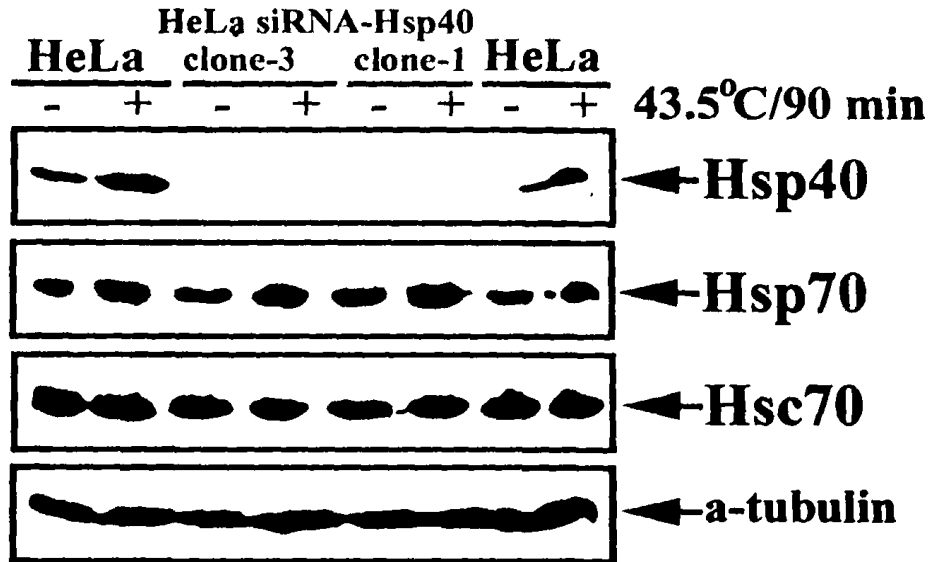
Τα τελικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης (Εικ. 15). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα RNA της Hsp70 στα κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 ήταν δραματικά λιγότερα σε σύγκριση με αυτά των κυττάρων HeLa, ενώ και στα δύο είδη κυττάρων παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων RNA της Hsp70 μετά από θερμικό σοκ και επαναφορά των κυττάρων. Τα μειωμένα επίπεδα RNA της Hsp70 στον κλώνο HeLa-siRNA-Hsp70 οφείλονται στην επιτυχία του siRNA για την Hsp70 που επιλέχθηκε και όχι σε μειωμένη φόρτωση δείγματος, αφού τα επίπεδα του RNA της dj2 είναι ίδια σε όλα τα δείγματα. Τα ελάχιστα μόρια του κυτταροπλασματικού RNA, τα οποία δεν είχαν προλάβει να ανιχνευτούν και να καταστραφούν από τα δίκλινα μορφής φουρκέτας siRNA-Hsp70, δίνουν μία μικρή ποσότητα κυτταροπλασματικού RNA όπως φαίνεται (Εικ. 15, επάνω ένθετο δεξιά).

#### **4. Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει την παραγωγή των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsc70;**

Έτσι μέσω siRNA τεχνολογίας κατασκευάστηκε η σταθερή μετασηματισμένη κυτταρική σειρά HeLa-siRNA-Hsp40 η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και μετά από θερμικό σοκ 43.5 °C για 90 λεπτά, δεν παρουσίαζε καθόλου συσσώρευση της Hsp40, ενώ αυτή η απουσία δεν επηρεάζει την ύπαρξη των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsc70 όπως φαίνεται μετά από ανοσοαποτύπωση των αντίστοιχων δειγμάτων (Εικ. 16, ένθετο 2 και 3).

Παρατηρούμε ότι στους κλώνους 1 και 3 δεν συσσωρεύεται καθόλου Hsp40 σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες HeLa στα οποία η Hsp40 αφενός μεν υφίσταται σε αρκετά υψηλά επίπεδα και επάγεται κάτω από την επίδραση θερμικού σοκ (Εικ. 16, Ένθετο 1). Αυτό υποδεικνύει ότι κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζονται διαφορετικά. Είναι όμως αυτό αλήθεια σε όλες τις συνθήκες ή η ρύθμιση των Hsp70 και Hsp40 επηρεάζονται από αυτές τις κυτταρικές αλλαγές που υφίστανται τα HeLa κύτταρα στο επίπεδο της παρουσίας ή απουσίας των μορίων αυτών;





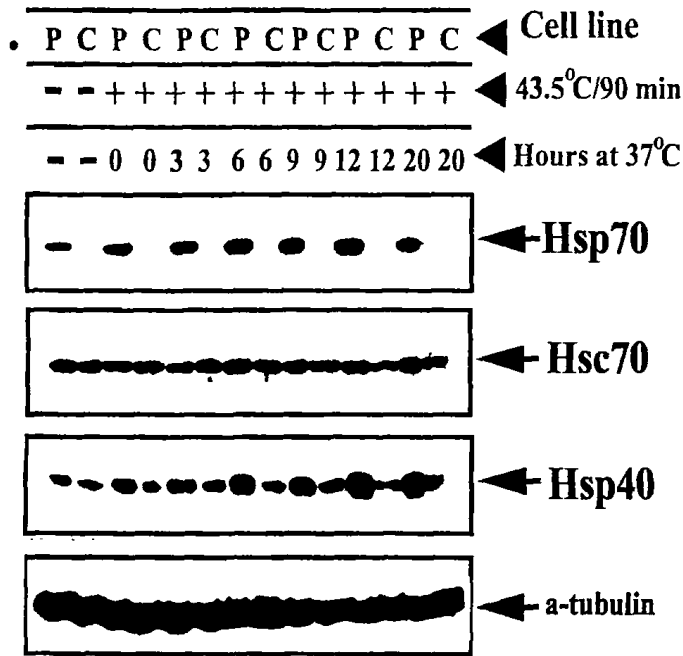
Εικ. 16: Η γονιδιακή αποσιώπηση της Hsp40 δεν επηρεάζει την παραγωγή των Hsp70 και Hsc70 σε φυσιολογικές θερμοκρασίες ή θερμικό σοκ (43.5 °C για 90 λεπτά). Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ 43.5 °C για 90 λεπτά και τα εκχυλίσματά τους προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες Hsp40, Hsp70, Hsc70 όπως επίσης και για την α-τουμπουλίνη για τον έλεγχο ισοφόρτωσης. Όπως φαίνεται από τους κλώνους 1 και 3, που δεν εκφράζουν την Hsp40 ούτε σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά ούτε και μετά από το συγκεκριμένο θερμικό σοκ, η παρουσία των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsc70 δεν επηρεάζεται.

#### 4.5. Η απουσία της Hsp70 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp40 κατά τη διάρκεια τη επαναφοράς των κυττάρων στους 37 °C μετά από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ.

Για να ελεγχθεί περαιτέρω το παραπάνω ερώτημα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa (P) και HeLa-siRNA-Hsp70 (C) που εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ 43.5 °C για 90 λεπτά και ακολούθησε επαναφορά των κυττάρων σε 37 °C για τα χρονικά διαστήματα 0, 3, 6, 9, 12 και 20 ωρών (Εικ. 17). Τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών Hsp70, Hsc70, Hsp40 (Εικ. 17, ένθετα 1, 2, 3 αντίστοιχα) όπως επίσης και για την α-τουμπουλίνη για τον έλεγχο ισοφόρτωσης (Εικ. 17, ένθετο 4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν τα κύτταρα όπου έχει αποσιωπηθεί η Hsp70, εκτεθούν σε θερμικό σοκ και επανέλθουν σε φυσιολογικές συνθήκες ακόμη και για 20 ώρες, εξακολουθούν να μην παρουσιάζουν Hsp70, σε αντίθεση με τη παραγωγή και συσσώρευση της Hsc70 η οποία δεν επηρεάζεται σε καμία περίπτωση.

Εάν όμως συγκριθούν τα επίπεδα παραγωγής της Hsp40 των κυττάρων HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70, μετά από θερμικό σοκ και επαναφοράς τους σε φυσιολογικές συνθήκες γ

κάθε χρονικό διάστημα, παρατηρούμε ότι ενώ στα κύτταρα HeLa αυξάνονται τα επίπεδα της Hsp40 μετά τις 3 ώρες, στον κλώνο Hela-siRNA-Hsp70 δεν υπάρχει καμία αύξηση των επιπέδων της Hsp40 ακόμη και μετά από επαναφορά 20 ωρών. Φαίνεται επομένως ότι όταν απουσιάζει η Hsp70 επηρεάζεται αρνητικά η ρύθμιση της Hsp40 μετά από θερμικό σοκ και επαναφορά των κυττάρων. Ισχύει όμως το ίδιο και με το αντίθετο; Δηλαδή όταν λείπει η Hsp40, ρυθμίζεται αρνητικά η Hsp70;



Εικ. 17: Η έλλειψη της Hsp70 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp40 κατά τη διάρκεια της επαναφοράς των κυττάρων στους 37 ° C μετά από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ. Κύτταρα HeLa (P) και HeLa-siRNA-Hsp70 (C) εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ 43.5°C για 90 λεπτά και ακολούθησε επαναφορά των κυττάρων σε 37 ° C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 3, 6, 9 12 και 20 ωρών. Τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα ειδικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες Hsp70, Hsc70, Hsp40 όπως επίσης και για την  $\alpha$ -τουμπουλίνη για τον έλεγχο ισοφόρτωσης.

16. Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει αρνητικά τη ρύθμιση της Hsp70 κατά τη διάρκεια της επαναφοράς των κυττάρων στους 37 ° C μετά από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ.

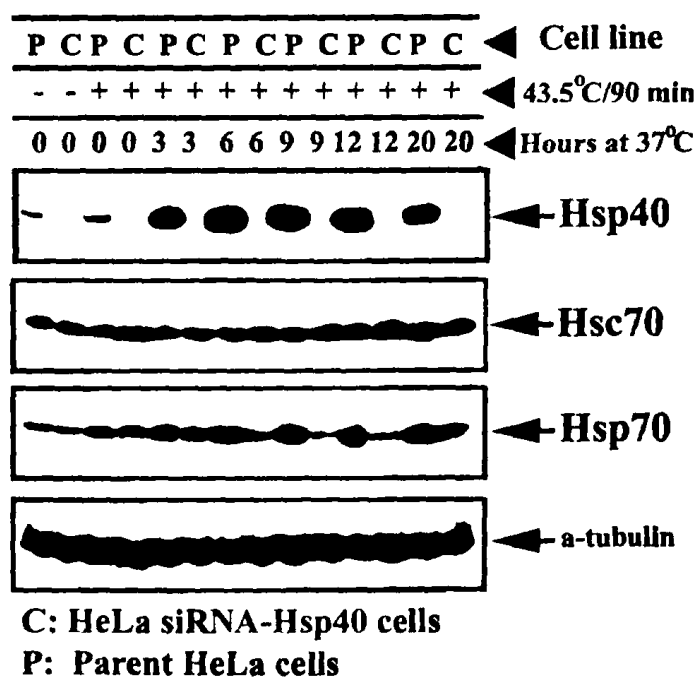
Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa (P) και HeLa-siRNA-Hsp40 (C) που εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ 43.5 ° C για 90 λεπτά και ακολούθησε επαναφορά των κυττάρων σε 37 ° C για τα χρονικά διαστήματα 0, 3, 6, 9 12 και 20 ωρών (Εικ. 18). Τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με



αντισώματα κατά των πρωτεϊνών Hsp40, Hsc70, Hsp70 όπως επίσης και για την α-τουμπουλίνη για τον έλεγχο ισοφόρτωσης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα κύτταρα όπου έχει αποσιωπηθεί, με siRNA τεχνολογία, η Hsp40, όταν εκτεθούν σε θερμικό σοκ και επανέλθουν σε φυσιολογικές συνθήκες ακόμη και για 20 ώρες, εξακολουθούν να μην παρουσιάζουν Hsp40, ενώ όσον αφορά την Hsc70 δεν επηρεάζεται η παραγωγή της σε καμία περίπτωση.

Επίσης αν συγκριθούν τα επίπεδα παραγωγής της Hsp70 των κυττάρων HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40, μετά από θερμικό σοκ και επαναφοράς τους σε φυσιολογικές συνθήκες για κάθε χρονικό διάστημα, παρατηρούμε ότι ενώ στα κύτταρα HeLa αυξάνονται τα επίπεδα της Hsp70 μετά τις 3 ώρες στον κλώνο HeLa-siRNA-Hsp40 δεν υπάρχει καμία αύξηση των επιπέδων της Hsp70 ακόμη και μετά από επαναφορά 20 ωρών (Εικ. 18, ένθετο 3). Φαίνεται επομένως ότι όταν απουσιάζει η Hsp40 επηρεάζεται αρνητικά η ρύθμιση της Hsp70 μετά από θερμικό σοκ και επαναφορά των κυττάρων. Λαμβάνοντας υπ'όψιν ταυτόχρονα τα δύο προηγούμενα πειράματα (Εικ. 16, 17) μπορούμε να συμπεράνουμε το ότι υπάρχει μία αρνητική ρύθμιση η οποία ίσως να ευρίσκεται στο επίπεδο της ρύθμισης των επαγόμενων γονιδίων των *hsp70* και *hsp40* μέσω του HSF1 (Heat Shock Transcription Factor 1).

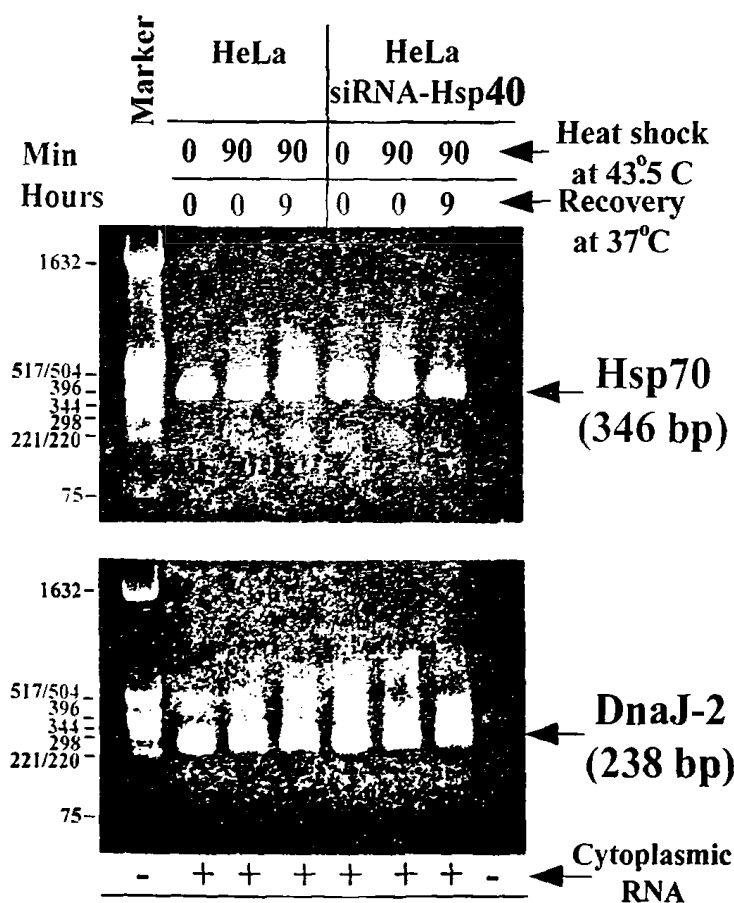


Εικ. 18: Η έλλειψη της Hsp40 επηρεάζει αρνητικά τη ρύθμιση της Hsp70 κατά τη διάρκεια της επαναφοράς των κυττάρων στους 37 °C μετά από έκθεσή τους σε θερμικό σοκ. Κύτταρα HeLa (P) και HeLa-siRNA-Hsp40 (C) εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ 43.5 °C για 90 λεπτά και ακολούθησαν επαναφορά στους 37 °C για 0, 3, 6, 9, 12 ή 20 ώρες.

επιπλέον επαναφορά των κυττάρων σε 37 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 3, 6, 9 12 και 20 ωρών. Τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα ειδικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες Hsp40, Hsc70, Hsp70 όπως επίσης και για την  $\alpha$ -τουμπουλίνη για τον έλεγχο ισοφόρτωσης.

#### 4.7. Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp70 στο επίπεδο της μεταγραφής ή της ωρίμανσης του RNA κατά την επαναφορά των κυττάρων από το θερμικό σοκ.

Με σκοπό να κατανοήσουμε περαιτέρω τον μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης των δύο πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp40 και σε ποιο πιθανόν επίπεδο γίνεται, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της RT-PCR και σαν πηγή Hsp70-RNA το κυτταροπλασματικό RNA.



κ. 19: Η απουσία της Hsp40 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp70 στο επίπεδο της μεταγραφής ή της ωρίμανσης του RNA κατά την επαναφορά των κυττάρων από το θερμικό σοκ. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C) και επανήλθαν σε 37 °C για 0 ή 9 ώρες. Απομονώθηκε το κυτταροπλασματικό RNA (Ampion, Paris TM kit, βλέπε υλικά και μεθόδους), φωτομετρήθηκαν και 1  $\mu$ g RNA από κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε RT-PCR χρησιμοποιώντας ειδικά πρωταρχικά τμήματα για την Hsp70 και την dj2 (για τον έλεγχο ισοφόρτωσης) και τέλος ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης με βρωμιούχο αιθίδιο.

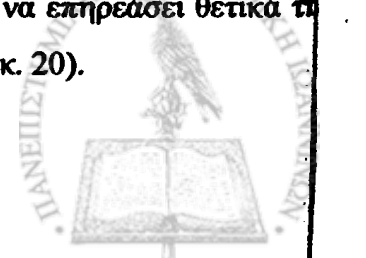


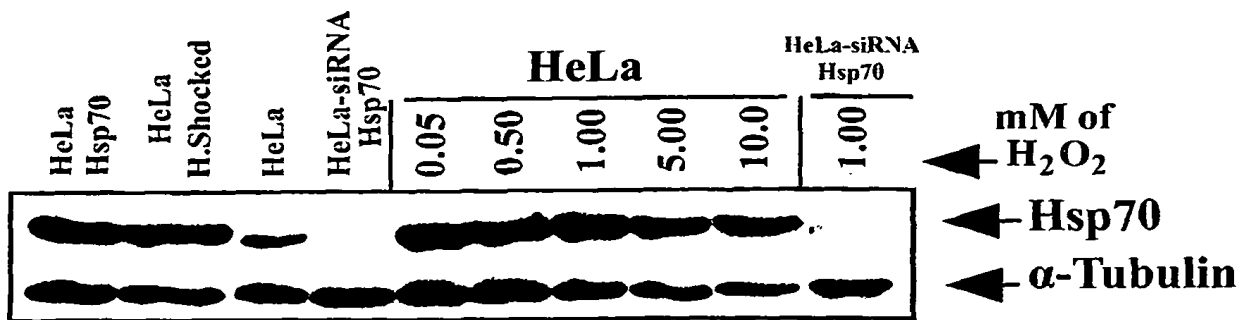
Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 τα οποία αφού πρώτα εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό (90 min σε 43,5 °C), επανήλθαν σε 37 °C για 0 ή 9 ώρες, επεξεργάστηκαν (Amplion, Paris TM kit, βλέπε υλικά και μεθόδους) και απομονώθηκε το κυτταροπλασματικό τους RNA. Στη συνέχεια, φωτομετρήθηκε κάθε δείγμα και ποσότητα 1 μg RNA από το καθένα υποβλήθηκε σε RT-PCR χρησιμοποιώντας τα ίδια ολιγονουκλεοτίδια (primers) όπως αυτά στο πείραμα της εικόνας 15. Τελικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα RNA της Hsp70 στα κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 ήταν ίδια σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και μετά από θερμικό σοκ χωρίς επαναφορά. Στην περίπτωση όμως έκθεσης των κυττάρων σε θερμικό σοκ και επαναφορά τους σε 37 °C για 9 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων RNA της Hsp70 μόνο στην περίπτωση των κυττάρων HeLa και όχι στα κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp40 όπου παρέμειναν σταθερά. Φαίνεται επομένως ότι η απουσία της Hsp40 επηρεάζει τη ρύθμιση της Hsp70 στο επίπεδο της μεταγραφής ή της ωρίμανσης του RNA κατά την επαναφορά των κυττάρων από το θερμικό σοκ, αφού το RNA που συλλέχθηκε ήταν κυτταροπλασματικό. Τα επίπεδα του RNA της dj2 είναι ίδια σε όλα τα δείγματα γεγονός που σημαίνει ότι έχουν ισοφορτωθεί.

#### 4.8. Η αρνητική ρύθμιση της Hsp70 μέσω siRNA τεχνολογίας δεν ανατρέπεται από άλλους επαγωγείς όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Με σκοπό να διερευνήσουμε εάν ανατρέπεται η απουσία της Hsp70 από τα HeLa siRNA-Hsp70 με κάποιου άλλου είδους στρες χρησιμοποιήσαμε το υπεροξείδιο του υδρογόνου και επιδράσαμε με αυτό στα κύτταρά μας.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa τα οποία και εκτέθηκαν ή όχι σε συνθήκες θερμικού σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς σε 37 °C αλλά και σε διάφορες συγκεντρώσεις 0.05, 0.5, 1, 5 και 10 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) για 9 ώρες, όπου παρατηρήθηκε επαγωγή της Hsp70 μετά την έκθεσή τους και στα δύο είδη σοκ. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για την επώαση των κυττάρων HeLa-siRNA-Hsp70 σε αυτήν, διότι οι μεγαλύτερες τιμές ήταν θανατηφόρες όπως φαίνεται και από τη μείωση της α-τουμπουλίνης στα αντίστοιχα δείγματα. Η ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση έδειξε ότι όπως και το θερμικό σοκ έτσι και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) που αποτελεί κάποιο άλλο είδος σοκ (χημικό) δεν μπόρεσε να επηρεάσει θετικά τη παρουσία της Hsp70 στον κυτταρικό κλώνο HeLa-siRNA-Hsp70 (Εικ. 20).

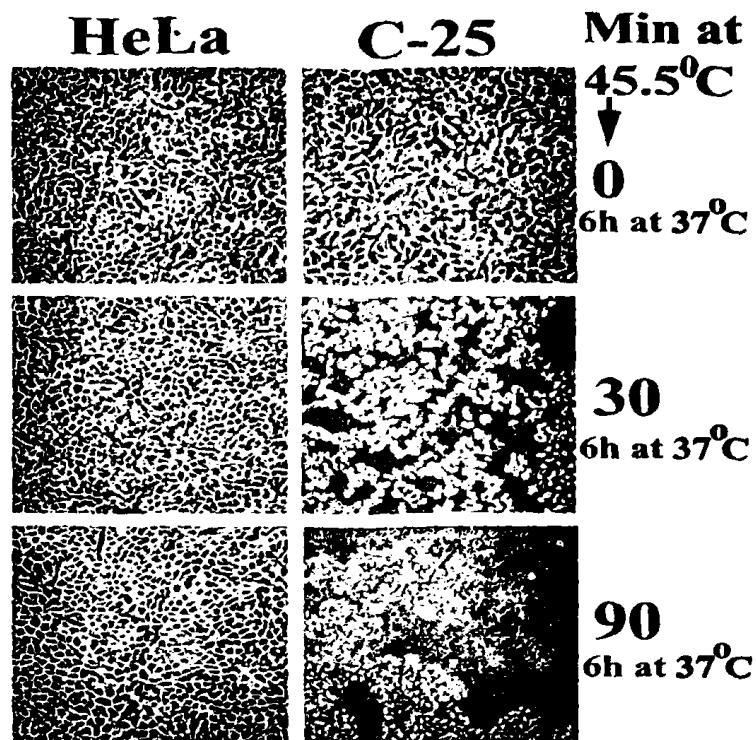




**Εικ. 20:** Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) δεν επηρεάζει θετικά την παρουσία της Hsp70 στον κυτταρικό κλώνο HeLa-siRNA-Hsp70. Κύτταρα HeLa εκτέθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες, σε συνθήκες θερμικού σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 min επαναφοράς σε 37 °C αλλά και σε διάφορες συγκεντρώσεις 0.05, 0.5, 1, 5 και 10 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) για 3 ώρες, ενώ κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 εκτέθηκαν ή όχι στη συγκέντρωση 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 3 ώρες. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα HeLa (Hsp70) που υπερέκφραζαν υπό φυσιολογικές συνθήκες την Hsp70. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα για την Hsp70 και την α-τουμπουλίνη για τον έλεγχο φορφόρτωσης

## 9. Η απουσία της Hsp70 προκαλεί θερμοευαισθησία στα κύτταρα HeLa

Στα επόμενα πειράματα θέλαμε να μελετήσουμε την ευαισθησία των κυττάρων μας στον αφορά την θερμοευαισθησία και την απόπτωσή τους. Μετά από θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 30 και 90 λεπτών και επαναφορά στη συνέχεια σε 37 °C για 6 ώρες των κυττάρων HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα στα οποία έλειπε η Hsp70 είχαν μεγαλύτερη θερμοευαισθησία από τα φυσιολογικά HeLa, αφού αποκόλλουνταν από το ταπήτιο του τρυβλίου όπως φαίνεται στην εικ. 21. Μάλιστα η αποκόλληση των κυττάρων HeLa-siRNA-Hsp70 είναι ανάλογη με το χρονικό διάστημα που εφαρμοστεί το θανατηφόρο θερμικό σοκ των 45.5 °C, αφού το ένθετο εικονίδιο των 90 λεπτών έχει λιγότερα κύτταρα από το αντίστοιχο των 30 λεπτών.

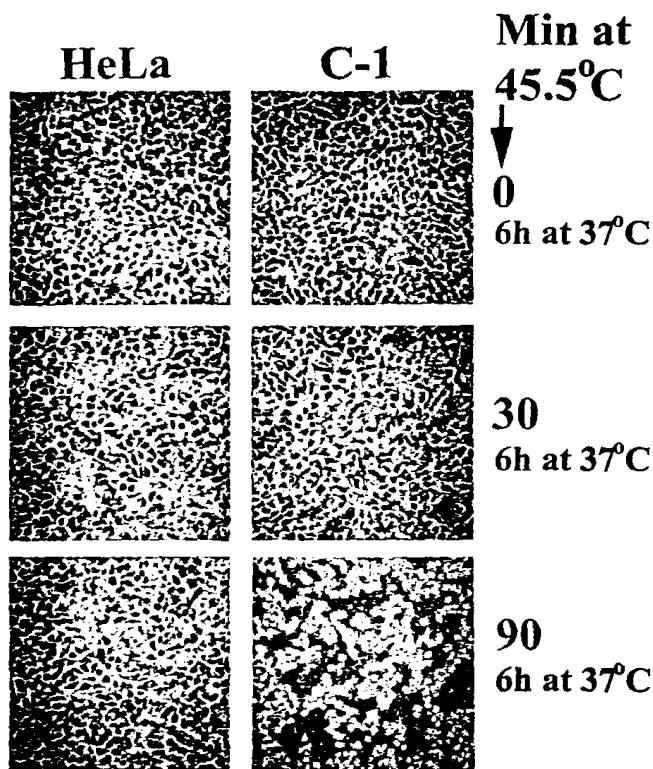


Εικ. 21: Η έλλειψη της Hsp70 μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 30 και 90 λεπτών και επανήλθαν στη συνέχεια σε 37 °C για 6 ώρες και τέλος φωτογραφήθηκαν.

#### 4.10. Η απουσία της Hsp40 προκαλεί θερμοευαισθησία στα κύτταρα HeLa

Μετά από θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 30 και 90 λεπτών και επαναφορά στη συνέχεια σε 37 °C για 6 ώρες των κυττάρων HeLa και HeLa-siRNA Hsp40, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα στα οποία έλειπε η Hsp40 είχαν μεγαλύτερη θερμοευαισθησία από τα φυσιολογικά HeLa, αφού αποκόλλουνταν από το ταπήτιο του τρυβλίου όπως φαίνεται στην εικ.22. Μάλιστα η αποκόλληση των κυττάρων HeLa-siRNA Hsp40 είναι ανάλογη με το χρονικό διάστημα που έχει εφαρμοστεί το θανατηφόρο θερμικό σοκ των 45.5 °C, αφού το ένθετο εικονίδιο των 90 λεπτών έχει λιγότερα κύτταρα από το αντίστοιχο των 30 λεπτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έλλειψη της Hsp40 επιφέρει λιγότερα δραματικά αποτελέσματα σχετικά με τη θερμοευαισθησία των κυττάρων σε σύγκριση με αυτήν που δημιουργείται λόγω έλλειψης της Hsp70, όπως φαίνεται από τα αντίστοιχα ένθετα των εικόνων 21 και 22.





Εικ. 22: Η έλλειψη της Hsp40 μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 30 και 90 λεπτών και επανήλθαν στη συνέχεια σε 37 °C για 6 ώρες και τέλος φωτογραφήθηκαν.

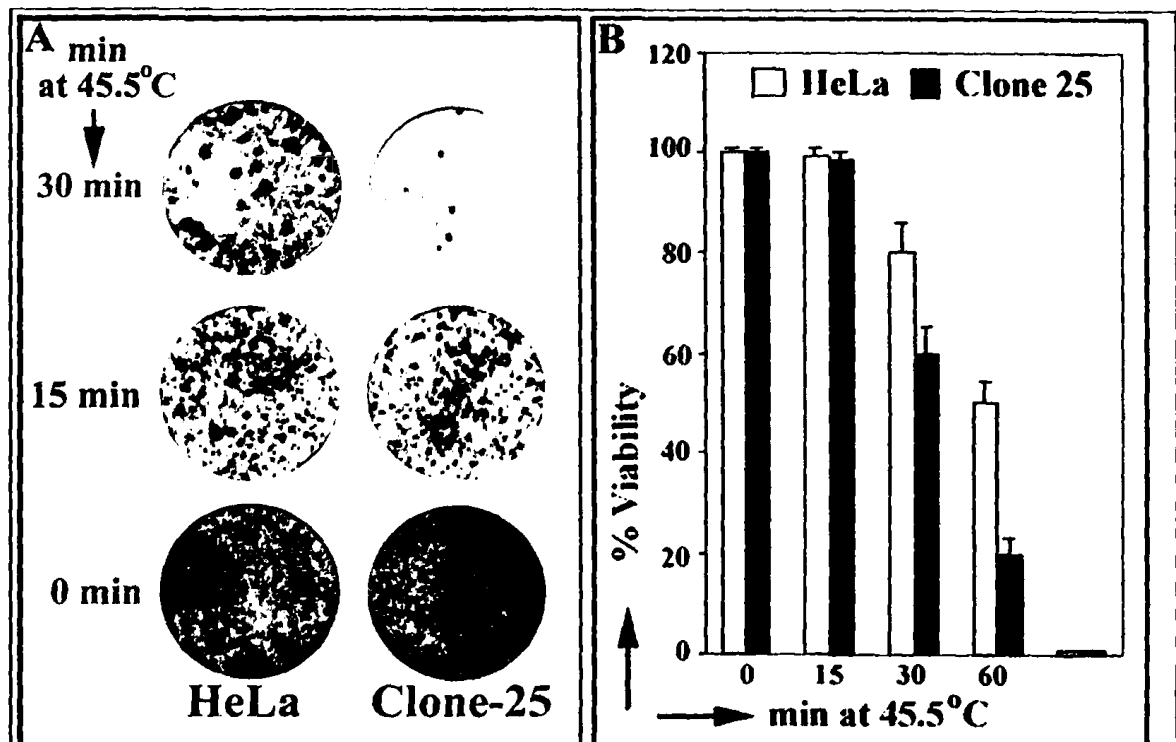
**11. Η απουσία της Hsp70 μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων. Ανάλυση με μέτρηση της ικανότητας των κυττάρων στη δημιουργία αποικιών (A) αλλά και στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους με τη χρήση WST-1 (B)**

Στην συνέχεια συγκρίναμε τα κύτταρα σε σχέση με την κυτταρική επιβίωση και την ικανότητά τους να δημιουργήσουν αποικίες μετά από ένα αυξανόμενο σε χρόνο θανατηφόρο θερμικό των 45.5 °C.

Για την μελέτη της ικανότητας δημιουργίας αποικιών (colony formation assay) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 (clone-25) τα οποία και υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15 και 30 λεπτών, αποψινοποιήθηκαν και ένας μικρός πληθυσμός από κάθε δείγμα (10.000) επαναιωρήθηκε σε ένα νέο τρυβλίο όπου και αφέθηκε για 48 ώρες. Στη συνέχεια έγινε η βαφή των αποικιών με βαφαστική Gimsa και φωτογραφήθηκαν τα σχετικά πεδία των τρυβλίων. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 όπου απουσιάζει η Hsp70 υπήρχαν λιγότερες αποικίες σε



σχέση με τα πατρικά HeLa και αυτή η μείωση ήταν ανάλογη του χρονικού διαστήματος έκθεσής τους σε θερμικό σοκ (εικ. 23, ένθετο Α).



Εικ. 23: Η έλλειψη της Hsp70 στα κύτταρα HeLa οδηγεί στη μείωση της ικανότητάς τους για δημιουργία αποικιών (Α) όπως επίσης και στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους (Β). (Α) Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 (clone-25) υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15 και 30 λεπτών και ελέγχθηκε η ικανότητά τους για δημιουργία αποικιών (Β) Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 (clone-25) υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30 και 60 λεπτών και ελέγχθηκε η ικανότητά τους στο πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους με τη χρήση WST-1.

Για την κυτταρική επιβίωση κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 (clone-25) εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30 και 60 λεπτά και φωτομετρήθηκαν δείγματα των θρεπτικών τους υλικών όπου είχε προστεθεί το άλας tetrazolium (WST-1, απαλό κόκκινο χρώμα) το οποίο αποτελεί υπόστρωμα της μιτοχονδριακής δεϋδρογενάσης (ένζυμο αναπνευστικής αλυσίδας) η οποία το μετατρέπει διασπώντας το σε formazan (σκούρο κόκκινο χρώμα). Η μιτοχονδριακή δεϋδρογενάση λειτουργεί μόνο σε ζωντανά κύτταρα άρα η αλλαγή του χρώματος συμβαίνει μόνο σε αυτά. Παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 όπου απουσίαζε η Hsp70 μειώθηκε περισσότερο η ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό και επιβίωση σε σχέση με τα πατρι-



κύτταρα HeLa και αυτή η μείωση ήταν ανάλογη του χρονικού διαστήματος έκθεσής τους σε θερμικό σοκ και ειδικά μετά τα 30 και 60 λεπτά (εικ. 23, ένθετο Β).

Για τα SD χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές από τρία πειράματα τριών δειγμάτων ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στο θερμικό σοκ, με  $P < 0.005$ .

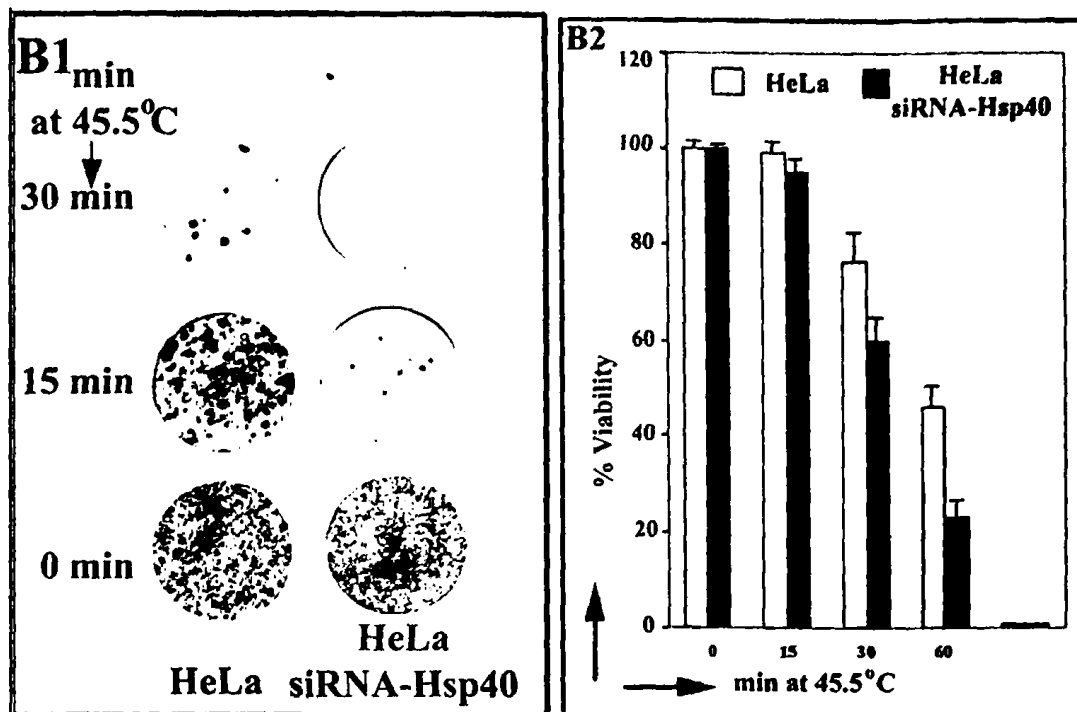
#### 4.12. Η απουσία της Hsp40 μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων. Ανάλυση με βάση την ικανότητα των κυττάρων στη δημιουργία αποικιών (Α) αλλά και στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους με τη χρήση WST-1 (Β)

Ανάλογα πειράματα έγιναν και για την επίδραση της απουσίας της Hsp40 στην θερμοευαισθησία και κυτταρική επιβίωση. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa και Hela-siRNA-Hsp40 (clone-3) τα οποία και υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5°C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15 και 30 λεπτών, θρυψινοποιήθηκαν και ένας μικρός πληθυσμός από κάθε δείγμα (10.000) επαναιωρήθηκε σε ένα νέο τρυβλίο όπου και αφέθηκε για 48 ώρες. Στη συνέχεια έγινε η βαφή των αποικιών με χρωστική Gimsa και φωτογραφήθηκαν τα σχετικά κεντράκια των τρυβλίων. Παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα Hela-siRNA-Hsp40 όπου απουσιάζει η Hsp40 υπήρχαν λιγότερες αποικίες σε σχέση με τα πατρικά HeLa και αυτή η μείωση ήταν ανάλογη του χρονικού διαστήματος έκθεσής τους σε θερμικό σοκ (εικ. 24, ένθετο Β1).

Τα ίδια κύτταρα HeLa και Hela-siRNA-Hsp40 εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30 και 60 λεπτών και φωτομετρήθηκαν δείγματα των χρωστικών τους υλικών όπου είχε προστεθεί το άλας tetrazolium (WST-1, απαλό κόκκινο χρώμα) το οποίο αποτελεί υπόστρωμα της μιτοχονδριακής δεϋδρογενάσης (ένζυμο αναπνευστικής αλυσίδας) η οποία το μετατρέπει διασπώντας το σε formazan (σκούρο κόκκινο χρώμα). Η μιτοχονδριακή δεϋδρογενάση λειτουργεί μόνο σε ζωντανά κύτταρα άρα η αλλαγή του χρώματος συμβαίνει μόνο σε αυτά. Παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα Hela-siRNA-Hsp40 όπου απουσίαζε η Hsp40 μειώθηκε περισσότερο η ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό και επιβίωση σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα HeLa και αυτή η μείωση ήταν ανάλογη του χρονικού διαστήματος έκθεσής τους σε θερμικό σοκ και ειδικά μετά τα 30 και 60 λεπτά (εικ. 24, ένθετο Β2).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα πειράματα που παρουσιάζονται στις εικ. 22 και 23 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η απουσία της Hsp70 ή της Hsp40 προκαλεί την αύξηση της θερμοευαισθησίας τους και την μείωση της ικανότητάς τους να δημιουργούν αποικίες μετά από ένα θανατηφόρο θερμικό σοκ.





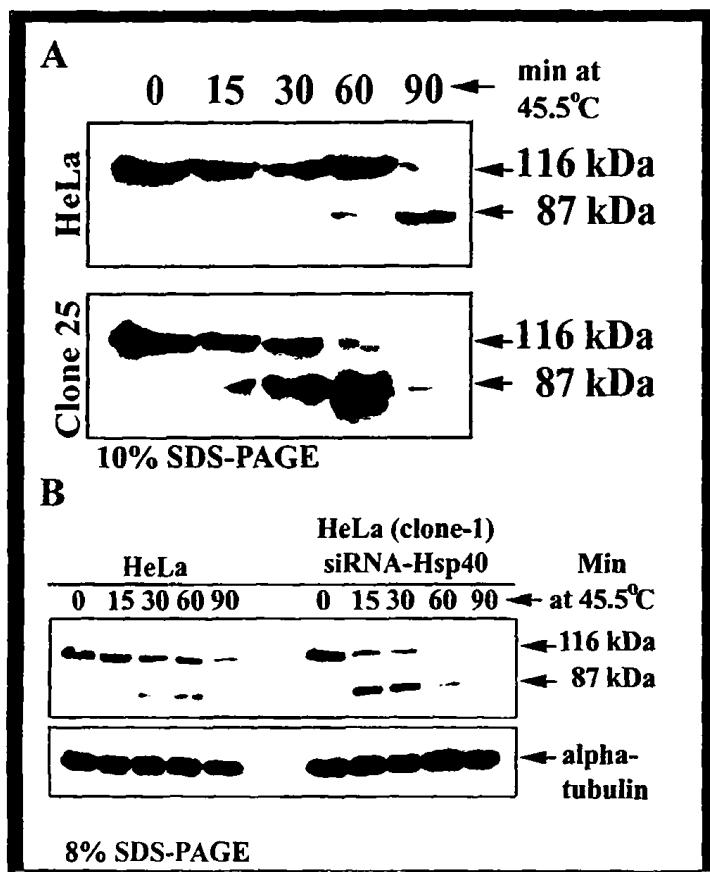
Εικ. 24: Η έλλειψη της Hsp40 στα κύτταρα HeLa οδηγεί στη μείωση της ικανότητάς τους για δημιουργία αποικιών (B1) όπως επίσης και στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους (B2) (B1) Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15 και 30 λεπτών και ελέγχθηκε η ικανότητά τους για δημιουργία αποικιών (B2) Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30 και 60 λεπτών και ελέγχθηκε η ικανότητά τους στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους με τη χρήση WST-1.

#### 4.13. Τα κύτταρα που δεν παράγουν Hsp70 (A) ή Hsp40 (B) είναι περισσότερα αποπτωτικά συγκρινόμενα με τα πατρικά τα οποία παράγουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες κάτω από συνθήκες ισχυρού θερμικού σοκ

Μετά τον χαρακτηρισμό των κυττάρων όσον αφορά την θερμοευαισθησία και τη κυτταρική επιβίωση, μελετήθηκε συγκριτικά, απουσία των Hsp70 ή Hsp40, η απόπτωση που παρουσιάζουν τα κύτταρα υπό συνθήκες φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ (Εικ. 25). Σαν αποπτωτικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε ο αποπτωτικός δείκτης PARP-1 ο οποίος διασπάται, κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης της αποπτωτικής διαδικασίας εντός του κυττάρου, από τα 116 kDa (ακέραια μορφή) σε 87 και 29 kDa πεπτίδια. λόγω της κοπής τα από την ενεργοποιημένη κασπάση 3.

Μετά από θερμικό σοκ 45.5 °C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30, 60 και 120 λεπτών των κυττάρων HeLa, HeLa-siRNA-Hsp70 (A) και HeLa-siRNA-Hsp40 (B) (Εικ. 26).

παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα στα οποία έλειπε η Hsp70 (A) ή η Hsp40 (B) είχαν μεγαλύτερη απόπτωση από τα φυσιολογικά HeLa, αφού υπήρξε μεγαλύτερο ποσοστό διάσπασης της PARP-1 στα επιμέρους τμήματά της 87 kDa και 29 kDa (Εικ. 25 A, B).



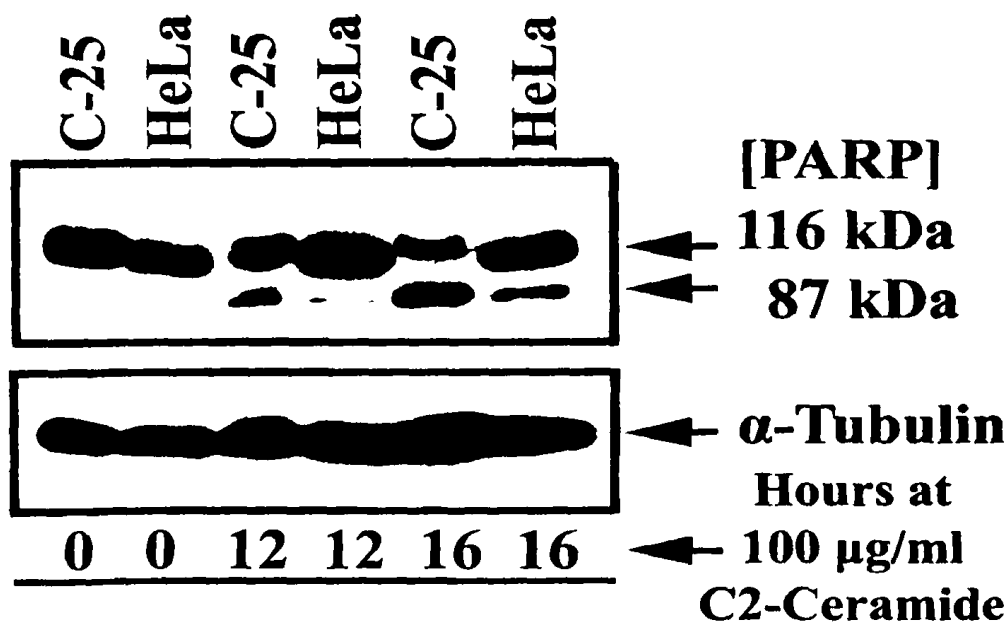
Εικ. 25: Η απουσία των πρωτεϊνών Hsp70 (A) ή Hsp40 (B) οδηγεί στην αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa, HeLa-siRNA-Hsp70 (A) και HeLa-siRNA-Hsp40 (B) τέθηκαν σε θερμικό σοκ 45,5 °C για 0, 15, 30, 60 και 90 λεπτά. Κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν, υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και western blotting χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για την PARP-1 (αποπτωτικός δείκτης) και την α-τουμπουλίνη (δείκτης ισοφόρτωσης).

Το 87 kDa φαίνεται μετά από ανοσοαποτύπωση διότι περιέχει τον επίτοπο του τρωσσώματος για την PARP-1, ενώ το 29 kDa δεν την περιέχει αυτήν την περιοχή με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται. Η απόπτωση (διάσπαση της PARP-1) είναι ανάλογη και στις δύο περιπτώσεις των κλώνων, με το χρονικό διάστημα που εφαρμόζεται το θανατηφόρο θερμικό σοκ των 45.5 °C. Το συμπέρασμα που συνάγεται από τα πειράματα αυτά είναι το ότι η απουσία της Hsp70 ή της Hsp40 αυξάνει την απόπτωση των κυττάρων από το θερμικό σοκ. Αυτό ίσως να οφείλεται στην αποσυναρμολόγηση των νανομηχανών επιδιόρθωσης των κυττάρων για αναδίπλωση πρωτεϊνών (Folding) ή για επιδιόρθωση των σημειακών θραύσεων του DNA όπως θα δούμε παρακάτω.



#### 4.14. Η απουσία της Hsp70 προκαλεί αύξηση της απόπτωσης στο κεραμίδιο

Το ερώτημα που τέθηκε στην συνέχεια ήταν εάν η αυξημένη απόπτωση παρατηρείται και με άλλα αποπτωτικά ερεθίσματα όπως το κεραμίδιο το οποίο αποτελεί ένα χημικό αποπτωτικό ερέθισμα. Έτσι πέρα από το θερμικό σοκ χρησιμοποιήθηκε και ένας κλασικός χημικός αποπτωτικός παράγοντας το κεραμίδιο. Συγκεκριμένα κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 (C-25) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε κεραμίδιο συγκέντρωσης 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  για τα χρονικά διαστήματα 0, 12 και 16 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα για την PARP-1 (αποπτωτικός δείκτης) και την  $\alpha$ -τουμπουλίνη (δείκτης ισοφόρτωσης).



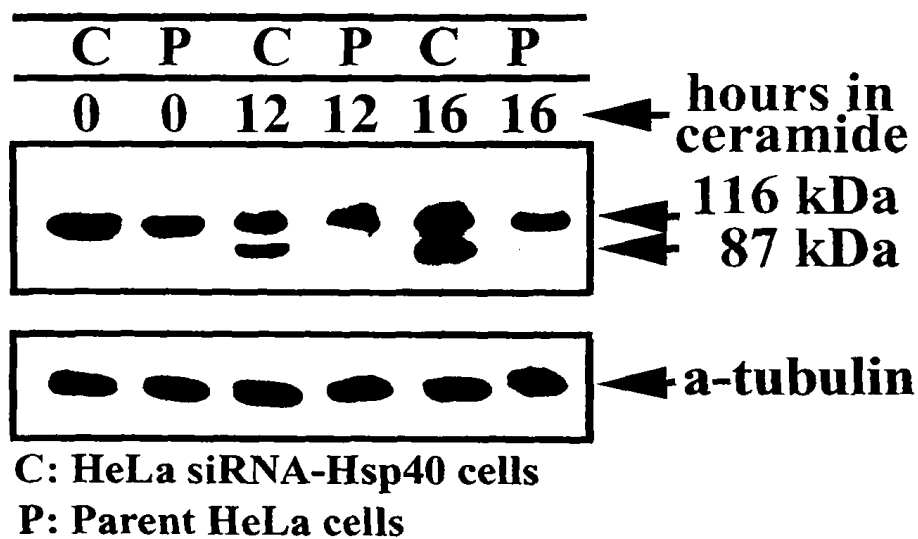
**Εικ. 26:** Η έλλειψη της Hsp70 σε κύτταρα HeLa προκαλεί αυξημένη απόπτωση στο κεραμίδιο. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 (C-25) εκτέθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 12 και 16 ωρών σε 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  κεραμιδίου, συλλέχθηκαν και τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα για την PARP-1 (αποπτωτικός δείκτης) και την  $\alpha$ -τουμπουλίνη (δείκτης ισοφόρτωσης).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα στα οποία έλειπε η Hsp70 είχαν μεγαλύτερη απόπτωση από τα φυσιολογικά κύτταρα HeLa, αφού υπήρξε μεγαλύτερο ποσοστό διάσπασης της PARP-1 στα επιμέρους τμήματά της 87 kDa και 29 kDa (Εικ. 26). Η απόπτωση (διάσπαση της PARP-1) είναι ανάλογη με το χρονικό διάστημα που εφαρμόζεται ο χημικός

αυτός αποπτωτικός παράγοντας, το κεραμίδιο, αφού το τμήμα 87 kDa είναι περισσότερο στην περίπτωση των 16 ωρών από αυτή των 12 ωρών.

#### 4.15. Η απουσία της Hsp40 προκαλεί αύξηση της απόπτωσης στο κεραμίδιο

Ανάλογα πειράματα έγιναν για να απαντηθεί το ερώτημα εάν και τα κύτταρα στα οποία απουσιάζει η Hsp40 αντιδρούν ανάλογα. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ένας χημικός αποπτωτικός παράγοντας το κεραμίδιο. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε κεραμίδιο συγκέντρωσης 100 μg/ml για χρονικά διαστήματα 0, 12 και 16 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα για την PARP-1 (αποπτωτικός δείκτης) και την α-τουμπουλίνη (δείκτης ισοφόρτωσης).



Εικ. 27: Η έλλειψη της Hsp40 σε κύτταρα HeLa προκαλεί αυξημένη απόπτωση στο κεραμίδιο. Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp40 εκτέθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 12 και 16 ωρών σε 100 μg/ml κεραμιδίου, συλλέχθηκαν και τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα για την PARP-1 (αποπτωτικός δείκτης) και την α-τουμπουλίνη (δείκτης ισοφόρτωσης).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα στα οποία έλειπε η Hsp40 είχαν μεγαλύτερη απόπτωση από τα φυσιολογικά κύτταρα HeLa, αφού υπήρξε μεγαλύτερο ποσοστό διάσπασης της PARP-1 στα επιμέρους τμήματά της 87 kDa και 29 kDa, γεγονός που συμβαίνει κατά την απόπτωση λόγω της κοπής της από την κασπάση 3 (Εικ. 27). Η απόπτωση (διάσπαση της PARP-1) είναι ανάλογη με το χρονικό διάστημα που εφαρμόζεται ο χημικός αυτός

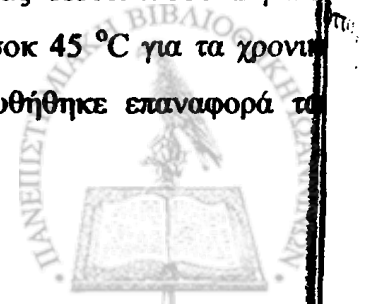


αποπτωτικός παράγοντας, το κεραμίδιο, αφού το τμήμα 87 kDa είναι περισσότερο στην περίπτωση των 16 ωρών από αυτή των 12 ωρών. Συγκεράζοντας τα πειράματα των εικόνων 26 και 27 φαίνεται ότι η προστασία της Hsp70 και της Hsp40 στα κύτταρα σε ότι αφορά την απόπτωση να είναι πιο γενική ή ίσως τα δύο αποπτωτικά μονοπάτια, του θερμικού σοκ και του κεραμιδίου, να έχουν κοινό μέρος του αποπτωτικού τους μονοπατιού.

#### 4.16. Η αρνητική ρύθμιση της Hsp70 στα HeLa κύτταρα ενισχύει την απόπτωση των κυττάρων, όπως ανιχνεύεται σε κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τη χρωστική Hoechst 33342.

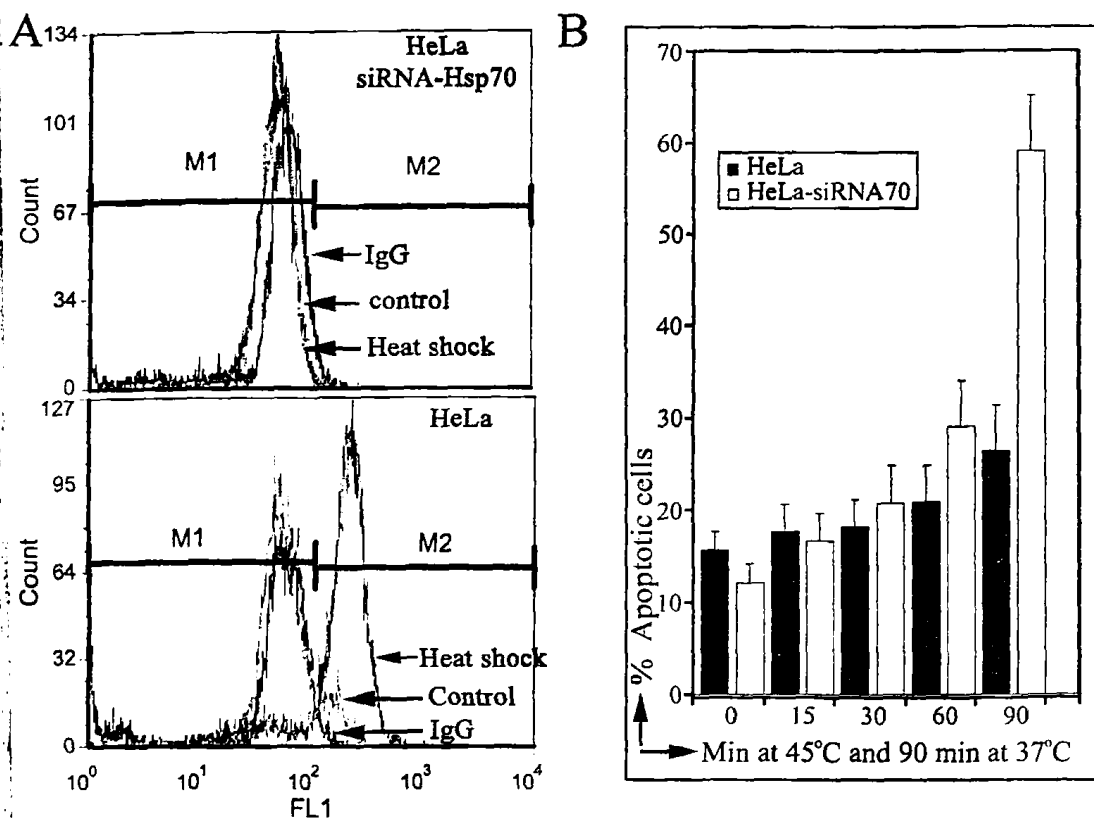
Προσπαθώντας να ολοκληρώσουμε την μελέτη της απόπτωσης των κυττάρων χρησιμοποιήσαμε μία σύγχρονη μέθοδο μελέτης της και συγκεκριμένα την κυτταρομετρία ροής. HeLa κύτταρα και η σταθερά μετασηματισμένη κυτταρική σειρά που δεν εκφράζει Hsp70 (HeLa-siRNA-Hsp70) χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για όλα τα περαιτέρω πειράματα (Doulias P-T., et al, 2007). Ελέγχθηκε η έκφραση της Hsp70 σε έναν από τους επιλεγμένους κυτταρικούς κλώνους (c-25) με το αντιβιοτικό Hygromycin, πριν και μετά από θερμικό σοκ σε 43,5 °C για 90 λεπτών και επαναφορά σε 37 °C για επιπλέον 90 λεπτά. Ο έλεγχος έγινε με κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα Hsp70 ποντικού (εικ.: 28A). Η απόκριση θερμικού σοκ και η επαγωγή δημιουργίας νέας ποσότητας Hsp70 παρατηρήθηκαν μόνο στα κύτταρα HeLa (εικ.: 28A, κάτω ένθετο) και όχι στα κύτταρα που στερούνται την Hsp70 (εικ.: 28A, άνω ένθετο). Τόσο ο ισοτυπικός μάρτυρας (IgG) όσο και τα κύτταρα μάρτυρας HeLa-siRNA-Hsp70 παρουσιάζουν την σχεδόν ολοκληρωτική αρνητική ρύθμιση της Hsp70. Έτσι και η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής επιβεβαίωσε την παντελή σχεδόν έλλειψη της Hsp70 από τα κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70.

Για την επιβεβαίωση της αποπτωτικής ικανότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και η κυτταρομετρία ροής με φθορίζων υλικό την Hoechst 33342 (εικ. 28B, πίνακας 3). Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 αναπτύχθηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες και αναλύθηκαν για την απόπτωσή τους σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και μετά από θερμικό σοκ. Όταν τα κύτταρα έφτασαν σε πυκνότητα 100%, ο κάθε κυτταρικός τύπος χωρίστηκε σε πέντε διαφορετικές ομάδες πληθυσμού  $1,5 \times 10^6$  κυττάρων η κάθε μία. Η μία ομάδα αναλύθηκε αμέσως (control) μετά από χρώση με 20  $\mu\text{g/ml}$  της ουσίας Hoechst 33342 για 6 λεπτά. Οι υπόλοιπες ομάδες κυττάρων υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45 °C για τα χρονικά διαστήματα 15, 30, 60 και 90 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε επαναφορά τα





κυττάρων για 90 λεπτά σε 37 °C, και τέλος επωάστηκαν σε 20 μg/ml χρωστικής Hoechst 33342 για 60 λεπτά και αναλύθηκαν.



Εικ. 28: Η αρνητική ρύθμιση της Hsp70 ακολουθείται από αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων HeLa-siRNA-Hsp70. [A] Κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 υπέστησαν ή όχι θερμικό σοκ 43,5 °C για 90 λεπτά και ακολούθησε επαναφορά τους σε 37 °C για 90 λεπτά. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της ενδοκυτταρικής Hsp70 κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμική επεξεργασία όπως αποδεικνύεται και αναλύεται για τον πράσινο φθορισμό από την κυτταρομετρία ροής.[B] Τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ για χρόνους που σημειώνονται. Η μέτρηση της απόπτωσης των κυττάρων με Hoechst 33342 με κυτταρομετρία ροής δείχνει ότι είναι δοσοεξαρτώμενη από το θερμικό σοκ και επίσης ότι η απουσία της Hsp70 προσδίδει μεγαλύτερη απόπτωση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απουσία της Hsp70 προκαλεί αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα, ιδίως μετά από 60 και 90 λεπτά θερμικού σοκ στους 45 °C (εικ. 28 B, πίνακας 3), συγκρινόμενη με αυτή των πατρικών HeLa κυττάρων όπου η Hsp70 εκφράζεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν, όπως και προηγούμενα δεδομένα (Samali A., et al, 1996), ότι η Hsp70 αποτελεί ένα από τα κύρια αντι-αποπτωτικά μέλη και τα κύτταρα που στερούνται της Hsp70 οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο που προκαλείται από



τη θερμότητα. Εντούτοις, λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό της δράσης της θερμότητας και τη συσσώρευση της Hsp70 στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους.

Χρόνος (λεπτά)	HeLa					HeLa siRNA-Hsp70				
	0	15	30	60	90	0	15	30	60	90
G0/G1	33.00 %	32.05 %	31.58 %	32.19 %	32.00 %	39.57 %	39.98 %	36.24 %	32.16 %	18.55 %
G2/M	18.33 %	18.29 %	19.38 %	19.12 %	12.54 %	14.18 %	18.21 %	15.11 %	14.17 %	7.38 %
S	16.54 %	16.45 %	17.33 %	16.96 %	22.56 %	22.27 %	19.72 %	23.57 %	18.61 %	11.85 %
subG1 (αποπτωτικά)	15.55 %	17.59 %	18.08 %	20.78 %	26.37 %	12.10 %	16.54 %	20.75 %	29.04 %	59.13 %

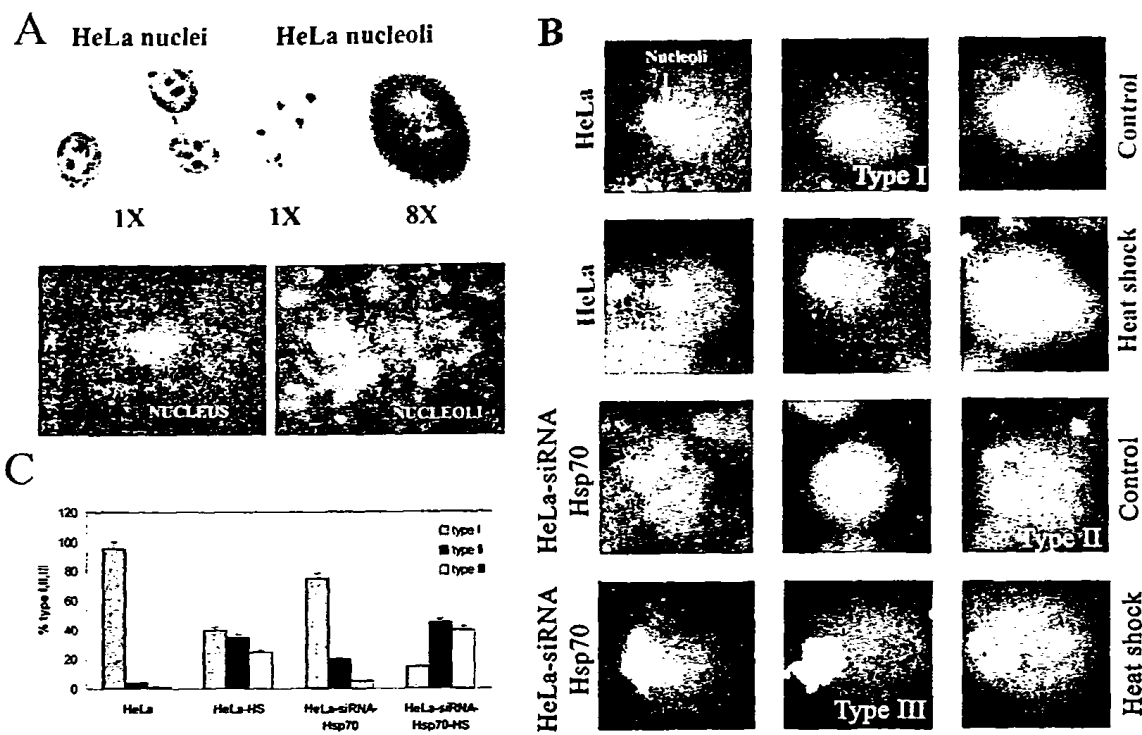
**Πίνακας 3:** Ποσοστά των κυττάρων HeLa και HeLa siRNA-Hsp70 στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από θερμικού σοκ 45 °C για τους χρόνους που σημειώνονται και επαναφορά τους στους 37 °C για 90 λεπτά. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε κυτταρομετρία ροής για τη μέτρηση της απόπτωσής τους μετά από χρώση τους με Hoechst 33342.

#### 4.17. Η διάσπαση του πυρηνίσκου λόγω θερμικού σοκ στα κύτταρα HeLa και HeLa siRNA-Hsp70.

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος της Hsp70 στους πυρήνες και τους πυρηνίσκους κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ, χρησιμοποιήσαμε τον σταθεροποιημένο κλώνο-25) όπου τα επίπεδα της Hsp70 είναι μηδαμινά (εικ. 13). Αρχικά προσπαθήσαμε να απομονώσουμε καθαρούς πυρηνίσκους έτσι ώστε να μπορέσουμε να αναλύσουμε τις αντιδράσεις της Hsp70 τόσο στους πυρηνίσκους όσο και στο νουκλεόπλασμα. Η διαδικασία απομόνωσης ήταν επίπονη, στηρίχθηκε σε μία προηγούμενη τεχνική (Muramatsu και Onishi, 1978, Ochs, 1998) σχετική με την απομόνωση πυρηνίσκου όμως επιτεύχθηκε μία γρήγορη και υψηλής καθαρότητας τεχνική απομόνωσης των (Εικ. 2, ένθετο Α) η οποία γίνεται μέσα σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια της μικροφυγοκέντρο eppendorf.

Δεδομένου ότι, δεν ξέραμε ακριβώς πώς η θερμότητα ενεργεί και κατευθύνει τα κύτταρα προς απόπτωση, θεωρήσαμε και υιοθετήσαμε αρχικά την πρόταση ότι η θερμότητα προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων παραγομένων ριζών οξυγόνου (Reddy M.V., et al, 1999, Bruskon V.I., et al, 2002) οι οποίες στη συνέχεια οδηγούν στην οξειδωτική βλάβη του DNA.





ικ. 29: Η Hsp70, προστατεύει τα κύτταρα HeLa από την απόπτωση, συμμετέχοντας στο σύστημα επιδιόρθωσης των σημειακών θραύσεων του DNA (ssb). [A] Απομόνωση των πυρήνων HeLa και των πυρηνίσκων (πάνω εικ., ψηφιακή μεγέθυνση 1x-8x της συνολικής μεγέθυνσης 400X) και η μορφή τους κατά τη διάρκεια της δοκιμής comet assay (κάτω εικ.). [B] Nucleolar Comet Assay (NCA) των κυττάρων HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 υπό φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ (90 min στους 43.5 °C και 90 min επαναφορά στους 37 °C). Τύπος-I, τύπος-II και τύπος-III είναι οι τρεις διαφορετικοί τύποι διάσπασης των πυρηνίσκων (πάνω εικ.). Όπως υποδεικνύεται, ο τύπος-I (άθικτος πυρηνίσκος), χάνεται και αλλάζει σε τύπο-II (ήπιας μορφής διαρρηγμένος πυρηνίσκος) και σε τύπο-III (εντελώς διαρρηγμένος πυρηνίσκος). [Γ] Τα ίδια κύτταρα αντιμετωπίστηκαν όπως και στο B και μετρήθηκαν στατιστικά για τη διάσπαση των πυρηνίσκων. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό του τύπου πυρηνίσκων I, II ή III ως μέσο όρο της μέσης τιμής δύο δειγμάτων από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τις τυπικές αποκλίσεις που υποδεικνύονται στην κορυφή κάθε στήλης.

Αυτή η πρόταση υποστηρίχθηκε από προηγούμενα δημοσιευμένα στοιχεία (Doulas et al, 2003), που έδειξαν ότι η έκθεση των κυττάρων HeLa σε οξειδωτικό στρες προκάλεσε μία δόσο-εξαρτώμενη και χρονικά εξαρτώμενη αύξηση των σημειακών θραύσεων του DNA και επίσης οι θραύσεις ρυθμιζόνταν από την έκφραση της Hsp70 στα κύτταρα (Doulas P-T et al, 2007). Αυτή η μελέτη έγινε σε ολόκληρα κύτταρα και τις σημειακές θραύσεις μετρήθηκαν με την τεχνική του Comet assay με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων. Τι γίνεται όμως στα μόρια DNA που συμμετέχουν στη δημιουργία των πυρηνίσκων (rDNAs); Μήπως είναι πιο ευαίσθητα σε θραύσεις σε σχέση με τα DNAs του νουκλεοπλάσματος; Το θερμικό σοκ



παραγάγει μόνο θραύσεις μονής αλυσίδας ή και διπλής αλυσίδας; Τα ερωτήματα αυτά προσπαθήσαμε να τα αντιμετωπίσουμε και να τα απαντήσουμε με τα επόμενα πειράματα.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική ηλεκτροφόρησης τεμαχισμένου DNA (DNA fragmentation assay) (Sugiki H., et al, 2000) προσπαθήσαμε αρχικά να προσδιορίσουμε το ρόλο της Hsp70 στις διπλές θραύσεις (double strand breaks) του DNA. Κατά συνέπεια, HeLa και HeLa-Hsp70-siRNA εκτέθηκαν σε αυξημένη θερμότητα (43,5 °C για 90 λεπτά και 8 ώρες στους 37 °C) και δείγματα του απομονωμένου DNA αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Καμία διαφορά στην τμηματοποίηση των θραυσμάτων DNA (DNA laddering) μετά από ηλεκτροφόρηση δεν παρατηρήθηκε λόγω της παρουσίας ή της έλλειψης Hsp70. Συγκεκριμένα η κλιμακοποίηση του DNA (DNA laddering or DNA fragmentation) σε πολλαπλάσια των ~200 ζευγών βάσεων εμφανίζεται το ίδιο παρουσία ή απουσία της Hsp70 κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάσαμε. Αυτό σημαίνει ότι στο πυρηνικό DNA (rDNA, το οποίο εδράζεται σε περιοχές των χρωμοσωμάτων 13, 14, 15 και 21) οι διπλές θραύσεις είναι ανεξάρτητες της συσσώρευσης της Hsp70 στους πυρηνίσκους. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και με το πυρηνοπλασματικό DNA (το υπόλοιπο DNA των χρωμοσωμάτων) μετά από την αφαίρεση πυρηνίσκων από τα ίδια κύτταρα (στοιχεία που δεν παρουσιάζονται).

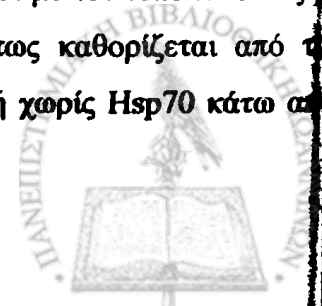
Αντίθετα, η Hsp70 φαίνεται να συμμετέχει στο μονοπάτι σχετικά με τις σημειακές θραύσεις του DNA. Για να καταστήσουμε τον παραπάνω ισχυρισμό ορατό, τροποποιήσαμε μερικώς και εφαρμόσαμε μία δημοσιευμένη τεχνική σχετικά με ολόκληρα κύτταρα (Collins A.R., et al 1995) την τεχνική "comet assay" για πρώτη φορά σε πυρηνίσκους την οποία και ονομάσαμε NCA (Nucleolar Comet Assay) (εικ. 29 A, κάτω ένθετο). Συγκρίνοντας τα δείγματα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ με αυτά που δεν έχουν υποστεί, παρατηρούμε ότι το θερμικό σοκ μπορεί να επιφέρει διάσπαση της ακεραιότητας του πυρηνίσκου και επιπλέον απουσία της Hsp70 (Hsp70-siRNA κύτταρα) να προκαλεί μορφολογικές αλλαγές του πυρηνίσκου οι οποίες ίσως να οφείλονται στις σημειακές θραύσεις του rDNA. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις οι πυρηνίσκοι ταξινομήθηκαν σε τρεις διαφορετικούς τύπους (Εικ. 29 B):

**Τύπος I :** που χαρακτηρίζει τους άθικτους πυρηνίσκους,

**Τύπος II:** που χαρακτηρίζει τους πυρηνίσκους με την ήπια διάσπαση και

**Τύπος III:** που χαρακτηρίζει τους πυρηνίσκους με την πλήρη διάσπαση.

Οι τύποι II και III κατέχουν μεγαλύτερες ουρές DNA συγκρινόμενοι με τον τύπο I. Αυτές οι διαφορές θα βασίζονταν στις σημειακές θραύσεις του DNA, όπως καθορίζεται από τις χρησιμοποιημένες τεχνικές. Επίσης, συγκρίνοντας τα κύτταρα με ή χωρίς Hsp70 κάτω από



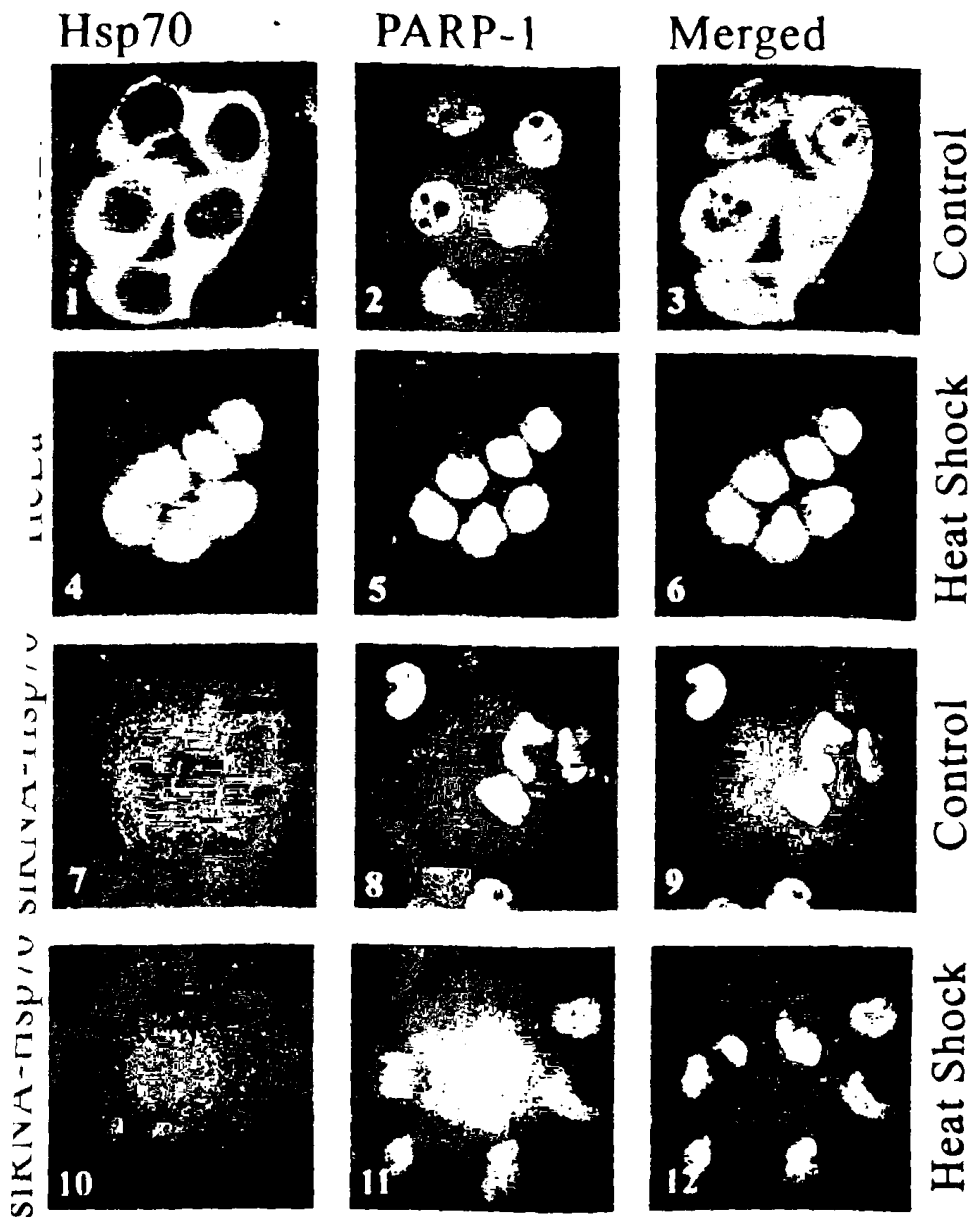
θερμικό σοκ καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι τύποι II και III εξαρτώνται από το θερμικό σοκ (εικ. 29 B, C). Επιπλέον τα κύτταρα που στερούνται την ενδογενή Hsp70 παρουσίασαν το αυξανόμενο ποσοστό των τύπων I και II (εικ. 29 C). Λαμβάνοντας υπ'όψιν όλα τα παραπάνω, μπορούμε να προτείνουμε ότι η απουσία της Hsp70 οδηγεί σε αύξηση της βλάβης του DNA το οποίο απεικονίζεται ως αύξηση της διάσπασης της δομής του πυρηνίσκου αλλά και των σημειακών θραύσεων του DNA (αύξηση της ουράς των κομητών). Αυτή η τεχνική με τους διαρρηγμένους πυρηνίσκους είναι μία νέα τεχνική για την εκτίμηση της πυρηνικής απόπτωσης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά τα οποία δημοσιεύσαμε πρόσφατα και αναφέρονται σε Comet assay των κυττάρων, ολόκληρου δηλαδή του πυρηνικού DNA-πυρηνισκικού και νουκλεοπλασματικού-και υπέδειξαν την προστατευτική δράση της Hsp70 ενάντια στις DNA βλάβες.

#### 4.18. Μελέτες ανοσοφθορισμού με συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal) για τον εντοπισμό PARP1, XRCC1 και Hsp70 στα κύτταρα HeLa και HeLa-siRNA-Hsp70 κατά τη διάρκεια φυσιολογικών συνθηκών αλλά και συνθηκών θερμικού σοκ.

Αν και η συμμετοχή της Hsp70 στην απόπτωση έχει ερευνηθεί ικανοποιητικά (Gurbuxani et al. 2003, Ravagnan et al., 2001; Nylandsted, 2000, Stankiewicz et al., 2005), ο ρόλος αυτής της πρωτεΐνης στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο δεν έχει ανευρεθεί μέχρι σήμερα. Με αυτήν την κατηγορία των πειραμάτων προσπαθήσαμε να διασαφηνίσουμε τον ρόλο αυτόν χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο και τεχνική διπλού ανοσοφθορισμού. Ο στόχος μας ήταν να εντοπίσουμε αρχικά ποιες από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε βλάβες του DNA συνεστιάζονται μαζί με την Hsp70 και στην συνέχεια να μελετήσουμε και να επιβεβαιώσουμε και βιοχημικά τις όποιες παρατηρήσεις μας. Οι συγκεκριμένες μελέτες μας αποκάλυψαν πράγματι ένα αποτέλεσμα που ήταν η κρυφή μας ελπίδα και το είχαμε προβλέψει, συγκεκριμένα το συνεντοπισμο της Hsp70 με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μοριακές νανομηχανές επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA.

Αρχικά, η Hsp70 συνεντοπίζεται με την PARP-1, η οποία είναι ένα μόριο αρμόδιο για τις σημειακές θραύσεις (ssb DNA), τα οποία και ιχνηθετεί προσθέτοντας σε ιστόνες και μη-ιστόνες των περιοχών αυτών πολυμερή ADP poly[-ribose]. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες φυσιολογικές, παρατηρούμε όπως αναμένουμε, η Hsp70 να διαχέεται κυρίως σε όλο το κυτταρόπλασμα (Εικ. 30, ένθετο 1. πράσινος φθορισμός) ενώ η PARP-1 να διαχέεται κυρίως στον πυρήνα (Εικ. 30, ένθετο 2, κόκκινος φθορισμός).

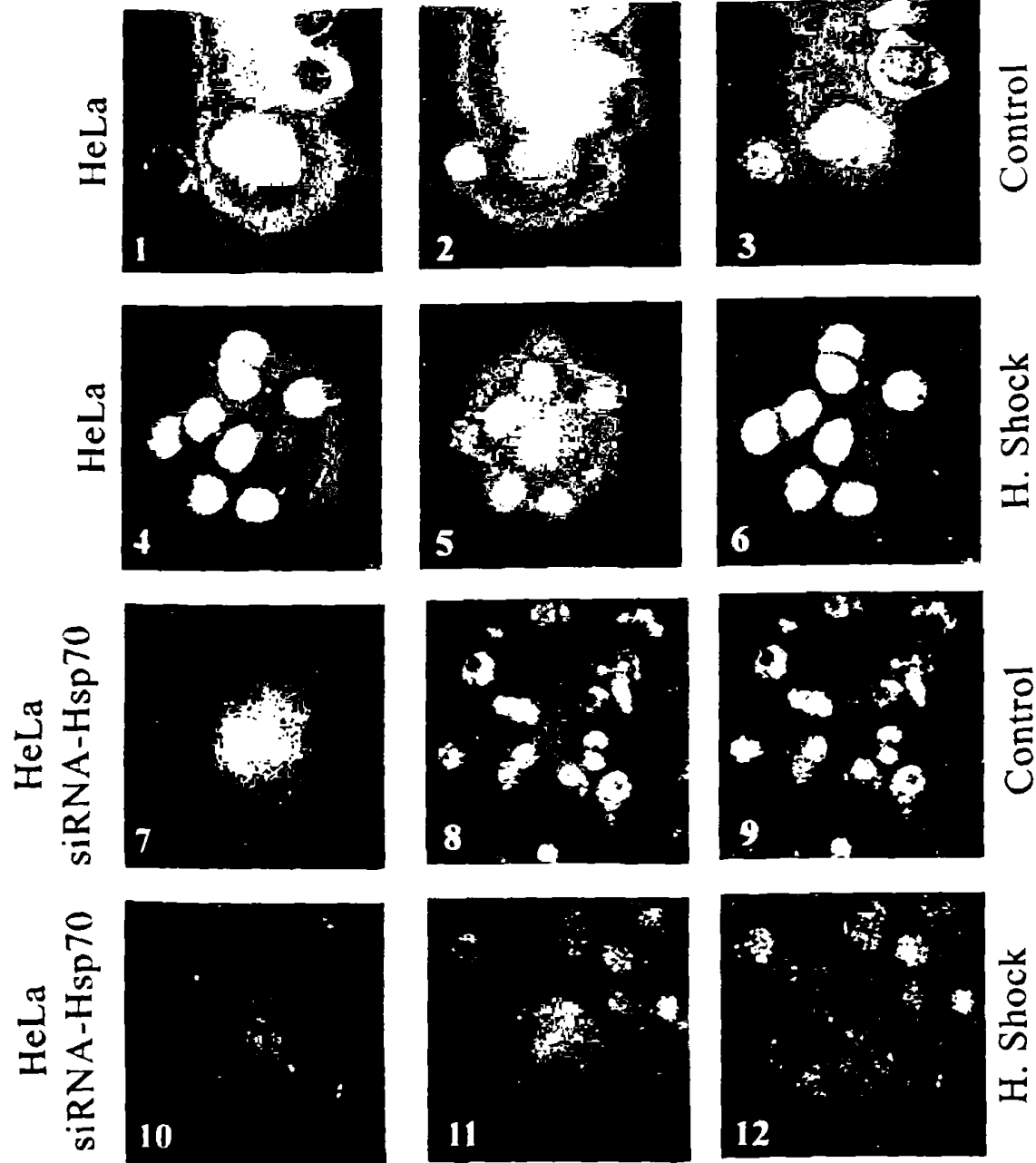




Η Hsp70 και η PARP-1 συσσωρεύονται στο πυρηνόπλασμα και τον πυρηνόσκο κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ και κυρίως συνεντοπίζονται στις ίδιες περιοχές. Ομοεστιακά τμήματα που δείχνουν ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση της Hsp70 και της PARP-1 σε κύτταρα HeLa (ένθετα: 1-6) και κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 (ένθετα: 7-12).

Όταν όμως τα HeLa κύτταρα εκτεθούν σε θερμικό σοκ 43,5 °C για 90 λεπτά και 90 λεπτά αργότερα επαναρρυθμιστούν στους 37 °C, η Hsp70 συσσωρεύεται στον πυρήνα και τον πυρηνόσκο (Εικ. 30, ένθετα 4, 6) και συνεντοπίζεται με την PARP-1 (Εικ.: 30, ένθετο 6) (πράσινος φθορισμός).





Εικ. 31: Υπομοριακή κατανομή της ενδογενούς Hsp70 και XRCC1 κατά τη διάρκεια φυσιολογικών συνθηκών ή θερμικού σοκ. Ομοεστιακά τμήματα που παρουσιάζουν ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση της Hsp70 και της XRCC1 στα κύτταρα HeLa (οι δύο πάνω σειρές των εικόνων) ή στα κύτταρα HeLa-siRNA-Hsp70 (οι δύο κάτω σειρές των εικόνων). Τα κύτταρα εκτέθηκαν ή όχι σε θερμικό σοκ (90 min σε 43.5 °C και 90 min επαναφοράς σε 37 °C) στερεοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη 4% και στη συνέχεια ακολούθησε διπλός ανοσοφθορισμός όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στη σκέψη για αλληλεπιδράσεις μεταξύ Hsp70 και PARP-1. Απουσία Hsp70 (Εικ. 30, ένθετα 7-12), ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού των πυρήνων της PARP-1 συσσωρεύεται στους πυρηνίσκους κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ (Εικ. 30, ένθετο 11). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η μετακίνηση της PARP-1 στους

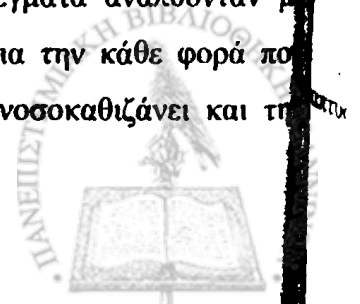
πυρηνίσκους γίνεται ανεξάρτητα από την παρουσία της Hsp70. Δεδομένου ότι PARP-1 είναι ένα πρωτεϊνικό μέλος επιδιορθωτικού συστήματος του DNA, δικαιολογημένα θα μπορούσαμε να πούμε αρχικά ότι η Hsp70 συμμετέχει ενδεχομένως σε μονοπάτια απόκρισης βλαβών του DNA (DNA damage response).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή σχέση της Hsp70 με την XRCC1 μίας πρωτεΐνης η οποία συνιστά ένα μόριο που συντονίζει και διευκολύνει το μηχανισμό επιδιόρθωσης σημειακών θραύσεων του DNA (Single- Strand Break Repair, SSBR) αλλά και το μηχανισμό επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής αζωτούχων βάσεων (Base Excision Repair, BER) στα θηλαστικά κύτταρα (Nazarkina ZK., et al, 2007). Η XRCC1 σε φυσιολογικές συνθήκες ευρίσκεται στον πυρήνα (Εικ. 31, ένθετο 2, κόκκινος φθορισμός). Κάτω όμως από την επίδραση του θερμικού σοκ φαίνεται ένα μέρος του πληθυσμού του να μεταναστεύει στους πυρηνίσκους (εικ. 31, ένθετο 5 κόκκινος φθορισμός) και να συνεντοπίζεται με την Hsp70 (εικ. 31, ένθετο 6 κίτρινοπράσινος φθορισμός). Στην περίπτωση που απουσιάζει η Hsp70 φαίνεται η μετακίνηση της XRCC1 στους πυρηνίσκους να επηρεάζεται μετά από θερμικό σοκ. Αυτή όμως η παρατήρηση χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να αποδειχθεί. Κατά συνέπεια, όλα τα ανωτέρω στοιχεία άρχισαν να αποκαλύπτουν, ότι η Hsp70 ενδεχομένως να συμμετέχει και να συντονίζει γνωστά μόρια αρμόδια για τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ.

#### **4.19. Η Hsp70 δεσμεύεται στην PARP-1 και την XRCC1 και ίσως να διευκολύνει το κύτταρα HeLa στην αντιμετώπιση των βλαβών του DNA.**

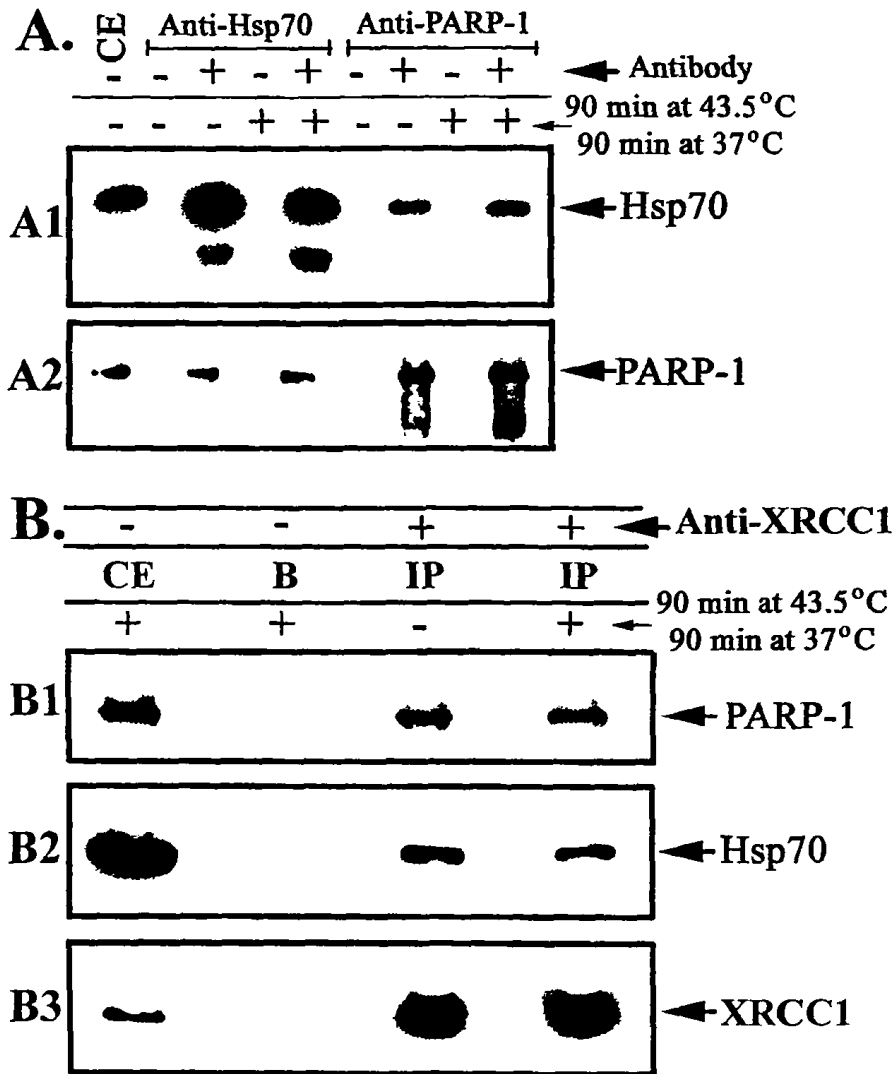
Για να ερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο της Hsp70 στην απόκριση σε βλάβες του DNA, εξετάσαμε εάν μπορούσε βιοχημικά η συγκεκριμένη πρωτεΐνη να συνδέεται με πρωτεΐνες, όπως η PARP-1 ή η XRCC1, που αφενός μεν παρατηρούμε έναν συνεντοπισμό τους με την Hsp70 αφετέρου δε συμμετέχουν σε μονοπάτια απόκρισης του κυττάρου μετά από βλάβες του DNA.

Η προσέγγιση αυτού του ενδιαφέροντος σημείου, έγινε με ανοσοκαθιζήσεις σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa υπό φυσιολογικές αλλά και υπό συνθήκες θερμικού σοκ. Συγκεκριμένα κάθε φορά προσθέταμε στο εκχύλισμα κάποιο από τα αντισώματα αντι- Hsp70 ή αντι-XRCC1 ή αντι-PARP-1 και στη συνέχεια τα ανοσοσυμπλέγματα αναλύονταν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα δύο αντισώματα για την κάθε φορά πο γίνονταν ανοσοκαθίξηση. Όπως αναμέναμε, το αντίσωμα Hsp70 ανοσοκαθιζάνει και τη





Hsp70 και την PARP-1 και το αντίστροφο το αντίσωμα PARP-1 ανοσοκαθίζει και την PARP-1 και την Hsp70 (Εικ. 32, A). Επιπλέον ανοσοκαθίζηση με αντίσωμα XRCC1 έδειξε ότι, υπάρχει σύνδεση μεταξύ και των τριών πρωτεϊνών (Εικ: 32 B, B1, B2, B3).



Εικ. 32: Η Hsp70 συνδέεται με τα επιδιορθωτικά μόρια του DNA, την PARP-1 και την XRCC1 σε κύτταρα HeLa. Ολικά εκχυλίσματα από κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και συνθήκες θερμικού σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς τους σε 37 °C), στα οποία κάθε φορά προσθέταμε κάποιο από τα αντισώματα ειδικά για Hsp70 ή XRCC1 ή PARP-1 και στη συνέχεια τα ανοσοσυμπλέγματα αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση (SDS PAGE) και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα δύο αντισώματα για την κάθε φορά που γίνονταν ανοσοκαθίζηση. [A] ανοσοκαθίζηση με anti-Hsp70 ή anti-PARP-1 και εμφάνιση των ανοσοκαθιζάντων με anti-Hsp70 (A1) ή anti-PARP-1 (A2). [B] Ανοσοκαθίζηση με anti-XRCC1 και εμφάνιση με anti-PARP1 (B1), anti-Hsp70 (B2) και anti-XRCC1 (B3). CE: κυτταρικό εκχύλισμα, IP: Ανοσοκαθίζηση (immunoprecipitation), B: Σφαιρίδια πρωτεΐνης G.

Βασισμένοι σε προηγούμενα στοιχεία σχετικά κυρίως με τις συνδέσεις που επιτυγχάνει η XRCC1 και συγκεκριμένα με την PARP-1 (Masson et al., 1998), την DNA



ligase III (Nash et al., 1997) και την DNA Pol $\beta$  (Caldecott KW, et al, 1996), μπορούμε να προτείνουμε ότι η Hsp70 είναι ενδεχομένως ένα νέο μόριο που διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση σημειακών θραύσεων (ssDNA) (εικ: 24). Οι μαζικές σημειακές θράσεις του DNA στην περιοχή του πυρήνα και του πυρηνίσκου κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ, υποχρεώνουν το κύτταρο να δημιουργήσει ένα μεγάλο πληθυσμό μορίων Hsp70 και να τα οδηγήσει στο στόχο τους που ίσως να είναι το κατεστραμμένο γDNA, το νουκλεοπλασματικό DNA και το μιτοχονδριακό DNA. Κατά συνέπεια, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η Hsp70 συσσωρεύεται στις περιοχές όπου υπάρχουν βλάβες του DNA προκειμένου να στρατολογήσει τις νανομηχανές των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών του DNA, επιταχύνοντας έτσι το προστατευτικό αυτό φαινόμενο.

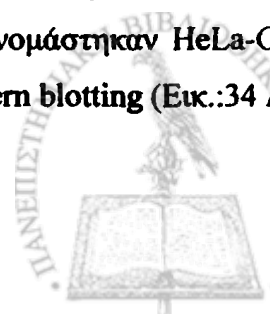
#### 4.20. Η Hsp70 συνδέεται στην περιοχή BRCT της PARP-1.

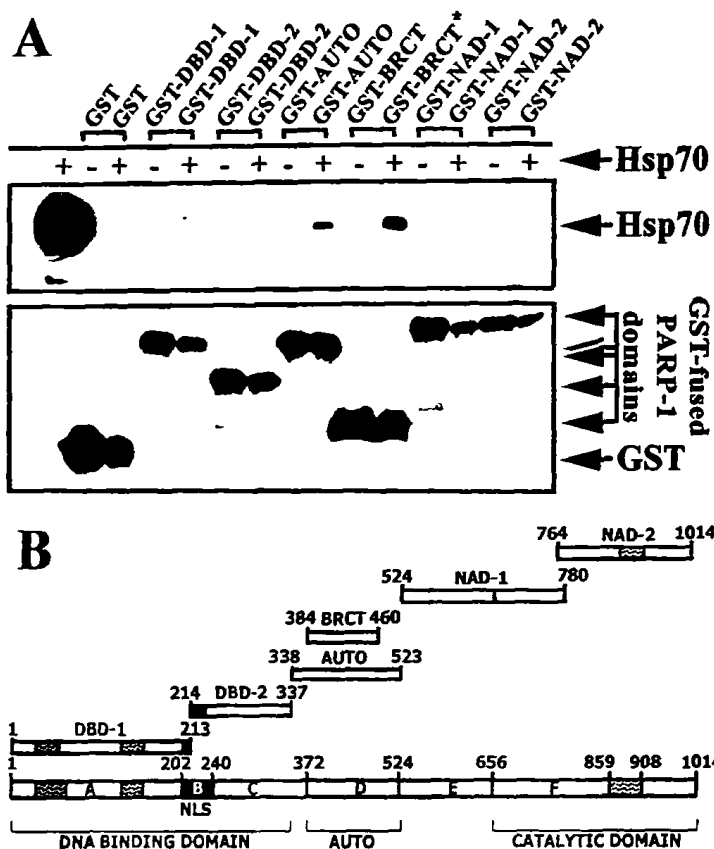
Για να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω το λειτουργικό αντίκτυπο αυτής της σύνδεσης μεταξύ των πρωτεϊνών Hsp70 και PARP-1, πραγματοποιήσαμε *in vitro* πειράματα χρησιμοποιώντας καθαρές χμιαϊκές πρωτεΐνες GST (εικ. 33 B). Αρχικά, το GST μόνο του αλλά και με τις διάφορες περιοχές της PARP-1, δηλαδή τα GST-DBD1, GST-DBD2, GST-AUTO, GST-BRCT, GST-NAD1 και GST-NAD2 καθαρίστηκαν (εικ: 33 A, κάτω ένθετο) όπως έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Gwack Y, et al. 2003). Αφετέρου, η ανθρώπινη Hsp70 (εικ. 33 A, άνω ένθετο) καθαρίστηκε με τη μέθοδο Bac-to-Bac σε κύτταρα εντόμων (Salma A, et al., 2007).

Πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down) έδειξαν ότι μόνο η περιοχή BRCT και σε μικρότερο βαθμό και η περιοχή AUTO της PARP-1 δεσμεύονται στην Hsp70 (εικ: 33 A, άνω ένθετο). Αυτή η εύρεση ήταν πολύ σημαντική, δεδομένου ότι BRCT περιοχές περιέχουν σε δομή τους κάποιες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε συστήματα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, όπως η XRCC1, η DNA ligase III και το BRCA-1 (Rodriguez M., et al, 2003).

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω το σημαντικό αυτό εύρημα, προσπαθήσαμε να επαναλάβουμε την *in vitro* σύνδεση της περιοχής BRCT με την Hsp70 σε ένα σύστημα *sem* *in vivo*

Έτσι, HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pBC-D, το οποίο έχει υποκλωνοποιημένο την BRCT δομή και μπορεί να την υπερεκφράσει σε θηλαστικά κύτταρα. Μετά από επιλογή, οι σταθερά μετασχηματισμένοι κλώνοι, που ονομάστηκαν HeLa-GST-BRCT υπερέκφραζαν τη δομή GST-BRCT όπως αναλύθηκε με western blotting (Εικ.:34 A).

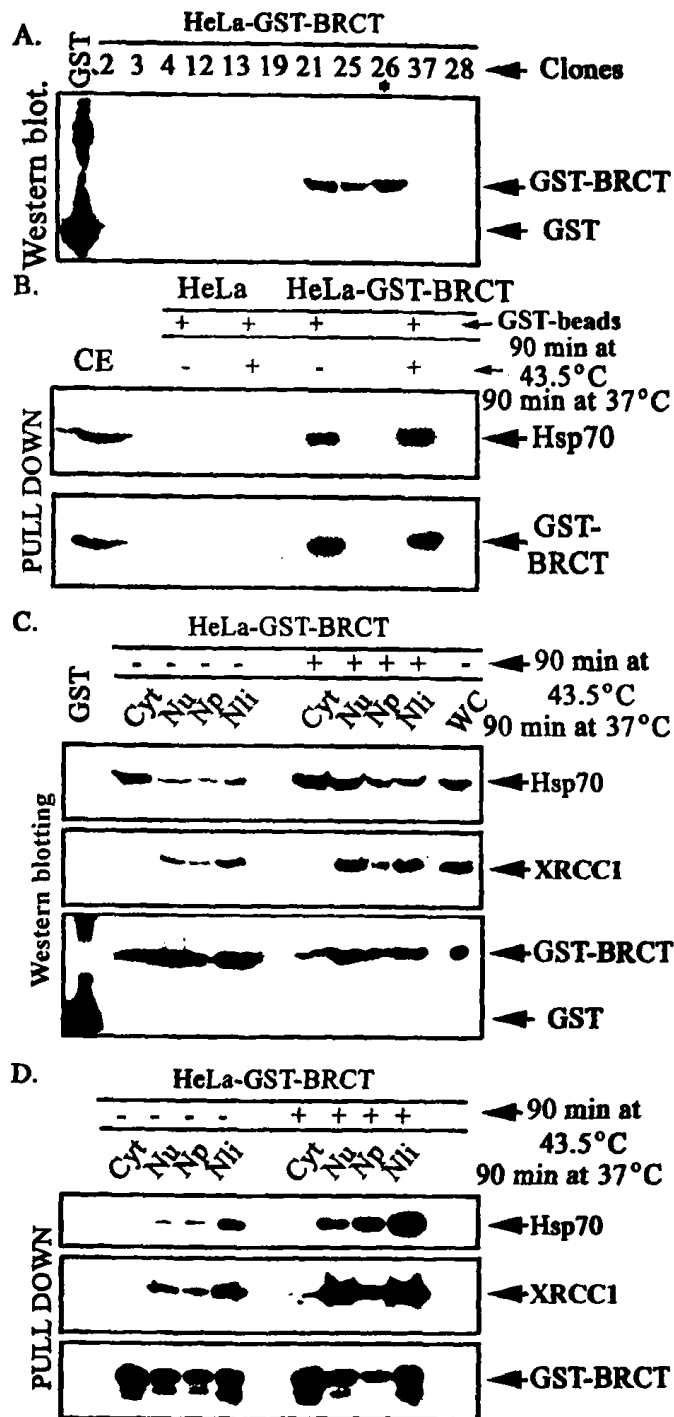




**ικ. 33: Η ανθρώπινη καθαρή Hsp70 συνδέεται στις περιοχές AUTO και BRCT της PARP-1.** [A] 1 μg ποσότητας πρωτεΐνης GST, GST-DBD1, GST-DBD2, GST-AUTO, GST-BRCT, GST-NAD1 και GST-NAD2 αναμίχθηκε κάθε φορά με ποσότητα 0,5 μg ανθρώπινης καθαρής Hsp70 πρωτεΐνης και τα μίγματα υποβλήθηκαν αρχικά σε πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down). Στη συνέχεια τα ήματα που προέκυψαν, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (western blotting) χρησιμοποιώντας αντισώματα συγκεκριμένα για GST (A, κάτω ένθετο) ή Hsp70 (A, άνω ένθετο). [B] Αναπαράσταση των δομών της PARP-1 κατά Gwack Y, et al. 2003.

Τα κύτταρα του κλώνου 26 επιλέχθηκαν, όπως υποδεικνύονται στην εικ. 34, και τα εκχυλίσματά τους υποβλήθηκαν σε πειράματα συγκατακρήμνισης. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν το ίδιο που παρατηρήθηκε και με τις καθарές πρωτεΐνες, δείχνοντας ότι η περιοχή BRCT αναγνωρίζεται πράγματι από την Hsp70 και η σύνδεσή τους πραγματοποιείται ανεξάρτητα από το θερμικό σοκ (εικ.: 34 B). Για να καθορίσουμε συγκεκριμένα ότι η σύνδεση μεταξύ των BRCT- Hsp70 δημιουργείται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down). Όπως παρουσιάζεται, η Hsp70 συνδέεται με την περιοχή BRCT, στον πυρήνα, το πυρηνόπλασμα και στους πυρηνίσκους (εικ.: 34 D). Απροσδόκητα, δεν παρατηρήσαμε καμία σύνδεση μεταξύ τους στο κυτταρόπλασμα αν και οι δύο πρωτεΐνες είναι παρούσες (εικ.: 34 C).





**Εικ. 34: Η περιοχή BRCT της PARP-1 συνδέεται με την Hsp70 σε κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν τη χημαιρική πρωτεϊνική δομή GST-BRCT. [A]** HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pBC-D και οι σταθερά μετασηματισμένοι κλώνοι, που ονομάστηκαν HeLa-BRCT-GST και υπερέκφραζαν τη δομή GST-BRCT απομονώθηκαν με το αντιβιοτικό G-418. Η έκφραση της χημαιρικής πρωτεϊνικής δομής GST-BRCT ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-GST σε ανοσοαποτύπωση. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος 26 (βλέπε αστερίσκο). **[B]** Ο κλώνος 26 χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προετοιμαστούν ολόκληρα εκχυλίσματα κυττάρων υπό φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφορτούς σε 37 °C). Τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συγκατακρήμνισης που έδειξαν τη σύνδεση μεταξύ της Hsp70 και της περιοχής BRCT. **[C]** Τα ίδια κύτταρα διαχωρίστηκαν στα υποκυτταρικά κλάσματα: κυτταρόπλασμα (Cyt), πυρήνας (Nu), πυρηνόπλασμα (Np), πυρηνίσα

(Nli) και κάθε κλάσμα αναλύθηκε για τη συσσώρευση των Hsp70, GST-BRCT και XRCC1 σε συνθήκες φυσιολογικές ή θερμικού σοκ με ανοσοαποτύπωση. [D] τα ίδια κλάσματα, όπως στο C, χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα συγκατακρήμνισης. Όπως παρουσιάζεται, η Hsp70 δεσμεύεται στην GST-BRCT και την XRCC1, μόνο στον πυρήνα, το πυρηνόπλασμα και τον πυρηνίσκο, ανεξάρτητα από τη θερμική επεξεργασία.

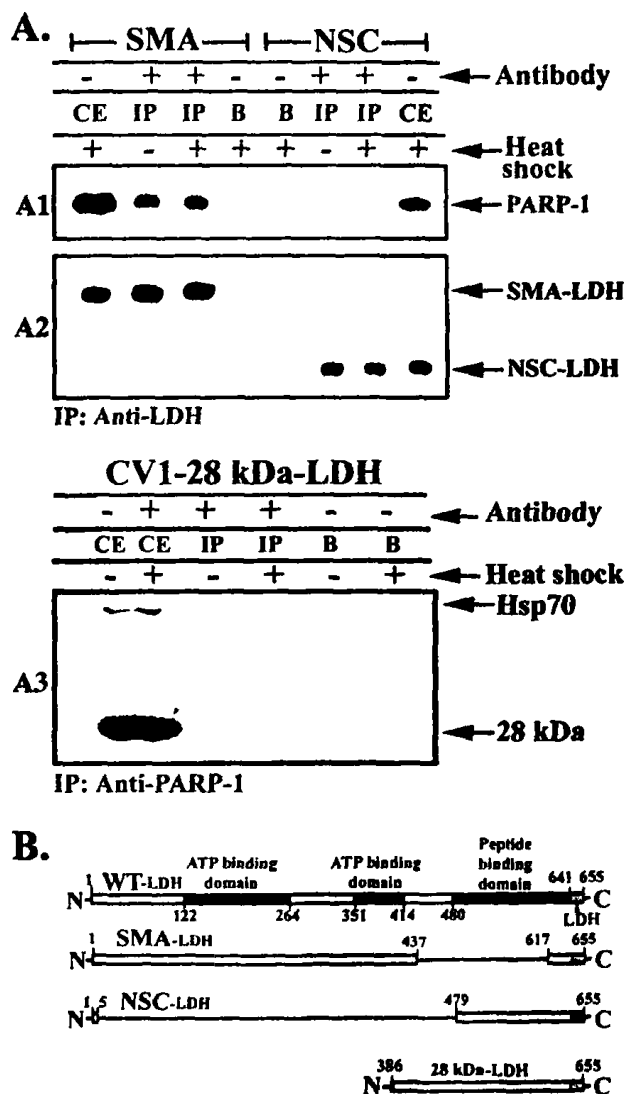
Αυτή η απόκλιση μελετήθηκε επανειλημμένα και προσεκτικά αλλά καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι αυτή η παρατήρηση είναι πραγματικότητα. Αν θέλαμε να εξηγήσουμε αυτό το φαινόμενο θα μπορούσαμε γενικά, να προτείνουμε ότι η BRCT περιοχή, ίσως στα ευκαρυωτικά κύτταρα, να υφίσταται κάποιες τροποποιήσεις στο κυτταρόπλασμα, το οποίο δεν είναι το φυσιολογικό διαμέρισμα λειτουργίας της, με αποτέλεσμα να χάνεται αυτή η σύνδεσή της με την Hsp70. Αυτές οι τροποποιήσεις ίσως να μην συμβαίνουν στον πληθυσμό των μορίων GST-BRCT που βρίσκονται στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο όπου είναι το φυσιολογικό διαμέρισμα λειτουργίας της BRCT περιοχής, με αποτέλεσμα εκεί μόνο να παρατηρείται η σύνδεση Hsp70-BRCT.

## 21. Η Hsp70 συνδέεται στην PARP-1 μέσω της ATPase περιοχής της.

Έχοντας ταυτοποιήσει την περιοχή της PARP-1 με την οποία συνδέεται στην Hsp70, αποφασίσαμε να ερευνήσουμε περαιτέρω την περιοχή της Hsp70 με την οποία συνδέεται την PARP-1. Για αυτόν το λόγο, χρησιμοποιήσαμε CV1 κυτταρικές σειρές (SMA-LDH και NSC-LDH) που υπερεκφράζουν αντίστοιχα την περιοχή ATPase της Hsp70 και την περιοχή δέσμευσης πεπτιδίων (PBD, Peptide Binding Domain) της Hsp70. Οι περιοχές αυτές φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μία χαρακτηριστική αλληλουχία 11 αμινοξέων της LDH (Lactate Dehydrogenase) των όρχεων (Milarski, K.L. & Morimoto, R.I. 1989). Ολόκληρα κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα για την αλληλουχία LDH έγιναν πειράματα ανοσοκαθίζησης. Μόνο η ATPase περιοχή της Hsp70, στο εκχύλισμα των κυττάρων SMA-LDH που υπέστησαν θερμικό σοκ ή όχι, συγκατακρήμνιστηκε με την PARP-1. Αντίθετα, στα κύτταρα NSC-LDH η περιοχή δέσμευσης πεπτιδίων (PBD) είναι ανίκανη να δεσμεύσει την PARP-1 (Εικ: 35 A, A1 και A2). Όπως αναμένονταν, παρόμοια πειράματα χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα κυττάρων CV1 που υπερεκφράζουν το καρβοξυτελικό τμήμα μεγέθους 28 kDa-LDH της Hsp70, επιβεβαίωσαν ότι μόνο η περιοχή ATPase της Hsp70 συνδέεται στην περιοχή BRCT της PARP-1 (εικ: 35 A3). Οι διαφορές μεταξύ των κυττάρων NSC-LDH και 28 kDa-LDH είναι ότι στη δεύτερη κυτταρική σειρά εμπεριέχεται στην παραγόμενη πρωτεΐνη η περιοχή σύνδεσης (επίτοπος) του



αντισώματος SPA-810 (437-504 AA) για την Hsp70, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα. Σημειώστε ότι αυτή η περιοχή σύνδεσης του αντισώματος (επίτοπος) είναι απόυσα (εικ: 35 B) στα κύτταρα NSC-LDH που υπερεκφράζουν την PBD και για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούμε το αντίσωμα αντι-LDH.

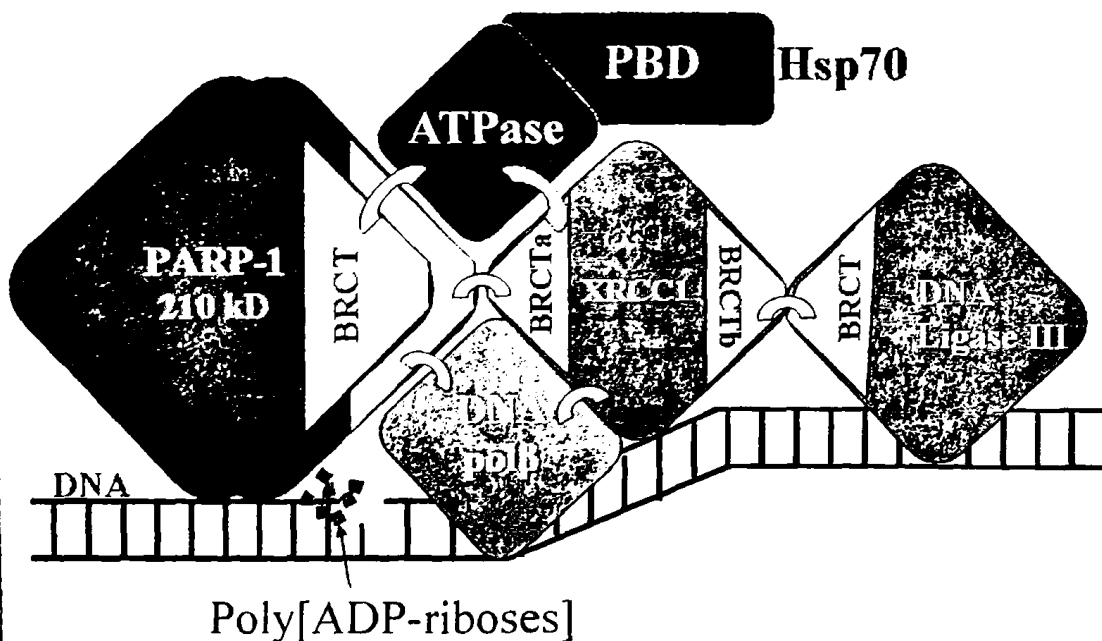


**Εικ. 35:** Η Hsp70 δεσμεύεται στην PARP-1 μέσω της ATPase περιοχής της. [A] Σταθεροποιημένες κυτταρικές σειρές CV1 που υπερεκφράζουν την ATPase περιοχή (SMA-LDH) ή την περιοχή δέσμευσης πεπτιδίων PBD (NSC-LDH) ή το καρβοξυτελικό τμήμα 28 kDa-LDH της Hsp70, εκτέθηκαν σε φυσιολογικές ή συνθήκες θερμικού σοκ (90 λεπτά σε 43,5 °C και 90 λεπτά επαναφοράς τους σε 37 °C). Πειράματα ανοσοκαθίζησης όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα αντι-LDH ή αντι-Hsp70 αποκάλυψαν ότι μόνο η περιοχή ATPase της Hsp70 αλληλεπιδρά και συνδέεται με την PARP-1. [B] η αναπαράσταση των μεταλλαγμένων περιοχών της Hsp70 που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία, είναι βασισμένη μερικώς σε προηγούμενο σχήμα (Milarski, K.L. & Morimoto, R.I., 1989, Angelidis et al, μη δημοσιευμένα στοιχεία).



Συνολικά, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η BRCT περιοχή της PARP-1 δεσμεύεται στην ATPase περιοχή της Hsp70. Σύμφωνα με τα παρουσιαζόμενα στοιχεία, η Hsp70 δεσμεύεται στην PARP-1 και την XRCC1 και ίσως να στρατολογεί και τα δύο μόρια στη σημειακή θραύση του DNA όπου η μοριακή μηχανή επιδιόρθωσης κατασκευάζεται. Η σύνδεση μεταξύ PARP-1 και Hsp70 πραγματοποιείται μέσω της περιοχής BRCT της PARP-1 και της περιοχής ATPase της Hsp70. Όμως δεδομένου του ότι η Hsp70 δεν συνιστά μία DNA συνδεόμενη πρωτεΐνη θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η Hsp70 συμμετέχει στις νανομηχανές επιδιόρθωσης, δεν συνδέεται άμεσα στο DNA αλλά στις DNA συνδεόμενες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης (Εικ. 36). Όμως για να αποδειχθεί αυτό το μοντέλο θα πρέπει να γίνουν επιπλέον πειράματα καθίζησης χρωματίνης (CHIP) και ανάλυσης των συνδεόμενων πρωτεϊνών.

Εναλλακτικά όμως μπορούμε να υιοθετήσουμε το μοντέλο της εικόνας 37 όπου η Hsp70 δεν καθιλώνεται επάνω στις θραύσεις του DNA αλλά αλληλοαντιδρά με την PARP-1 σχηματίζοντας την στον ομο-διμερισμό της και βοηθά στην στρατολόγηση των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται από την BRCT δομή τους έτσι ώστε να τις κατευθύνει προς τον στόχο τους που είναι η επιδιόρθωση των σημειακών θραύσεων του DNA.



Εικόνα 36: Ένα υποθετικό μοντέλο της σύνδεσης της Hsp70 στα μέλη του συστήματος BER. Η Hsp70 δεσμεύεται στις περιοχές BRCT της PARP-1 και ίσως και της XRCC1 και ενδεχομένως να βοηθάει τη διαμόρφωσή τους διαμέσου της πολυ[ADP-ριβοσυλίωσης] από την PARP-1 αλλά και τη νανομηχανή του συστήματος BER.

**5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

**ΚΑΙ**

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**





## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για πολλά χρόνια ήταν άγνωστο ο σκοπός της Hsp70 για τον οποίο μεταφέρεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ. Μερικά χρόνια πριν δημοσιεύτηκε ότι η Hsp70 συσσωρεύεται με τα μετουσιωμένα υποστρώματα στους πυρηνίσκους τα οποία και επιδιορθώνει κατά την επαναφορά των κυττάρων που έχουν υποστεί στρες. Ο πυρηνίσκος δηλαδή αποτελεί ένα πρόσκαιρο αποθηκευτικό χώρο και χώρο σκησης για μεθύτερη πρωτεϊνική επιδιόρθωση. Αυτή η μη πειστική εξήγηση θα γινόταν με ερικές αμφιβολίες αποδεχτή εάν δεν παρουσιάζαμε την παρούσα εργασία η οποία προσδίδει έες λειτουργίες της Hsp70 στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο. Βέβαια τα αποτελέσματα που αρατίθενται στην παρούσα Δ.Δ. δεν είναι αντίθετα με αυτά τα οποία παρουσιάζει η νταγωνιστική ομάδα (Nollen et al., 2001). Αντιθέτως όλο και πιο πολύ πλησιάζουμε να υμφωνήσουμε όλες οι Επιστημονικές ομάδες σε αυτό το οποίο εμφανίζεται καθαρότερα ελευταία, δηλαδή στο ότι οι σημαντικές λειτουργικές πρωτεΐνες εμφανίζουν ταυτόχρονα αφορετικές λειτουργίες τόσο σε διαφορετικούς υποκυτταρικούς χώρους και πολλές φορές τους ίδιους χώρους. Έτσι στον ίδιο χώρο ένας πληθυσμός μίας πρωτεΐνης μπορεί να νδέεται με διαφορετικούς πρωτεϊνικούς συνεργάτες από αυτούς που συνδέεται ένας άλλος ηθυσμός της ίδιας πρωτεΐνης ασκώντας ο καθένας διαφορετική λειτουργία.

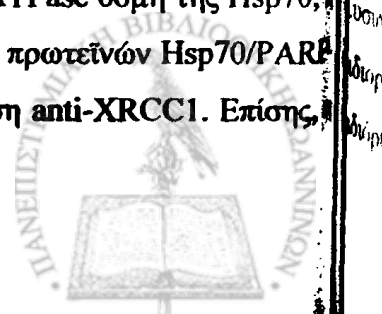
Έτσι προκειμένου να δοθεί μία εξήγηση για αυτήν την άμεση μετακίνηση της Hsp70 στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο προσπαθήσαμε να βρούμε το στόχο της Hsp70 καθώς και τον ρλο της σε αυτούς τους υποκυτταρικούς χώρους.. Με τι σχετίζεται αυτή η μετακίνηση; Με ιδιόρθωση πρωτεϊνών οι οποίες υπέστησαν βλάβες κατά την έκθεση των κυττάρων σε τρες ή με κάτι νέο το οποίο έπρεπε να ανιχνευτεί; Εξετάσαμε αρχικά το ρόλο της Hsp70 την θερμοευαισθησία και την απόπτωση των κυττάρων χρησιμοποιώντας την κυτταρική ιρά HeLa όπου έχει αποσιωπηθεί η Hsp70 μέσω της τεχνολογίας siRNA. Αποδείχθηκε ότι αι κύτταρα που απουσίαζε η Hsp70 ήταν ευαίσθητα στη θερμότητα και παρουσίαζαν εξημένη απόπτωση. Ποιος όμως ήταν ο μηχανισμός με τον οποίο η Hsp70 παρενέβαινε και ηρέαζε τις διαδικασίες του κυτταρικού θανάτου; Για πολλά χρόνια δεν ήταν γνωστό το οοπτικό μονοπάτι μέσω του οποίου δρα το θερμικό σοκ. Προηγούμενες μελέτες με *in vο* πειράματα κατέδειξαν ότι η θερμότητα ενεργεί ενδεχομένως μέσω της επίθεσης εθυέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που οδηγούν σε οξειδωτική βλάβη του DNA (Reddy M.V., al, 1992, Bruskov VI, et al, 2002). Λαμβάνοντας υπ'όψιν όλα τα παραπάνω, εστίασαμε



στην έρευνα πιθανών συνεργατών της Hsp70 που να εμπλέκονται σε συστήματα επιδιόρθωσης του DNA και ειδικά σε περιοχές όπου η Hsp70 μετακινείται και συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ, όπως είναι το πυρηνόπλασμα και ο πυρηνίσκος. Σημειώστε ότι στις ίδιες περιοχές είναι κυρίως οι στόχοι των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που είναι το νουκλεοπλασματικό ή το ριβοσωμικό DNA.

Για την επίτευξη των στόχων αυτών τροποποιήσαμε μία τεχνική για την περαιτέρω μελέτη της πυρηνικής απόπτωσης και εν συνεχεία, παρείχαμε αποδεικτικά στοιχεία για την προστατευτική επίδραση της Hsp70 στην ακεραιότητα του ριβοσωμικού DNA κατά τη διάρκεια της έκθεσης των κυττάρων σε θερμικό σοκ. Η τεχνική Comet Assay σε πυρηνίσκους (Nucleolar Comet Assay, NCA) αποτελεί μία νέα ισχυρή τεχνική για τη μελέτη πυρηνικής απόπτωσης καθιστώντας ορατά τις σημειακές θραύσεις του DNA στους θερμικά επεξεργασμένους πυρηνίσκους. Όπως αποδείχθηκε η απουσία της Hsp70 είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των σημειακών θραύσεων του DNA (ssDNA breaks) παρατήρηση η οποία συμφωνούσε με δημοσιευμένη εργασία μας η οποία απεδείκνυε το ίδιο σε συνολικούς πυρήνες (Doulias P-T., et al, 2007). Τις σημειακές θραύσεις του rDNA ήταν ανάλογα του αποπτωτικού ερεθίσματος (θερμικό σοκ). Παράλληλα με αυτήν την τεχνική ανίχνευσης της εύρεσης των σημειακών θραύσεων χρησιμοποιήθηκαν και 2 τρόποι ανίχνευσης της απόπτωσης, μία με τον αποπτωτικό δείκτη PARP-1 και μία με κυτταρομετρία ροής. Και οι δύο τεχνικές απέδειξαν ότι το μέγεθος της απόπτωσης είναι ανάλογη με το μέγεθος της DNA βλάβης σε επίπεδο σημειακών θραύσεων. Έτσι αυτό που φανερόνταν πλέον ήταν η σχέση της Hsp70 με τις βλάβες στο DNA και με την πυρηνισκική/πυρηνική απόπτωση. Για την περαιτέρω εμβάθυνση του μηχανισμού δράσης της Hsp70 αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα άμεσα, τόσο *in vitro* όσο και *semi-in vivo* που στηρίζονται κυρίως σε αντιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθώς και σε πειράματα μικροσκοπική παρατήρησης των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου.

Στην αρχή, χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο, διαπιστώσαμε ότι η Hsp70 συνεντοπίζεται με την PARP-1 και την XRCC1. Αργότερα διαλευκάναμε αυτές τις πιθανές αλληλεπιδράσεις με πειράματα ανοσοκαθίξεων (IP) και συγκατακρημνίσεων (pull down) χρησιμοποιώντας GST καθαρές πρωτεΐνες ή κυτταρικά εκχυλίσματα. Έγινε γνωστό ότι Hsp70 δεσμεύεται με την PARP1 και στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους. Επίσης ταυτοποιήθηκαν η σύνδεση της BRCT δομής της PARP-1 με την ATPase δομή της Hsp70, σύνδεση της Hsp70 με την XRCC1 και τέλος η σύνδεση των τριών πρωτεϊνών Hsp70/PARP1/XRCC1 σε ανοσοκαθίξη σε κυτταρικό εκχύλισμα με την χρήση anti-XRCC1. Επίσης,

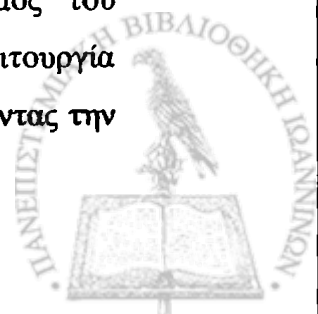


δια τριπλή πρωτεϊνική σύνδεση αποδείχθηκε ότι γίνεται και σε κυτταρικά εκχυλίσματα στα οποία υπερεκφράζεται η BRCT υπό μορφή χημεικής GST-BRCT πρωτεΐνης. Σε πείραμα συγκατακρήμνισης (pull down) η GST-BRCT πρωτεΐνη ομοκαθιζάνει και τις Hsp70 και XRCC1. Όλα αυτά τα πειράματα παρέχουν τα πρώτα βιοχημικά στοιχεία, ότι η Hsp70 διαδραματίζει έναν προστατευτικό ρόλο κατά των βλαβών του νουκλεοπλασματικού και πυρηνισκικού DNA που προκαλούνται από το θερμικό σοκ. Επιπλέον, αυτός ο προστατευτικός ρόλος φαίνεται να περιλαμβάνεται σε αποπτωτικά μονοπάτια που περιέχουν σημειακές θραύσεις του νουκλεοπλασματικού και πυρηνισκικού DNA.

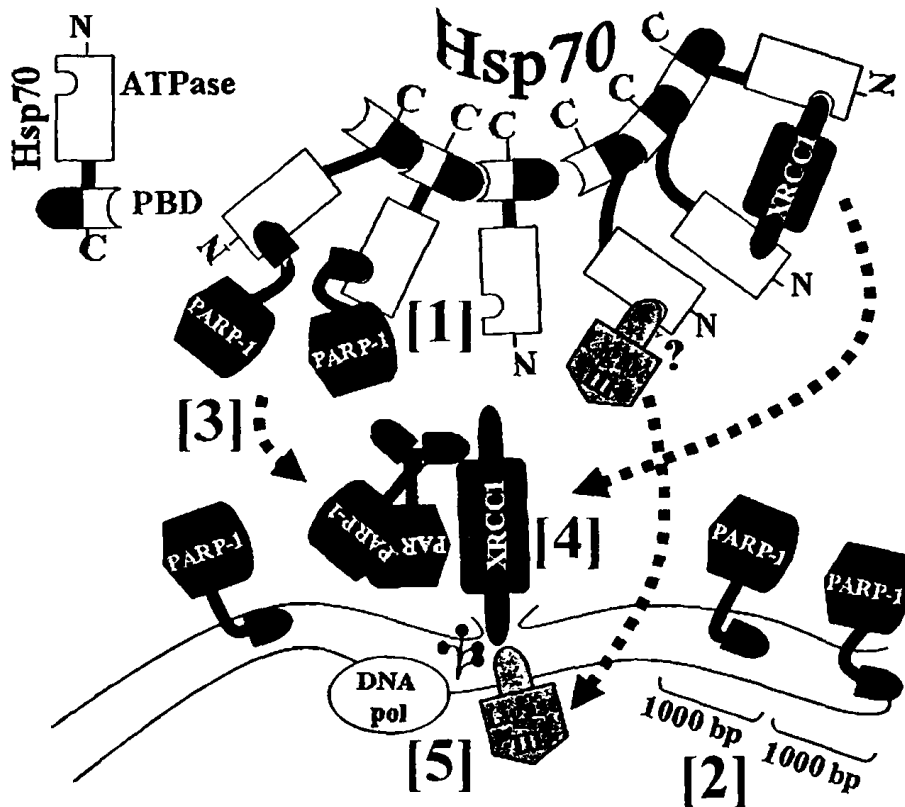
Δεδομένου ότι η Hsp70 αποτελεί ένα βασικότατο μόριο ρύθμισης της ποιότητας των πρωτεϊνών, προτείνουμε στην παρούσα εργασία άλλον έναν ρόλο της Hsp70 που έχει να κάνει με την προστασία των σημειακών θραύσεων του DNA. Και οι δύο λειτουργίες αθιστούν την Hsp70 ως μία σημαντικότερη συνοδό πρωτεΐνη που κατέχει έναν κυρίαρχο ρόλο σε αυτό που ονομάζουμε προστασία μεγάλων βιομορίων ή ποιοτική ρύθμιση των πρωτεϊνών και του DNA. Επίσης, για πρώτη φορά αποδεικνύεται ο πιθανός ρόλος της Hsp70 στο πυρηνόπλασμα και στον πυρηνίσκο, προτείνοντας την προστασία και των δύο τύπων υπο-πυρηνικών διαμερισμάτων από τις σημειακές θραύσεις του DNA. Πιθανώς, είναι για πρώτη φορά που προτείνεται για κάποια συνοδό πρωτεΐνη, η λειτουργική της εμπλοκή σε τόσο διαφορετικά υποστρώματα. Οι επόμενες προσπάθειές μας πρέπει να εστιαστούν στην εξέταση όλων των συνεργατών της Hsp70 σχετικά με τη λειτουργία της στην περιοχή του πυρήνα και του πυρηνίσκου.

Τέλος, μπορούμε να προτείνουμε ένα νέο μοντέλο επιδιόρθωσης των σημειακών θραύσεων που περιλαμβάνει ένα επιπλέον σημαντικό μόριο, την Hsp70. Σύμφωνα με προηγούμενα αλλά και παρόντα στοιχεία, η Hsp70 σε μονομερή ή ολιγομερή κατάσταση συστρατεύει στην περιοχή μίας σημειακής θραύσης του DNA (ssDNA) όλα τα μόρια, ειδικά αυτά που έχουν περιοχή BRCT, τα οποία και συμμετέχουν στις επιδιορθωτικές μηχανές (Εικ. 3).

Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο, η PARP-1 διμερίζεται, ενδεχομένως μέσω της Hsp70, και ιχνηθετεί με πολυμερή ADP-ριβόζης, τον εαυτό της, ιστόνες αλλά και μη ιστόνες στο σημείο όπου έχει δημιουργηθεί κάποια θραύση, με αποτέλεσμα λόγω απώθησής τους από το DNA, να χαλαρώσει η περιοχή αυτή. Η XRCC1 κρατά και τα δύο άκρα της σπασμένης αλυσίδας σε μία σταθερή κατάσταση, έως ότου ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του επιδιορθωτικού συμπλέγματος. Εν συνεχεία, η μοριακή μηχανή αναλαμβάνει τη λειτουργία επιδιόρθωσης. Η Hsp70 ίσως να παρέχει μία πλατφόρμα με πολλά χέρια, επιταχύνοντας την



οργάνωση και μετακίνηση των επιδιορθωτικών μορίων του DNA ανάμεσα στις σημειακές θραύσεις, όπου και δημιουργούνται οι επιδιορθωτικές μηχανές (εικ. 37).



Εικ. 37: Υποθετικό μοντέλο της λειτουργίας της Hsp70 στην απόκριση βλαβών του DNA στο πυρηνόπλασμα και στους πυρηνίσκους. Η Hsp70 διευκολύνει τις επιδιορθωτικές μηχανές των σημειακών θραύσεων του DNA, με τη δημιουργία και την οργάνωση των μορίων τους και ταυτόχρονα την επιτάχυνση της λειτουργίας τους. Η Hsp70 υπάρχει ως μονομερή ή ολιγομερή μορφή και οδηγεί τα επιδιορθωτικά-μόρια στην πλευρά μίας σημειακής θραύσης του DNA. (1). Ένα μόριο PARP-1 υπάρχει κάθε 1000 ζβ του DNA (2) Η PARP-1 διμερίζεται, ενδεχομένως μέσω της ικανότητας της Hsp70 στην αναδίπλωση, και καταλύει αντιδράσεις πολυ ADP-ριβοσυλίωσης (3) Η XRCC1 δεσμεύεται στα άκρα της σημειακής θραύσης του DNA και τα κρατά σε μία θέση κατάλληλη για να επιδιορθωθούν (4) Η DNA Ligase III και η DNA Polβ ολοκληρώνουν την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA (5).

Η παρούσα εργασία αναφέρεται και στηρίζει μία απροσδόκητη και νέα εύρεση που αφορά την ταυτόχρονη προστασία και διατήρηση της ποιότητας τόσο των πρωτεϊνών όσο και των DNAs, από την Hsp70. Μέχρι σήμερα ήταν αποδεκτό ότι η Hsp70 συμμετέχει άμεσα και ρυθμίζει τις μοριακές νανομηχανές για την αναδίπλωση. Στην παρούσα εργασία όμως προτείνεται ένας νέος ρόλος για την Hsp70 που αφορά την ρύθμιση των σημειακών



θραύσεων του νουκλεοπλασματικού DNA και του rDNA. Βέβαια δεν αποκλείεται και η πιθανότητα η Hsp70 να παρεμβαίνει και στην προστασία της ποιότητας του RNA δεδομένου του ότι από παλιά είναι γνωστό ότι συνιστά RNPs συνδεόμενη πρωτεΐνη. Οι μελλοντικές μελέτες ενδεχομένως να στοχεύσουν στη διεύθυνση αυτού του θέματος προσθέτοντας περαιτέρω στοιχεία.



# 6. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες Hsp70 και Hsp40 συνεργάζονται μεταξύ τους, αφού ασκούν πολλές από τις λειτουργίες τους μέσω δημιουργίας νανομηχανών. Στην παρούσα εργασία κατασκευάζοντας, με την τεχνολογία siRNA, κυτταρικές σειρές HeLa που δεν εξέφραζαν τις πρωτεΐνες Hsp70 ή Hsp40, ελέγχθηκε η αυξημένη θερμοευαισθησία και απόπτωση που παρουσιάζουν αυτοί οι κλώνοι μετά από θερμικό σοκ αλλά και κάτω από επίδραση διαφόρων χημικών παραγόντων, λόγω της έλλειψη αυτών των πρωτεϊνών. Επίσης, αποκαλύφθηκε ότι η παρουσία της μίας πρωτεΐνης επηρεάζει τη ρύθμιση της άλλης όπως και το αντίστροφο. Βρέθηκεάλιστα ότι πιθανόν αυτός ο κοινός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασής τους να συμβαίνει στο επίπεδο της μεταγραφής ή της ωρίμανσης του RNA.

Για πολλά χρόνια ήταν άγνωστος ο στόχος της μετακίνησης της Hsp70 στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο μετά από θερμικό σοκ. Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι η Hsp70 μετακινείται στους πυρηνίσκους, κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ, μαζί με τα μετουσιωμένα υποστρώματα προκειμένου να τα επαναφέρει στη λειτουργική τους κατάσταση κατά τη διάρκεια της επαναφοράς των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες.

Στην παρούσα εργασία προτείνουμε ότι η μετακίνηση της Hsp70 στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους γίνεται προκειμένου να συμμετέχει σε διάφορα μονοπάτια σχετικά με την προστασία του νουκλεοπλασματικού DNA ή του πυρηνισκικού DNA (rDNA) από τα μονής αλυσίδας κασίματα τους. Η απουσία της Hsp70 σε κύτταρα HeLa, μέσω γονιδιακής αποσιώπησης (knockdown), έδειξε τον ουσιαστικό ρόλο της Hsp70 στην ακεραιότητα του DNA, αφού κύτταρα HeLa με μηδαμινά επίπεδα Hsp70 ήταν πολύ ευαίσθητα σε θερμική επεξεργασία και οι θραύσεις στο DNA τους ήταν πολλαπλάσια σε σύγκριση με αυτά των κανονικών κυττάρων HeLa. Ελετήθηκε ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η Hsp70 εκτελεί το ρόλο της στο επίπεδο πυρήνα και πυρηνίσκου κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ. Η Hsp70 συνεντοπίζεται με την PARP1 στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους όπως παρατηρείται σε μελέτες ανοσοφθορισμού με συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal) και δεσμεύεται μέσω της ATPase περιοχής της, στην περιοχή BCRT της PARP1 όπως αποκαλύπτεται με πειράματα αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών (pull down). Επίσης, διαπιστώσαμε ότι Hsp70 δεσμεύεται επίσης, ταυτόχρονα και στην XRCC1 (αποκλειστική πρωτεΐνη μηχανισμών επιδιόρθωσης) και στην PARP-1, γεγονός που υποδεικνύει ότι η λειτουργία της Hsp70 πιθανόν να λαμβάνει μέρος στο επίπεδο επιδιόρθωσης του DNA και ίσως στο σύστημα



επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής βάσεων (BER). Κάνοντας ένα υποθετικό μοντέλο, μπορούμε να προτείνουμε ότι η Hsp70 είναι το μόριο που δεσμεύεται και εμπλέκεται με την PARP δημιουργώντας ταυτόχρονα νανομηχανές επιδιόρθωσης που αποτελούνται από πρωτεΐνες, όπως XRCC1, στις περιοχές των σημειακών θραύσεων του DNA.

Επίσης, προτείνουμε ότι οι σημειακές θραύσεις του νουκλεοπλασματικού και πυρηνικού DNA (rDNA) αποτελούν ένα νέο βήμα σε αυτό το οποίο ονομάζουμε συνήθως ως πυρηνική απόπτωση και ίσως αυτός να είναι ο λόγος της μετακίνησης της Hsp70 στους πυρήνες των πυρηνίσκους κατά τη διάρκεια αποπτωτικού θερμικού σοκ. Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν μία άγνωστη μέχρι σήμερα κυτταρική απόκριση στο θερμικό σοκ και μπορούν να αποκαλύψουν νέα μονοπάτια που οδηγούν στη λειτουργία της Hsp70 στο επίπεδο του πυρήνα και πυρηνίσκου και τη ρύθμιση της πυρηνικής αποπτωτικής σηματοδότησης.





## ABSTRACT

It is known that the proteins Hsp 70 and Hsp 40 collaborate each other, after they practise many from their operations via creation nanomachines. In the present work manufacturing, with the technology siRNA, HeLa siRNA clones, that did not express the proteins Hsp 70 or Hsp 40, was checked the increased thermosensitivity and apoptosis that present these clones after heat shock but also under effect of various chemical factors, because of their lack of these proteins. Also, it was revealed that the absence of one protein influences the regulation of the other's, as reverse. We indeed found that this likely common mechanism of regulation of their expression, seems to happen in the level of transcription or the maturation of RNA.

For many years we didn't know what the target for Hsp70 translocation to the nucleus and nucleolus is. Lately, it has been proposed that Hsp70 translocates to nucleoli, upon a heat shock, together with the denatured substrates in order to renature them during recovery at physiological conditions.

Here, we propose that Hsp70 translocates to the nucleus and nucleoli in order to participate in pathways concerning the protection of the nucleoplasmic DNA or rDNA from the single strand breaks. The Hsp70 absence in HeLa cells, via Hsp70 gene silencing (knockdown), indicated the essential role of Hsp70 in DNA integrity. Therefore, HeLa Hsp70 depleted cells were very sensitive in heat treatment and their DNA breaks were multiple comparing to that of control HeLa cells. The molecular mechanism via the Hsp70 performs its role at the level of nucleus and nucleolus during the stress was examined. Hsp70 co-localizes with PARP1 in the nucleus/nucleoli and it is observed in confocal studies and binds via its ATPase domain to the BCRT domain of PARP1 as it is revealed with protein-protein interaction assays. Afterwards, we found that Hsp70 also binds simultaneously to XRCC1 and PARP-1 indicating that Hsp70 function takes carry at the level of DNA repair and maybe at the base excision repair system. Making a hypothetical model, we can suggest that Hsp70 is the molecule that binds and deals with PARP1 creating simultaneously the repair proteins, such as XRCC1, at the single strand DNA breaks.

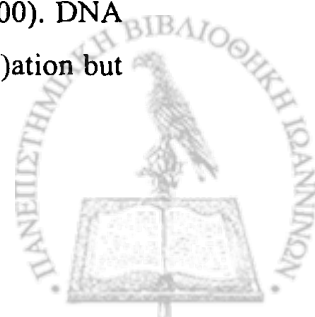
Also, we propose that nucleoplasmic DNA and rDNA single strand breaks constitute a new step in that we usually name as nuclear apoptosis and this is the reason for hsp70 nucleoli translocation during apoptotic heat treatment. Our data reveal a previously unrecognized cellular response to heat stress and may reveal novel pathways leading to Hsp70 function in the nucleus/nucleoli and regulation of nuclear apoptotic signalling.



# 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



- Agashe V.R. and Hartl F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Vol 11: 15-25.
- Althaus F.R. and C. Richter, (1987). ADP-ribosylation of proteins: enzymology and biological significance. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 37: 1-237.
- Alvarez-Gonzalez, R., Althaus, F.R., (1989). Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. *Mutat. Res.* 218, 67-74.
- Arame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., de Murcia, J.M., de Murcia, G., (1999). PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 274, 17860-17868.
- Armin, V., Cumming, D.V. and Latchman, D.S. (1996) Overexpression of heat shock protein 70 protects neuronal cells against both thermal and ischaemic stress but with different efficiencies. *Neurosci. Lett.* 206, 45-48.
- Bankar, J. and Sistonen, L. (2007). Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 78-88.
- Bjornsen J.S., Lam W.Y., Leung A.K.L., Ong S-E., Lyon C.E., Lamond A.I., Mann M., (2005), Nucleolar proteome dynamics, *433: 77-83.*
- Crispin JR, 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-30
- Dimitriadis C.E., Nova C., Lazaridis I., Kontoyiannis D., Kollias G., Pagoulatos, G.N. (1996). Overexpression of HSP70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics* 2, 111-117.
- Dimitriadis C.E., Lazaridis I., Pagoulatos GN. (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.
- Dimitriadis C.E., Lazaridis I., Pagoulatos G.N. (1991). Constitutive expression of hsp70 in mammalian cells confer thermoresistance. *Eur. J. Biochem.*, 199: 35-39.
- Dobacki B., Liberek K., Wall D. et al (1996). Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 271: 14840-14848.
- Drees R. (2006). Heat shock protein 70 enhanced deoxyribonucleic acid base excision repair in human leukemic cells after ionizing radiation, *Cell Stress Chaperones.* 11: 240-9.
- Ellmann, K., Jaattela, M., Wissing, D., Burkart, V. and Kolb, H. (1996) Heat shock protein Hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 391, 185-188.
- Faroudj N, Triniolles F, Ladjimi MM. (1996). Effect of nucleotides, peptides and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone hsc70. *J. Biol. Chem.* 271: 18471-18476.
- Flecke, R., Geisen, C., Zevnik, B., Bauch, T., Muller, W.U., Kupper, J.H., Moroy, T., (2000). DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to poly(ADP-ribose)ylation but have different requirements for p53. *Mol. Cell Biol.* 20, 6695-6703.



- Ben-Zvi A.P. and Goloubinoff P., (2001), Mechanisms of Disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *Journal of Structural Biology* 135: 84–93.
- Berger, N.A. (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.* 101, 4–15.
- Bhattacharyya T., Karnezis A.N., Murphy S.P., Hoang T., Freeman B.C., Phillips B., Morimoto R.I. (1995) Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J. Biol. Chem.* 270: 1705–1710.
- Bivik C., Rosdahl I., Ollinger K. (2006). Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis* 28: 537–544.
- Bonnycastle L.L., Yu C.E., Hunt C.R., Trask B.J., Clancy K.P., Weber J.L., Patterson, D., Schellenberg, G.D. (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.
- Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J. and Le Parco, Y. (1998). Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol. Biol. Evol.* 15: 647–655.
- Bozidis P, Lazaridis I, Pagoulatos G, Angelidis C. (2002). Mydj2 as a potent partner of hsc70 in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 269: 1553-1560.
- Bruskov VI., Malakhova LV., Masalimov ZK., Chernikov AV. (2002). Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA, *Nucleic Acid Research.* 30: 1354-1363.
- Buchberger A., Schroder H., Hestekamp T., Schonfeld H.J., Bukau B. (1996). Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.* 261: 328-333
- Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443–451.
- Bürkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *Bioessays* 23, 795–806.
- Buzzard, K.A., Giaccia, A.J., Killender, M., Anderson, R.L. (1998). Heat shock protein 72 modulates pathways of stress induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 17147–17153.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 131: 1–87
- Caldecott KW. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair, *DNA repair* 2: 955-969.



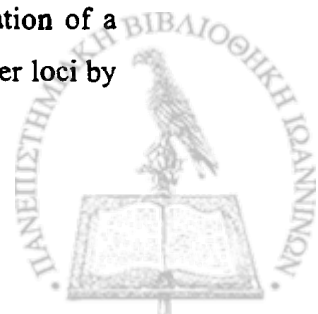
- Caldecott KW., Aoufouchi S., Johnson P., Shall S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular "nick sensor" in vitro, *Nucl. Acids Res.* 24: 4387-4394.
- Calini V., Urani C., Camatini M. (2003) Overexpression of Hsp70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage, *Toxicology in vitro* 17: 561-566.
- Caplan A.J., Cyr D.M. and Douglas M.G. (1993). Eukaryotic Homologues of Escherichia coli DnaJ: A Diverse Protein Family That Functions with HSP70 Stress Proteins. *Mol. Biol. Cell* 4: 555-563.
- Chappell, T.G., Konforti, B.B., Schmid, S.L. & Rothman, J.E. (1987). The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J. Biol. Chem.* 262: 746-751.
- Cheetham M. and Caplan A. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* 3: 28-36.
- Cherney, B.W., McBride, O.W., Chen, D.F., Alkhatib, H., Bhatia, K., Hensley, P., Smulson, M.E. (1987). cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8370-8374.
- Choi, N.W., Lodish, H.F. (2000). Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 38437-38444.
- Chong K.Y., Lai C.C., Lille S., Chang C., Su, C.Y. (1998). Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30: 599-608.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, *Mutat Res.* 336: 69-77.
- Coute Y., Burgess, J.A., Diaz J-J, Chichester C., Lisacek F, Greco A., Sanchez J-C. (2005). Deciphering the human nucleolar proteome, *Mass Spectrometry Reviews* 25: 215-234.
- Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kosic-Smithers, J., Nicolet, C.M. (1989). SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3000-3008.
- Cyr DM, Langer T, Douglas MG. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of hsp70. *Trends Biochem. Sci.* 19: 176-181.
- Fatzer, F., de La Rubia, G., De Murcia, J.M., Hostomsky, Z., de Murcia, G., Schreiber, V., (2000). Base-excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39, 7559-7569.
- Fatzer, F., Schreiber, V., Niedergang, C., Trucco, C., Flatter, E., De La Rubia, G., Oliver, J., Rolli, V., deMurcia, J.M., de Murcia, G., (1999). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base-excision repair. *Biochimie* 81, 69-75.



- Daugaard M., Kirkegaard-Sorensen T., Ostensfeld M.S., Aaboe M., Hoyer-Hansen M., Orntoft, T.F., Rohde M., Jaattela M. (2007). Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer Res.* 67: 2559–2567
- De Murcia G., Menissier-de Murcia J., (1994). Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.* 19: 172-176.
- De Murcia G., Shall S., (2000). Poly(ADP-ribosylation) reactions: from DNA damage and stress signalling to cell death. Oxford University Press, Oxford.
- De Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P., de Murcia G., (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7303–7307.
- Deocaris, C.C., Kaul, S.C., Wadhwa, R. (2006). On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperon.* 11: 116–128.
- Dix D.J., Allen J.W., Collins B.W., Poorman-Allen P., Mori C., Blizard D.R., Brown P.R., Goulding E.H., Strong B.D., Eddy E.M. (1997) HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124: 4595–4603.
- Dix D.J., Allen J.W., Collins B.W., Mori C., Nakamura N., Poorman-Allen P., Goulding E.H., Eddy E.M. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3264–3268.
- Domanico S.Z., DeNagel D.C., Dahlseid J.N., Green J.M., Pierce, S.K. (1993) Cloning of the gene encoding peptide binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3598–3610.
- Doulias P.T., Kotoglou P., Tenopoulou M., Keramisanou D., Tzavaras T., Brunk U., Galaris D., Angelidis C. (2007) Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 567–577.
- Doulias P.T., Christoforidis S, Brunk UT, Galaris D. (2003). Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic Biol Med.* 35: 719-28.
- Dressel R, Johnson JP, Gunther E., (1998), Heterogeneous 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 Res.* 8: 482-92.
- Dworniczak B. and Mirault, M.E. (1987) Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res.* 15: 5181–5197.



- Liasson M.J., Sampei, K., Mandir, A.S., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.Q., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Dawson, V.L., (1997). Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* 3, 1089–1095.
- Ellis R.J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328: 378-379.
- Ellis R.J. (2000). Molecular chaperones ten years. *Introduction Seminars in cell & developmental biology*, Vol 11(No1): 1-5.
- Ellis R.J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.26 (No10): 597-604
- Ellis R.J. (2006). Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 (No7): 395-401.
- Ellis R.J. and Hartl F.U. (1996) Protein folding in the cell: competing model of chaperonin function. *The FASEB Journal*, Vol. 10: 20-26.
- Ellis R.J. and Hartl U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:102-110.
- Ellis R.J. (2004). Properties of aggregates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15: 1–2.
- Link L.A. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological reviews* 79 (No2), 425-449.
- Linker, T. and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247.
- Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C., McKay D.B. (1990). Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. *Nature* 346: 623–628.
- Brin L., Becker K.A., Sapp C., Lambert C., Sirma H. Muller M., Streeck R.E., Sapp M. (2004). Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J. Virol.* 78: 5546–5553.
- Ern G.C., Pohl J., Flocco M.T., Rothman J.E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353: 726-730.
- Bedman R.B., Hirst T.R., Tuite M.F. (1994). Protein disulfide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 19: 331-336.
- Galvano F., Russo A, Cardile V., Galvano G., Vanella A., Renis M., (2002) DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin (1) *Food Chem. Toxicol.* 40: 25-31.
- Org Rde, C. and Gomes, S.L. (2007) Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Gene* 386: 24–34.
- Ching M.J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 465–472
- Cate A.M., Cooper D.N., Hall C., Leung T.K., Solomon E. and Lim L. (1987) Localization of a human heat-shock HSP 70 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.
- Goffin L. and Georgopoulos C. (1998). Genetic and biochemical characterization of mutations affecting the carboxy-terminal domain of the *Escherichia coli* molecular chaperone DnaJ. *Molecular Microbiology* 30: 329-340.
- Goloubinoff P., Mogk A., Zvi P.A., Tomoyasu T. & Bukau B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13732-13737.
- Govin J. , Caron C., Escoffier E, Ferro M., Kuhn L., Rousseaux S., Eddy E. M., Garin J. and Khochbin S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 281: 37888–37892.
- Greene J.M., Larin, Z., Taylor, I.C., Prentice, H., Gwinn, K.A. and Kingston, R.E. (1987) Multiple basal elements of a human hsp70 promoter function differently in human and rodent cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3646–3655.
- Gupta R.S. and Singh, B. (1994) Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr. Biol.* 4: 1104–1114.
- Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C., Parcellier A., Hammann A., Daugas E., Kouranti I., Spahr C., Pance A., Kroemer G., Garrido C. (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22: 6669-6678.
- Gwack Y., Nakamura H, Lee S.H., Souvlis J, Yustein J.T, Gygi S, Kung H.J, Jung J.U. (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.
- Gyrd-Hansen M., Nylandsted, J. and Jaattela, M. (2004) Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 3: 1484–1485.
- Ha H.C., Snyder S.H., (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13978–13982.
- Hampton C.R., Shimamoto, A., Rothnie, C.L., Griscavage- Ennis, J., Chong, A., Dix, D.J., Verrier E.D. and Pohlman, T.H. (2003) HSP70.1 and -70.3 are required for late-phase protection induced by ischemic preconditioning of mouse hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H866–H874.
- 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
- Hartl F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–579.
- Hartl F.U. and Hayer-Hartl M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytocol: From Nascent Chain to Folded Protein. *Science.*295: 1852-1858

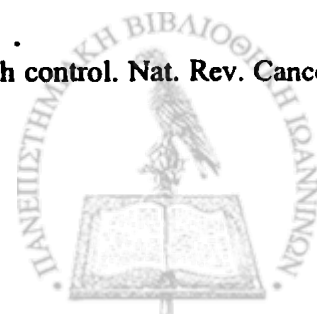




- Heller B., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., Radons, J., Bürkle, A., Fehsel, K., Burkart, V., Kolb, H., (1995). Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J. Biol. Chem.* 270, 11176–11180.
- Hendershot L.M., Valentine, V.A., Lee, A.S., Morris, S.W. and Shapiro, D.N. (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 AS, Warburton D, Atwood KC. (1972) Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 3394-8.
- Hennessey F., Cheetham M.E., Dirr H.W. & Blatch G.L. (2000). Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress & Chaperones* 5: 347-358.
- Hightower L.E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-7.
- Hohfeld J., Cyr D. M., and Patterson C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO reports* 2: 885-890.
- Huang H.-C., Sherman My, Kandror O., Goldberg A.L. (2001). The molecular Chaperone DnaJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 3920-26.
- Huang K., Flanagan J.M. and Prestegard J.H. (1999). The influence of C-terminal extension on the structure of the “J domain” in *E.coli* DnaJ. *Protein Sci.* 8: 203-214.
- Huang L., Mivechi N.F., Moskophidis D. (2001) Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol. Cell. Biol.* 21: 8575–8591.
- Hubbard T.J. & Sander C. (1991). The role of heat shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng* 4: 711-717.
- 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.
- Hunt C.R., Dix D.J., Sharma G.G., Pandita R.K., Gupta A., Funk M., Pandita, T.K. (2004). Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70.1 and Hsp70.3-deficient mice *Mol. Cell Biol.* 24: 899-911.
- Hut H.M., Kampinga H.H., Sibon O.C. (2005). Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol. Biol. Cell* 16: 3776–3785.
- Hytton T., Bates P.A., Zhang X., Sternberg M.J.E., Freemont P.S. (2000). The BRCA1 C-terminal domain: structure and function, *460*: 319-332.



- Hwang J.H. Ryu J.K., Yoon Y.B., Lee K.H., Park Y.S., Kim J.W., Lee D.H., Jeong J.B., Seo J.S., Kim Y.T., (2005). Spontaneous activation of pancreas trypsinogen in heat shock protein 70.1 knock-out mice. *Pancreas* 31: 332–336.
- Jaattela M. (1999) Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 31: 261–271.
- Jaattela M. and Wissing, D. (1993). Heat shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of selfprotection. *J. Exp. Med.* 177: 231–236.
- Jaattela M., Wissing D., Bauer P.A., Li G.C. (1992) Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 11: 3507–3512
- Jagtap P. and Szabo C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:421.
- Jan H. J. Hoeijmakers (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* 411: 366-374.
- Johansson, M., (1999). A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics* 57, 442–445.
- Johnson J.L. and Graig E.A. (2001). An Essential Role for the Substrate-binding Region of Hsp40 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152: 851-856
- Kaminker, P.G., Kim, S.H., Taylor, R.D., Zebarjadian, Y., Funk, W.D., Morin, G.B., Yaswen, P., Campisi, J., (2001). TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J. Biol. Chem.* 276, 35891–35899.
- Karlseder J., Wissing D., Holzer G., Orel L., Sliutz G., Auer H., Jaattela M., Simon, M.M. (1996) Hsp70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin induced G2 cell cycle arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 153–159.
- Karzai A.W. and McMacken R. (1996). A bipartite signalling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *J. Biol. Chem.* 271: 11236-11246.
- Kaufmann S.H., S. Desnoyers Y. Ottaviano N.E. Davidson, G.G. Poirier (1993), Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53: 3976–3985.
- Khandjian E.W. and Turler H. (1983). Simian virus 40 and polyomavirus induce synthesis of heat shock proteins in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 3: 1-8.
- Kickhoefer V.A., Siva A.C., Kedersha N.L., Inman E.M., Ruland C., Streuli M., Rome L.H., (1999) The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Cell Biol.* 146: 917–928.
- Koonin E.V., Altschul S.F., Bork P., (1996) BRCA1 protein products functional motifs, *Nature Genet.* 13: 266-267.
- Kroemer G. and Jaattela M. (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* 5: 886–897.



Kupper, J.H., de Murcia, G., Bürkle, A., (1990). Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation by overexpressing the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 265, 18721–18724.

Kupper, J.H., Muller, M., Jacobson, M.K., Tatsumi-Miyajima, J., Coyle, D.L., Jacobson, E.L., Bürkle, A., (1995). Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and *N*-methyl-*N*-(nitro-*N*-nitrosoguanidine) but does not limit DNA replication of a polyomavirus replication. *Mol. Cell Biol.* 15, 3154–3163.

Chung H.J., Jun C.D., Pae H.O., Yoo J.C., Park Y.C., Choi B.M., Na Y.G., Park R.K., Chung H.T., Chung H.Y., Park W.Y., Seo J.S. (1998) The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell. Immunol.* 187: 1–12.

Chung S.B., Young C., Kim D.S., Choi H.O., Kim K.H., Chung J.H., Eun H.C., Park K.C., Oh C.K., Seo I.S. (2002). Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 28: 144–151.

Landry S.J., Jordan R., McMacken R., Gierasch L.M. (1992). Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature* 355: 455-457.

Long T., Lu C., Echols H., Flanagan J., Hayer M.K., Hartl F.U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356: 683-689.

McKey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420.

Orlowski Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C., (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346–347.

Lee S.H., Kim M., Yoon B.W., Kim Y.J., Ma S.J., Roh J.K., Lee J.S., Seo, J.S. (2001). Targeted hsp70.1 disruption increases infarction volume after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 32: 2905–2912.

Leist M. and Jaattela M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 589–598.

Long T.K., Hall C., Rajendran M., Spurr N.K., Lim L. (1992). The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics* 12: 74–79.

Long T.K., Rajendran M.Y., Monfries C., Hall C., Lim L. (1990). The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem. J.* 267: 125–132.

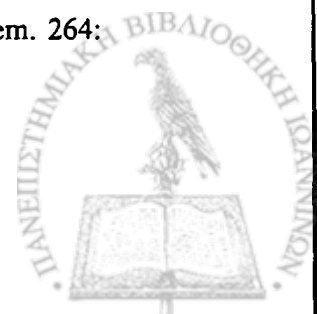
Lee G.C., Li L., Liu R.Y., Rehman M., Lee, W.M.F. (1992). Protection from thermal stress by human hsp70 with or without its ATP-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2036–2040.



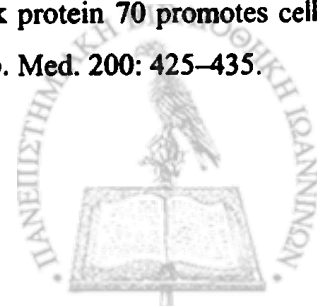
- Li G.C., Li L., Liu Y.-K., Mak J.Y., Chen L., Lee, W.M.F. (1991). Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1681–1685.
- Liberek K., Marszalek J., Ang D., Georgopoulos C. and Zylicz M. (1991). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 2874-2878.
- Lindahl T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715
- Lindquist S. and Craig E.A. (1998). The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- Linke K., Wolfram T., Bussemer J. and Jakob U. (2003). The Roles of the Two Zinc Binding Sites in DnaJ. *J. Biol. Chem.* 278: 44457-44466
- Lu Z. and Cyr D.M. (1998a). Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the Hsp40 cochaperones Sis1 and Ydj1. *J. Biol. Chem.* 273: 27824-27830.
- Lu Z. and Cyr D.M. (1998b). The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 5970-5978
- Luo S., Mao C., Lee B. and Lee A.S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5688–5697.
- Lyons R.J., Deane R., Lynch D.K., Ye Z.S., Sanderson G.M., Eyre H.J., Sutherland G.R., Daly R.J., (2001). Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J. Biol. Chem.* 276, 17172–17180.
- Ma Q., Baldwin K.T., Renzelli A.J., McDaniel A., Dong L., (2001). TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 499–506.
- Makatsori D., Kourmouli N., Polioudaki H., Shultz L.D., McLean K., Theodoropoulos P.A., Singh P.B., Georgatos S.D.J (2004). The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* 279: 25567-73.
- Mambula S.S. and Calderwood S.K. (2006). Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J. Immunol.* 177: 7849–7857.
- Mani R.S., Karimi-Busheri F., Fanta M., Caldecott KW., Cass CE., Weinfeld M. (2004). Biophysical characterization of human XRCC1 and its binding to damaged and undamaged DNA. *Biochemistry* 43: 16505-16514.
- Marber M.S., Mestrlil R., Chi S.H., Sayen M.R., Yellon D.M., Dillmann W.H. (1995). Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* 95: 1446–1456.



- Marintchev M.A., Mullen M.A., Maciejewski M.W., Pan B., Gryc M.R., Mullen G.P. (1999). Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1-N terminal domain. *Nat. Struct. Biol.* 6: 884-893.
- Martinez-Yamout M., Legge G.B., Zhang O., Wright P.E. and Dyson H.J. (2000). Solution Structure of the Cysteine-rich Domain of the Escherichia coli Chaperone Protein DnaJ. *J. Mol. Biol.* 300: 805-818
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-deMurcia J., DeMurcia G., (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3562-3571.
- Masutani M., T. Nozaki, E. Nishiyama, T. Shimokawa, Y. Tachi, H. Suzuki, H. Nakagama, K. Wakabayashi and T. Sugimura. (1999). Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 193: 149-152.
- Matsui H., Asou H., Inaba T. (2007). Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol. Cell* 25: 99-112.
- Mayer M. P. and Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 670-84
- Mendez F., Kozin E., Bases R. (2003) Heat shock protein 70 stimulation of the deoxyribonucleic acid base excision repair enzyme polymerase beta. *Cell stress & chaperones* 8: 153-61.
- Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. (1993). Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *J. Biol. Chem.* 268, 22575-22580.
- Mestril R., Chi S.H., Sayen M.R., O'Reilly K., Dillmann, W.H. (1994). Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia induced injury. *J. Clin. Invest.* 93: 759-767.
- Mlarski K.L. and Morimoto R.I. (1986). Expression of human HSP70 during synthetic phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9517-9521.
- Mlarski K.L. and Morimoto, R.I. (1989). Mutational analysis of the human hsp70 protein: Distinct domains for nucleolar localization and ATP-binding. *J. Cell Biol.* 109, 1947-1962.
- Mlner C.M. and Campbell R.D. (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 32: 242-251
- Mnami Y., Hohfeld J., Ohtsuka K., Hartl F-U. (1996). Regulation of the heat shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, hsp40. *J. Biol. Chem.* 271: 19617-19624.
- Mzzen L.A., Chang C., Garrels J.I., Welch W.J. (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. *J. Biol. Chem.* 264: 20664-20675



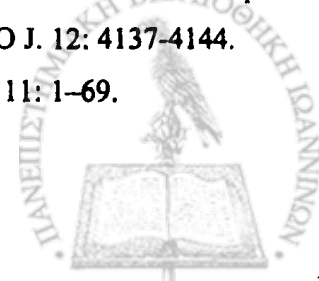
- Molinete M., Vermeulen W., Bürkle A., Ménissier-de Murcia J., Küpper J.H., Hoeijmakers J.H., de Murcia G. (1993). Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells. *EMBO J.* 12: 2109–2117.
- Morimoto R.I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410
- Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. (1990). In: *Stress Proteins in Biology and Medicine*, ed Morimoto RI, Tissiere A, Georgopoulos C. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, pp: 1-36.
- Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Meriin A.B., Sherman M.Y., Morimoto R.I. Massie B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7146–7159.
- Mosser D.D., Morimoto R.I., (2004), Molecular chaperones and the stress of oncogenesis, *Oncogene* 23: 2907-2918.
- Munro S. and Pelham H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899–907.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (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.
- Muramatsu M, Onishi T. (1978) Isolation and purification of nucleoli and nucleolar chromatin from mammalian cells, *Methods Cell Biol.* 17: 141-61.
- Nash R.A., Caldecott K.W., Barnes D.E., Lindahl T. (1997). XRCC1 protein interacts with one of the two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36: 5207-11.
- Nazarkina Z.K., Khodyreva S.N., Marsin S., Lavrik O.I., Radicella J.P. (2007). XRCC1 interactions with base excision repair DNA intermediates 6: 254-264.
- Niu P., Liu L., Gong Z., Tan H., Wang F., Yuan J., Feng Y., Wei Q., Tangway R.M., Wu T. (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., Brunsting J.F., Roelofsen H., Weber L.A., Kampinga H.H. (1999). In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2069–2079.
- Nollen E.A., Salomons F.A., Brunsting J.F., Want J.J., Sibon O.C., Kampinga H.H. (2001). Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 12038-43.
- Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jaattela M. (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., Bastholm L., Elling F., Jaattela M. (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.
- Nylandsted J., Wick W., Hirt U.A., Brand K., Rohde M., Leist M., Weller M., Jaattela M. (2002). Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by hsp70 depletion. *Cancer Res.* 62: 7139-7142.
- Duchs R.L. (1998) Methods used to study structure and function of the nucleolus, *Methods Cell Biol.* 53: 303-21
- Palleros D.R., Reid K.L., Shi L., Welch W.J., Fink A.L. (1993). ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K<sup>+</sup> but not ATP hydrolysis. *Nature* 365: 664-666
- Parisian A.J., Sheren J.E., Tao T.Y., Goswami P.C., Malyapa R., Van Rheeden R., Watson M.S., Hunt, C.R. (2000). The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. *Biochim. Biophys. Acta* 1494: 201-205.
- Welham H.R.B. (1984) Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3: 3095-3100.
- Wellechia M., Szyperski T., Wall D., Georgopoulos C. and Wuthrich K. (1996). NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J. Mol. Biol.* 260: 236-250
- Yumier J.C., Krueger A.M., Currie R.W., Kontoyiannis D., Kollias G., Pagoulatos, G.N. (1997). Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperon.* 2: 162-167.
- Yumier J.C., Ross B.M., Currie R.W., Angelidis C.E., Kazlaris H., Kollias G. Pagoulatos G.N. (1995) Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J. Clin. Invest.* 95: 1854-1860.
- Altronieri P., Yokota T. Koyama Y. Hanai S. Uchida K., Miwa M. (1997). PARP cleavage in the apoptotic pathway in S2 cells from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Cell Biol.* 75: 445-449.
- Chan Y.Q., Patel D., Hartl F.U. and McColl D.J. (1996). Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J. Mol. Biol.* 260: 224-235.
- Edford N.B., Fina M., Benjamin J.J., Moreadith R.W., Graves K.H., Zhao P., Garra S., Wiethoff A., Sherry A.D., Malloy C.R., Williams R.S. (1996). Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2339-2342.
- Evagnan L.; Gurbuxani S.; Susin S.A.; Maise C.; Daugas E.; Zamzami N.; Mak T.; Jaattela M.; Penninger J.M.; Garrido C.; Kroemer G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell. Biol.* 3: 839-843.
- Lee P.A., (1999). Holding damaged DNA together. *Nat. Struct. Biol.* 6: 805-806.



- Ritossa F. (1962) *Experientia* 18: 571-573.
- Rodriguez M., Yu X., Chen J., Songyang Z. (2003). Phosphopeptide Binding Specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) Domains, *J. Biol. Chem.* 278: 52914-52918.
- Rohde M., Daugaard M., Jensen M.H., Helin K., Nylandsted J., Jaattela M. (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev.* 19: 570-582.
- Rose G.D., Fleming P.J., Banavar J.R., Maritan A., (2006), A backbone-based theory of protein folding. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, Nov.7; 103(45):16623-33. Epub. 2006 Oct.
- Rubbi C.P., Milner J., (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses, *EMBO J.* 22: 6068-6077.
- Rudiger S., Schneider-Mergener J and Bukau B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* 20: 1042-1050.
- Sainis I., Angelidis C., Pagoulatos G.N., Lazaridis I. (2000). Hsc70 interactions with SV40 viral proteins differ between permissive and nonpermissive mammalian cells *Cell Stress and Chaperones* 5: 132-138.
- Salma A., Tsiapos A, Lazaridis I, (2007), The viral SV40 T antigen cooperates with dj2 to enhance hsc70 chaperone function. *Salma A, FEBS J.*, 274: 5021-7.
- Samali A., Cotter TG. (1996). Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res.* 223: 163-70.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. M. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schlenstedt G., Harris S., Risse B., Lill R., Silver P.A. (1995). A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with Bip/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J. Cell Biol.* 129: 979-988.
- Schmid F.X., Mayr L.M., Mucke M., Schonbrunner E.R. (1993). Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv. Protein Chem.* 44: 25-66.
- Schreiber V., Ame J.C., Dolle P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., De Murcia J.M., De Murcia G., (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base-excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.* 277, 23028-23036.
- Schreiber V., Hunting D., Trucco C., Gowans B., Grunwald D., De Murcia G., De Murcia J.M., (1995). A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4753-4757.
- Schroder H., Langer T., Hartl F.U., Bukau B. (1993). DanK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 12: 4137-4144.
- Shall S. (1984). A new component of DNA excision repair. *Adv. Rad. Biol.* 11: 1-69.

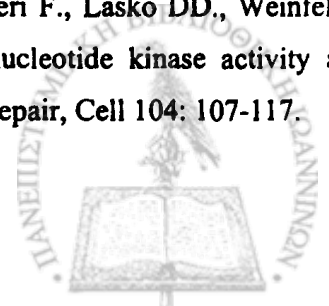




- Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L., (1998). Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.* 273, 30069–30072.
- Shim E.H., Kim J.I., Bang E.S., Heo J.S., Lee J.S., Kim E.Y., Lee J.E., Park W.Y., Kim H.S., Smithies O., Jang J.J., Jin D.I., Seo J.S. (2002). Targeted disruption of hsp70.1 sensitizes to osmotic stress. *EMBO Rep.* 3: 857–861.
- Silver P.A. and Way J.C. (1993). Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell* 74: 5-6.
- Simon M.M., Krone C., Schwarz A., Luger T.A., Jaattela M. and Schwarz T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J. Clin. Invest.* 95: 926–933.
- Singleton K.D. and Wischmeyer P.E. (2006). Effects of HSP70.1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290: L956–L961.
- Smith S., Giriat I., Schmitt A., De Lange T., (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484–1487.
- Ton W.Y., Han C.T., Hwang S.H., Lee J.H., Kim S., Kim, Y.C. (2000). Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 73: 1138–1144.
- Tankiewicz AR., Lachapelle G., Foo C.P., Radicioni S.M., Mosser D.D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation, *J. Biol. Chem.* 280: 38729-38739.
- Li A.I., Wiltshire T., Batalov S., Lapp H., Ching K.A., Block D., Zhang I., Soden R., Hayakawa G., Kreiman G., Cooke M.P., Walker J.R., Hogenesch J.B. (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6062–6067.
- Tagiki H, Hozumi Y., Maeshima H., Katagata Y., Mitsuhashi Y., Kondo S. (2000). C2-ceramide induces apoptosis in human squamous cell carcinoma cell line, *Br. J. Dermatol.*, 143: 1154-1163.
- Tzabo A., Korszun R., Hartl F.U. and Flanagan J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* 15: 408-417.
- Tzabo A., Langer T., Schroder H., Flanagan J., Bukau B. & Hartl F.U. (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.
- Tzabo C., and Dawson V.L., (1998). Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 287–298.



- Taira T., Narita T., Iguchi-Arigo S.M., Arigo H. (1997). A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. *Nucleic Acids Res.* 25: 1975–1983.
- Tavaria M., Gabriele T., Kola I., Anderson R.L. (1996). A hitchhiker's guide to human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperon.* 1: 23–28.
- Tewari M., L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen, Dixit V.M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801–809.
- Trucco C., V. Rolli, F.J. Oliver, E. Flatter, M. Masson, F. Dantzer, C. Niedergang, B. Dutrillaux, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia. (1999). A dual approach in the study of poly (ADP-ribose) polymerase: in vitro random mutagenesis and generation of deficient mice. *Mol. Cell. Biochem.* 193: 53–60.
- Tsai J. and Douglas M.G. (1996). A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271: 9347-9354.
- Tsutsumi M., Masutani M., Nozaki T., Kusuoka O., Tsujiuchi T., Nakagama H., Suzuki H., Konishi Y., Sugimura T., (2001). Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* 22, 1–3.
- Van Molle W., Wielockx B., Mahieu T., Takada M., Taniguchi T., Sekikawa K., Libert, C. (2001). HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 16, 685–695.
- Wall D., Zylicz M., Georgopoulos C. (1995). The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. *J. Biol. Chem.* 270: 2139-2144.
- Wang Z.Q, L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff, Wagner E.F.. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 11: 2347–2358.
- Welch W.J, Feramisco JR. (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259: 4501-13.
- Werner-Washburne M., Craig E.A. (1989). Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 multigene family. *Genome* 31: 684–689.
- Werner-Washburne M., Stone D.E., Craig E.A. (1987). Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2568–2577.
- Whitehouse CJ., Taylor RM., Thistiethwaite, A., Zhang H., Karini-Busheri F., Lasko DD., Weinfeld M., Caldecott, KW., (2001), XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA-single strand break repair, *Cell* 104: 107-117.



- Williams R.S., Thomas J.A., Fina M., German Z., Benjamin, I.J. (1993). Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J. Clin. Invest.* 92, 503–508.
- Wissing D., Jaattela M. (1996) HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int. J. Hypertherm.* 12: 125–138.
- Wu B., Hunt C., Morimoto R. (1985). Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol. Cell. Biol.* 5: 330–341.
- Yan W. and Graig E. (1999). The Glycine-Phenylalanine –Rich Determines the Specificity of the Year Hsp40 Sis 1. *Mol. Cell Biol.* 19: 7751-7758.
- Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L., (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259–263.
- Zahn R., Spitzfaden C., Ottiger M., Wuthrich K., Pluckthun A. (1994). Destabilization of the complete protein secondary structure on binding to the chaperone GroEL. *Nature* 368: 261-265.
- Zhang X., Morena S., Bates P.A., Whitehead C., Coffe A.I., Hainbucher K., Nash R., Sternbera J.E., Lindahk T., Freemont P.S. (1998). Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module, *EMBO J* 17: 6404-6411.

