



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΠΜΣ «Ιατρική Χημεία»



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της επίδρασης του μονοπατιού Hog1 στην έκφραση
γονιδίων που ρυθμίζουν την έξοδο του μύκητα *Saccharomyces*
cerevisiae από την στατική φάση ανάπτυξης



ΣΟΥΡΑΗ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΑΜ: 147

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

“Every living thing is made of cells, and everything a living thing does is done by the cells that make it up”

L.L. Larison Cudmore, In *The Center of Life: A Natural History of the Cell* (1977, 1978), 6.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο «Ιατρική Χημεία». Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων. Την επίβλεψη της εργασίας είχε ο Αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και τα εποικοδομητικά σχόλια που μου παρείχε.

Εν συνεχεία, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα Κυριακή Παπαγεωργίου για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, την ενθάρρυνση και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής.

Ευχαριστώ ακόμη τον κύριο Θυφρονίτη Γεώργιο, Καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, την κυρία Καραγιάννη Ήρα Λέκτορα του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, τον κύριο Καταπόδη Πέτρο, Επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, τον κύριο Κυπαρίσση Άρη, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και τον κύριο Σταμάτη Χαράλαμπο, Καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών για την βοήθεια και την παραχώρηση των εργαστηριακών χώρων και εργαστηριακού εξοπλισμού ώστε να διεξαχθούν τα πειράματα ανάπτυξης των κυττάρων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Αλεξανδράκη Δέσποινα, Αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιολογία Κρήτης και μέλος το IMMB της Κρήτης και τα μέλη του εργαστηρίου της για την παραχώρηση των μεταλλαγμένων στελεχών, την καθοδήγηση και την ανταλλαγή ιδεών και γνώσεων.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κύριο Θυφρονίτη Γεώργιο, κύριο Μιχαηλίδη Θεολόγο και κύριο Χατζηλουκά Ευστάθιο, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, για την άρτια συνεννόηση και την καθοδήγησή τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει η επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου του κυρίου Μιχαηλίδη, οι υποψήφιοι διδάκτορες Βασίλη Ευτυχία, Δαρσινού Μαρούσα, Ξαγαρά Αναστασία, Τσακανέλη Αλεξία και Τσίγκα Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια τους και την ανταλλαγή γνώσεων και ιδεών, καθώς και τους προπτυχιακούς φοιτητές Κανέλλο Φοίβο, Μαυραγάνη Ιωάννη και Παπασταύρου Βανέσα για την ενθάρρυνσή τους και την δημιουργία φιλικού περιβάλλοντος εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσιομίτα Σπυριδούλα από το εργαστήριο του κυρίου Θυφρονίτη, και τα μέλη του εργαστηρίου της κυρίας Καραγιάννη, του κυρίου Καταπόδη, του κυρίου Κυπαρίσση και του κυρίου Σταμάτη για την αποδοχή, την ευγένεια, την φιλική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, τους συγγενείς, τους φίλους και τους συμφοιτητές για την ενθάρρυνση και την στήριξη και που μου έδειξαν όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	9
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	14
ABSTRACT.....	16
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά ζυμομυκήτων και η επιλογή τους ως οργανισμός μοντέλο.....	17
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.1.2 Μορφολογία των κυττάρων του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	18
1.1.3 Το γονιδίωμα του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	19
1.2 Ο κυτταρικός κύκλος στον <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	19
1.2.1. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο των ζυμομυκήτων.....	21
1.3 Φάσεις ανάπτυξης από τις οποίες διέρχεται μια καλλιέργεια <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	25
1.4 Η οργάνωση του κυτταροσκελετού του <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	26
1.5 Η στατική φάση.....	28
1.5.1 Είσοδος στην στατική φάση.....	30
1.5.2 Έξοδος από την στατική φάση.....	32
1.6 Τα γονίδια που σχετίζονται με την φάση G0.....	33
1.7 Το μονοπάτι Hog1.....	40
1.7.1 Ο ρόλος που επιτελεί το Hog1 στην στατική φάση.....	43
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	45
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46

3.1	Επιλογή στελεχών.....	46
3.2	Θρεπτικά μέσα, αντιβιοτικά και αναστολείς.....	46
3.3	Καλλιέργεια κυττάρων με στόχο την είσοδό τους στην στατική φάση.....	47
3.4	Κλασμάτωση κυτταρικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο Percoll.....	47
3.5	Σήμανση του κυτταρικού τοιχώματος με την χρωστική concanavallin A..	48
3.6	Σήμανση του κυτταρικού σκελετού με την χρωστική phalloidin.....	49
3.7	Χρώση του πυρήνα με DAPI.....	49
3.8	Πειράματα συνδυαστικών χρώσεων	50
3.9	Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	50
3.10	Προσδιορισμός ποσότητας πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford.....	51
3.11	Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	51
3.11.1	Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης.....	51
3.11.2	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	55
3.11.3	Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών.....	56
3.12	Απομόνωση RNA.....	57
3.13	Καθαρισμός του απομονωμένου RNA από γενωμικό DNA.....	58
3.14	Δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	59
3.15	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR).....	59
3.15.1	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real- time PCR).....	62
4.	Αποτελέσματα.....	65
4.1	Επιλογή του πειραματικού υλικού.....	65
4.1.1	Φαινότυπος των μεταλλαγμένων στελεχών.....	65

4.2 Ενεργοποίηση και χαρακτηρισμός των στελεχών.....	66
4.3 Καλλιέργειας των κυττάρων με σκοπό την είσοδο στην στατική φάση ανάπτυξης.....	69
4.4 Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών οδηγεί στην αναστολή του μονοπατιού TOR.....	69
4.5 Τα κυτταρικά τοιχώματα του στελέχους BY4742 παχαίνουν κατά την είσοδο στην στατική φάση.....	71
4.6 Απομόνωση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0 από καλλιέργεια 7 ημερών.....	73
4.7 Η χρώση του κυτταρικού τοιχώματος μας επιτρέπει να κατανοήσουμε μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων της φάσης G0	75
4.8 Η ακτίνη οργανώνεται σε κηλίδες ακτίνης κατά την ανάκαμψη, με τρόπο εξαρτώμενο από TOR.....	75
4.9 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Rim15 στην είσοδο στη φάση G0.....	76
4.9.1 Τα <i>rim15Δ</i> κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος.....	77
4.9.2 Το κυτταρικό τοίχωμα των <i>rim15Δ</i> δεν αυξάνει το πάχος των κυτταρικών τοιχωμάτων στην στατική φάση.....	79
4.9.3 Τα <i>rim15Δ</i> κύτταρα λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους δεν διαχωρίζονται σωστά κατά την κλασμάτωση με <i>percoll</i>	81
4.9.4 Τα <i>rim15Δ</i> κύτταρα δεν οργανώνουν την ακτίνη σε σωματίδια κατά την είσοδο στη στατική φάση.....	82
4.10 Ο ρόλος του μονοπατιού HOG1 στην είσοδο και στη έξοδο από την στατική φάση.....	84
4.10.1 Τα μεταλλάγματα <i>hog1Δ</i> και <i>pbs2Δ</i> αυξάνουν το πάχος των κυτταρικών τους τοιχωμάτων κατά την είσοδο στην στατική φάση.....	89
4.10.2 Τα στελέχη <i>hog1Δ</i> και <i>pbs2Δ</i> καθυστερούν να μειώσουν το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος.....	90
4.10.3 Τα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος των στελεχών <i>hog1Δ</i> και <i>pbs2Δ</i> έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα.....	91

4.10.4 Η οργάνωση της ακτίνης σε σωματίδια εξαρτάται από το μονοπάτι Hog1.....	92
4.10.5 Η απουσία του Hog1 και του TOR δεν επιτρέπει στην ακτίνη να αναδιοργανώνεται σε σωματίδια ακτίνης.....	93
4.11 Η αναστολή του HOG1 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ψευδοϋφών.....	94
4.12 Η είσοδος στην στατική φάση έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων με διαφορετικό λειτουργικό ρόλο.....	95
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	102

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1: Φυλογενετικό δέντρο ταξινόμησης των μυκήτων.....

Εικόνα 1.2: Χαρακτηριστική δομή ενός κυττάρου ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Εικόνα 1.3: Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται μέσω των σημείων ελέγχου

Εικόνα 1.4: Ο κυτταρικός κύκλος στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Εικόνα 1.5: Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από την πρόσδεση της κινάσης Cdk1 (Cdc28) στις αντίστοιχες κυκλίνες της κάθε φάσης

Εικόνα 1.6: Η ρύθμιση της εισόδου στον κυτταρικό κύκλο στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Εικόνα 1.7: Ο ρόλος των κυκλινών για την έναρξη και πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Εικόνα 1.8: Τα στάδια ανάπτυξης μιας καλλιέργειας ζυμομύκητα

Εικόνα 1.9: Η κατανομή των κηλίδων και νηματίων ακτίνης κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Εικόνα 1.10: Η κατάσταση της ακτίνης του κυτταροσκελετού κατά την εκθετική φάση, την διαύξιμη μετατόπιση και την μετα-διαύξιμη φάση

Εικόνα 1.11: Η αλληλεπίδραση μεταξύ κυτταρικού κύκλου και «κύκλου αδράνειας»

Εικόνα 1.12: Για την είσοδο στην φάση G0 απαιτείται η αναστολή των μονοπατιών Ras/PKA και TOR

Εικόνα 1.13: Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην είσοδο στην φάση G0

Εικόνα 1.14: Το μονοπάτι TOR εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών διεργασιών

Εικόνα 1.15: Το μονοπάτι TOR στις ζύμες

Εικόνα 1.16: Το μονοπάτι PKA στον ζυμομύκητα

Εικόνα 1.17: Τα μονοπάτια που ρυθμίζουν την λειτουργία του RIM15

Εικόνα 1.18: Η ρύθμιση του RIM15 από τα μονοπάτια της PKA και του TOR

Εικόνα 1.19 : Σύγκριση των μοριακών συστατικών των μονοπατιών Hog1 και p38

Εικόνα 1.20 : Ο ρυθμιστικός έλεγχος του Hog1 στην φάση G1

Εικόνα 1.21: Η ενεργοποίηση του Hog1 από την Ssk1, κατά την εξάντληση της γλυκόζης

Εικόνα 3.1: Διάταξη συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

Εικόνα 3.2: Τα στάδια της PCR σχηματικά

Εικόνα 4.1: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους BY4742

Εικόνα 4.2: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *rim15Δ*

Εικόνα 4.3: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *hog1Δ*

Εικόνα 4.4: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *pbs2Δ*

Εικόνα 4.5: Σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης των 4 στελεχών

Εικόνα 4.6: Η εικόνα των κυττάρων BY4742 όπως προκύπτει από μικροσκοπία φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×1,6) με την αντίστοιχη γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των κυττάρων ανάλογα με την διάμετρο τους

Εικόνα 4.7: Σχεδιάγραμμα της πειραματικής πορείας που ακολουθείται κατά την ανάκαμψη μιας στατικής καλλιέργειας

Εικόνα 4.8: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους BY4742 στις συνθήκες εκθετικής και στατικής φάσης. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.9: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους BY4742 στις συνθήκες στατικής φάσης και ανάκαμψης για 15 και 30 λεπτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.10: Τα κλάσματα του percoll στο στέλεχος BY4742

Εικόνα 4.11: Η εικόνα του κυτταρικού τοιχώματος κυττάρων του ανώτερου και κατώτερου κλάσματος, όπως προκύπτει από συνεστιακή μικροσκοπία (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη, **μπλέ:** πυρήνας

Εικόνα 4.12: Η πειραματική πορεία που ακολουθείται κατά την ανάκαμψη των κυττάρων του κατώτερου κλάσματος.

Εικόνα 4.13: Η οργάνωση της ακτίνης στα κύτταρα της εκθετικής φάσης, του κατώτερου κλάσματος, της ανάκαμψης για 15 λεπτά παρουσία και απουσία του αναστολέα του μονοπατιού TOR. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Εικόνα 4.14: Η πρωτεΐνη Rim15 αποτελεί σημείο σύγκλισης των μονοπατιών TOR και Ras/PKA

Εικόνα 4.15: Η εικόνα των κυττάρων *rim15Δ* συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (BY4742) στην εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης, όπως προκύπτει από μικροσκοπία φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (TIRF) (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 1,6$)

Εικόνα 4.16: Διαγραμματική απεικόνιση του μεγέθους των κυττάρων *rim15Δ* στην εκθετική και στατική φάση

Εικόνα 4.17: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *rim15Δ* κυττάρων κατά την εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.18: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *rim15Δ* κυττάρων κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, την ανάκαμψη για 15 λεπτά και την ανάκαμψη παρουσία ραπαμυκίνης για 15 λεπτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.19: Η απεικόνιση των κλασμάτων του *perc11* στα *rim15Δ* (δεξιά) συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (αριστερά) και η χρώση του κυτταρικού κλάσματος των κυττάρων που απομονώνονται από αυτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.20: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης κατά την εκθετική φάση, στο κατώτερο κλάσμα του *perc11* και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά των κυττάρων *rim15Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Εικόνα 4.21: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης στο κατώτερο κλάσμα του *perc11* και κατά την ανάκαμψη παρουσία ραπαμυκίνης των κυττάρων *rim15Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Εικόνα 4.22: Η συμπεριφορά της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης HOG1, όπως φαίνεται μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιείται η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση Cdc28.

Εικόνα 4.23: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης στα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά παρουσία Birb796 στα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×14,4). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Εικόνα 4.24: Η μορφολογία των κυττάρων των στελεχών *hog1Δ* και *pbs2Δ* στην εκθετική και στατική φάση. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×1,6)

Εικόνα 4.25: Διαγραμματική απεικόνιση των διαμέτρων των κυττάρων *hog1Δ* και *pbs2Δ*

Εικόνα 4.26: Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *hog1Δ* και *pbs2Δ* κυττάρων στην εκθετική και τη στατική φάση. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.27: Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *hog1Δ* και *pbs2Δ* κυττάρων στην στατική φάση και κατά την ανάκαμψη των 15 και 30 λεπτών. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.28: Η απεικόνιση των κλασμάτων του percoll στα *hog1Δ* (κέντρο), *pbs2Δ* (δεξιά) συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (αριστερά) και η χρώση του κυτταρικού κλάσματος των κυττάρων που απομονώνονται από αυτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Εικόνα 4.29: Η οργάνωση της ακτίνης στην εκθετική φάση, το κατώτερο κλάσμα και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×314,4). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Εικόνα 4.30: Η οργάνωση της ακτίνης στο κατώτερο κλάσμα και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά παρουσία ραπαμυκίνης στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×14,4). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Εικόνα 4.31: Απεικόνιση των ψευδοϋφών, που δημιουργούνται στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ* με την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και διατηρούνται και κατά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου, παρουσία και απουσία ραπαμυκίνης. Εικόνα από

συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη, **μπλε:** πυρήνας

Εικόνα 4.32: Η δημιουργία των ψευδοϋφών συμβαίνει και κατά την ανάκαμψη των στελεχών rim15 και του αγρίου τύπου, παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού HOG1. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη, **μπλε:** πυρήνας

Εικόνα 4.33: Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων bcy1, rim15 και ubi4.

Εικόνα 4.34: Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων cln1, cln2 και cln3

Εικόνα 5.1: Το μονοπάτι ανάπτυξης των ψευδοϋφών στις ζύμες

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά Μεταλλαγμένων Στελεχών

Πίνακας 3.2: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδης διαχωρισμού

Πίνακας 3.3: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδης επιστοίβαξης

Πίνακας 3.4: Συστατικά της αντίδρασης της Real-time PCR σύμφωνα με το κιτ SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix

Πίνακας 3.5: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή

Πίνακας 3.6: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Περίληψη

Η είσοδος σε μια κατάσταση με αργό μεταβολικό ρυθμό είναι χαρακτηριστικό τόσο των προκαρυωτικών κυττάρων, όσο και των ευκαρυωτικών. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως στατική φάση ή ως φάση G0. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* όταν εισέρχεται στην στατική φάση επιτελεί μια σειρά από κυτταρικές αλλαγές. Τα κύτταρα μειώνουν τα μεταβολικά και μεταγραφικά τους επίπεδα, έχουν μεγάλα κενोटόπια και παχιά κυτταρικά τοιχώματα, παρουσιάζουν θερμο- και οσμω-ανθεκτικότητα, σε μια τέτοια κατάσταση πραγματοποιούν την διαδικασία της αυτοφαγίας και οργανώνουν την ακτίνη του κυτταροσκελετού τους σε ειδικές δομές, τα σωμάτια ακτίνης (actin bodies). Η είσοδος στην στατική φάση συνεπάγεται και απενεργοποίηση δυο βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών, του TOR και του RAS/PKA. Τα συγκεκριμένα μονοπάτια αντιλαμβάνονται τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών και είναι ενεργά όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι άφθονα. Επιπλέον επιτηρούν στενά την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται στη στατική φάση. Ένα ακόμη μονοπάτι που πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έξοδο στη στατική φάση, είναι το HOG1. Τα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η κινάση Hog1, καθυστερούν να εξέλθουν από την στατική φάση, κατά την ανανέωση των θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, κατά την εξάντληση της γλυκόζης το Hog1 συσσωρεύεται παροδικά στον πυρήνα και ενεργοποιείται.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αποσαφήνιση του ρόλου των μονοπατιών TOR και HOG1 στην είσοδο και έξοδο του *Saccharomyces cerevisiae* στη στατική φάση καθώς και στην έκφραση γονιδίων αυτής της φάσης. Χρησιμοποιώντας μια μεθοδολογία εμπλουτισμού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0 (κλασμάτωση Percoll) από καλλιέργειες μύκητα σε συνθήκες εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, αναλύσαμε τις μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την αναστολή των μονοπατιών TOR και HOG1 κατά την είσοδο ή έξοδο από τη στατική φάση. Επιπλέον σε αυτές τις συνθήκες ελέγχθηκαν τα πρότυπα έκφρασης γονιδίων, των οποίων η μεταγραφική έκφραση αυξάνεται κατά την είσοδο στη στατική φάση.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από ειδικές χρώσεις του κυτταρικού τοιχώματος δηλώνουν ότι το μέγεθος του κυτταρικού τοιχώματος επηρεάζεται από την αναστολή των μονοπατιών TOR και HOG1, πιθανότατα γιατί υπάρχει αλληλεπίδραση των δυο αυτών μονοπατιών με το μονοπάτι CWI που ελέγχει την δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος. Ταυτόχρονες αλλαγές συμβαίνουν στον κυτταροσκελετό, καθώς η αναστολή των δυο μονοπατιών επιφέρει αλλαγές στην οργάνωση της ακτίνης κατά την είσοδο και έξοδο από την στατική φάση. Επιπλέον η διαγραφή των γονιδίων hog1 και pbs2 οδηγεί στην δημιουργία ψευδοϋφών κατά την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, αλλαγή που δεν αναστρέφεται με την ανανέωση τους. Τέλος η είσοδος στην

στατική φάση ακολουθείται από την αλλαγή στα μεταγραφικά επίπεδα γονιδίων, όπως τα *rim15*, *ubi4*, *ste20*, *snz1*, *cln1-3* κ.α.

Abstract

The exit of cell cycle and the entrance in a low metabolic state is a common characteristic of prokaryotic and eukaryotic cells. This state is known as quiescent state or G0 phase. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, nutrient shortage can induce apoptosis or entry into G0 phase. Quiescent cells display distinctive characteristics, such as thickened cell walls and dense vacuoles, low metabolic rate, autophagy induction, cytoskeletal changes and heat-/osmo-resistance. Importantly, the renewal of nutrients allows re-entry into the cell cycle. The entry into quiescent state leads to inactivation of TOR and Ras/PKA pathways. These pathways are active in nutrient-rich conditions but they are inhibited when cells are cultured after depletion of the growth factors. Furthermore these pathways control the ~~gene~~ expression of genes that are induced in quiescent state. Another pathway that plays crucial role in entrance and exit from quiescent state is the HOG1 pathway. Yeast cells with deleted Hog1, ~~are delayed~~ to exit from quiescence after nutrient renewal. In addition, upon glucose starvation ~~the~~ Hog1 protein is accumulated transiently in nucleus and is activated.

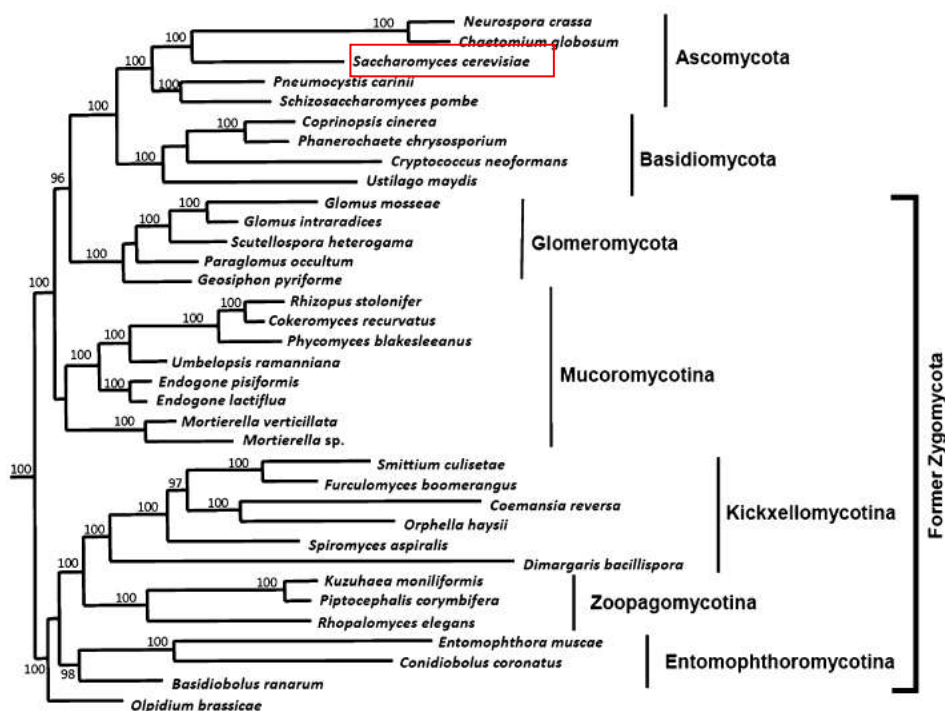
Our propose is the clarification of the role of TOR and HOG1 pathways in entrance and exit from quiescent state of yeast cells and the influence on the expression of genes that are induced in quiescent state. We employed a method that separates the different cell populations of a stationary culture (percoll density-gradient centrifugation). We analyzed the morphological changes of cells due to TOR and HOG1 inactivation. Moreover in these conditions we investigated the transcriptional levels of genes which are expressed in quiescent state.

Our results revealed that the thickness of the cell wall is infected when TOR and HOG1 pathway are inhibited, probably because of the crosstalk with the CWI pathway that regulates the integrity of cell wall. Moreover the inhibition of TOR and HOG1 pathway leads to actin reorganization during ~~by~~ the entry into G0 phase. In addition, the deletion of hog1 and pbs2 genes lead to the growth of pseudohyphae upon nutrient limitation and this observation does not change upon nutrient renewal. Finally, the entry into the quiescent state is followed by changes on transcription levels of genes, such as rim15, ubi4, ste20, snz1, cln1-3 etc.

Εισαγωγή

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά ζυμομυκήτων και η επιλογή τους ως οργανισμός μοντέλο

Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι μύκητες και στην πλειοψηφία τους ανήκουν στην ευρύτερη μικροβιακή ομάδα των ασκομυκήτων (πίνακας 1.1.1). Αποτελούν ένα από τους πιο εύχρηστους ευκαρυωτικούς οργανισμούς-μοντέλα, με συντηρημένες βιολογικές διεργασίες.



Εικόνα 1.1: Φυλογενετικό δέντρο ταξινόμησης των μυκήτων

Οι ζυμομύκητες παρουσιάζουν πληθώρα τεχνικών πλεονεκτημάτων, με σημαντικότερα τα παρακάτω: έχουν ταχύ κύκλο ζωής, μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε υγρές όσο και σε στέρεες καλλιέργειες και δεν απαιτούν υψηλούς κόστους θρεπτικό μέσο. Όταν τα κύτταρα εμβολιάζονται σε πλούσιο (σε γλυκόζη) θρεπτικό μέσο, πολλαπλασιάζονται εκθετικά μέχρι να εξαντληθεί η πηγή άνθρακα. Οι ζύμες διαθέτουν ισοδύναμους μηχανισμούς με πολλούς ευκαρυώτες και προκαρυώτες. Έτσι λοιπόν αυτός ο οργανισμός αποτελεί μοντέλο για την μελέτη της αυτοφαγίας, του οξειδωτικού στρες και της φάσης G0. Είναι κατάλληλος για πειράματα χαρτογράφησης γονιδίων, πειράματα γενετικής, μελέτη του κυτταρικού κύκλου καθώς και την μελέτη θερμοευαίσθητων μεταλλαγμάτων [Madigan et al, 2010; Muller, 2010; Kwon-Chung, 2012].

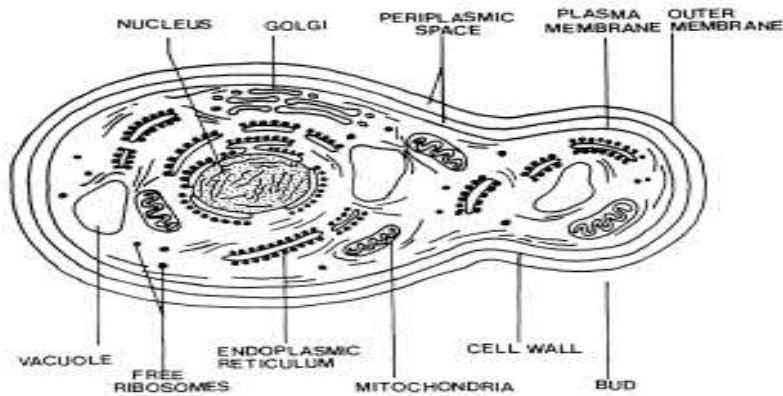
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae* ανήκει στο γένος *Saccharomyces* του είδους των ζυμομυκήτων. Πρόκειται για μονοκύτταρο οργανισμό ικανό να διαιρείται γρήγορα σε καθορισμένο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρά του είναι ωσειδή με διάμετρο περίπου 8μm και διαιρούνται με την διαδικασία της εκβλάστησης. Κατά την διαδικασία αυτή το νέο κύτταρο σχηματίζεται με την μορφή μικρής προεξοχής, η οποία μεγαλώνει βαθμιαία καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και εν τέλει αποκόπτεται από το μητρικό κύτταρο. Το μέγεθος του εκβλαστήματος αποτελεί χαρακτηριστικό μορφολογικό δείκτη του κυτταρικού κύκλου. Ο χρόνος διπλασιασμού του *Saccharomyces cerevisiae* είναι 100 min [Madigan et al, 2010].

Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί ένα ευρέως αξιοποιήσιμο γενετικό σύστημα, μιας και διαθέτει πληθώρα στελεχών, τόσο απλοειδών όσο και πολυπλοειδών στα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν με ευκολία γενετικά πειράματα. Τα βασικά στοιχεία της κυτταρικής του δομής, ο τρόπος σύνθεσης των μακρομορίων, η αντιγραφή και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων παρουσιάζουν ομολογία με εκείνες των ανώτερων φυτικών και ζωικών κυττάρων [Madigan et al, 2010].

1.1.2 Μορφολογία των κυττάρων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Ένα τυπικό κύτταρο *Saccharomyces cerevisiae* περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιβάλλει τον περιπλασματικό χώρο. Ο περιπλασματικός χώρος περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στο κέντρο περίπου του κυττάρου βρίσκεται τοποθετημένος ο πυρήνας. Το κυτταρόπλασμα του κυττάρου περιέχει μιτοχόνδρια, ριβοσώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi, κενοτόπια και μικροσώματα. Η συγκεκριμένη δομή είναι παρόμοια με εκείνη ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου (Εικόνα 1.1). Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα αυτού του είδους δημιουργούν θυγατρικά κύτταρα μέσω εκβλάστησης. Κατά την διαδικασία αυτή το θυγατρικό φέρει το γενετικό υλικό του μητρικού καθώς και οργανίδια αυτού, που κατανεμήθηκαν λίγο πριν την αποκοπή του [Παπαγεωργίου, 2012].



Εικόνα 1.2: Χαρακτηριστική δομή ενός κυττάρου ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.3 Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Το γονιδίωμα των ζυμομυκήτων είναι αρκετά μικρότερο από εκείνο των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Το μεγαλύτερο τμήμα του βρίσκεται στον πυρήνα σε μορφή δίκλωνου γραμμικού μορίου και το υπόλοιπο βρίσκεται στα μιτοχόνδρια με μορφή δίκλωνου κυκλικού μορίου. Άλλες γονιδιωματικές αλληλουχίες μπορεί να βρίσκονται με την μορφή πλασμιδίου ή δίκλωνων γραμμικών μορίων RNA που περικλείονται σε πρωτεϊνικό καψίδιο. Το χρωμοσωμικό DNA στην απλοειδή μορφή του έχει μέγεθος 12 Mb, αποτελείται από 6.500 γονίδια και οργανώνεται σε 16 χρωμοσώματα [Παπαγεωργίου, 2012].

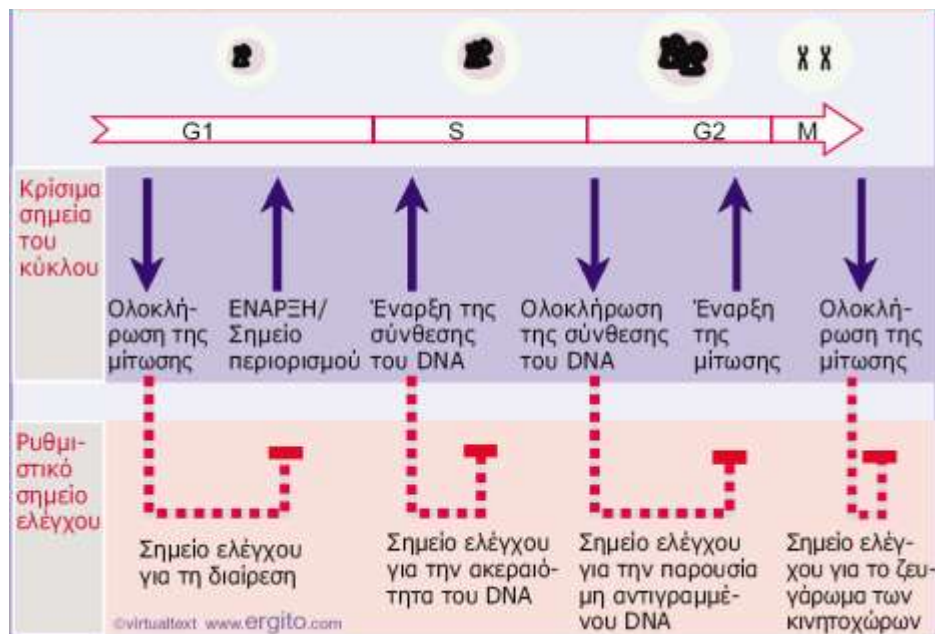
1.2 Ο κυτταρικός κύκλος στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Ως κυτταρικός κύκλος, ορίζεται η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τις εξής φάσεις: μεσόφαση και μίτωση. Η μετάβαση από την μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη ελέγχεται από μηχανισμούς ελέγχου, που είναι γνωστοί ως **σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου** (cell cycle checkpoints) (Εικόνα 1.2). Η μεσόφαση αποτελείται από τις φάσεις: G1, S, G2 οι οποίες έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.3):

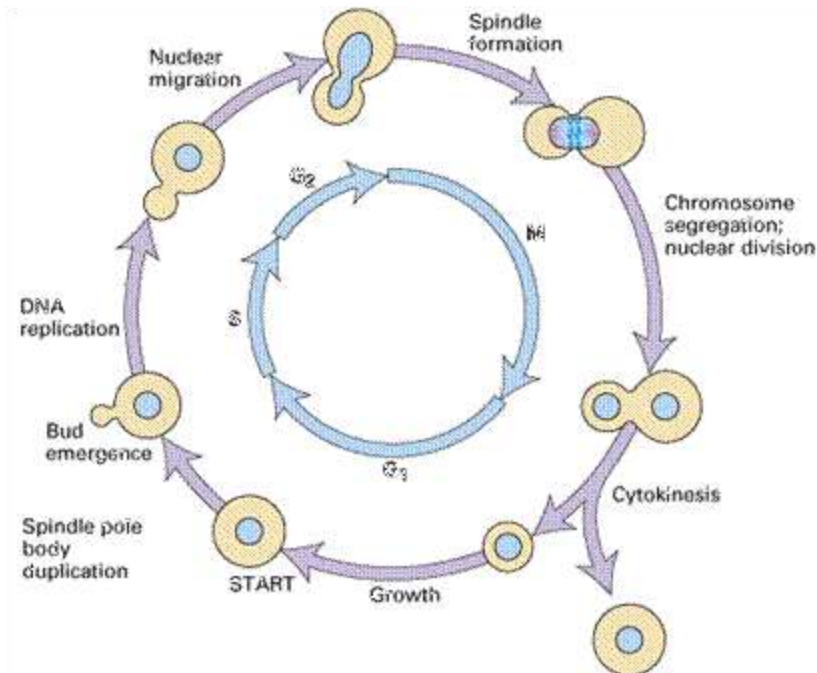
- **Φάση G1:** κατά την διάρκεια της φάσης αυτής πραγματοποιείται σύνθεση RNA και πρωτεϊνών. Τα κύτταρα προετοιμάζονται για την αντιγραφή του DNA, αυξάνοντας το μέγεθός τους. Η πρόοδος αυτής της φάσης του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από το **σημείο ελέγχου της φάσης G1** (G1 phase checkpoint), το οποίο καθορίζει αν θα πραγματοποιηθεί η διαίρεση. Ένα κύτταρο αρχίζει να διαιρείται όταν αποκτήσει μια συγκεκριμένη μάζα, η οποία καθορίζεται από τον ρυθμό

ανάπτυξης. Η ύπαρξη βλάβης στο DNA στην φάση G1, διακόπτει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε αυτή την φάση. Η διακοπή πραγματοποιείται στο **σημείο περιορισμού** (restriction point) κοντά στο τέλος της φάσης G1.

- **Φάση S:** είναι η φάση κατά την οποία το DNA αρχίζει να αντιγράφεται και διαρκεί έως ότου αντιγραφεί όλο το γενετικό υλικό. Το περιεχόμενο του κυττάρου σε DNA αυξάνεται από $2n$ σε $4n$. Και αυτή η φάση του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από ένα σημείο ελέγχου, το **σημείο ελέγχου της φάσης S** (S phase checkpoint), το οποίο αποτρέπει τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου αν υπάρξουν βλάβες ή θραύσματα στο DNA. Η ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κυτταρική διαίρεση.
- **Φάση G2:** είναι η φάση στην οποία το κύτταρο φέρει 2 πλήρη αντίγραφα όλων των χρωμοσωμάτων. Συνεχίζει να αυξάνεται και να συνθέτει πρωτεΐνες καθώς προετοιμάζεται για την μίτωση. Το σημείο ελέγχου της φάσης G2 ελέγχει την ύπαρξη μη αντιγραμμένου DNA ώστε να είναι εφικτή η μετάβαση στην μίτωση.
- **Μίτωση ή φάση M:** πρόκειται για το στάδιο του κυτταρικού κύκλου το οποίο μοιράζεται από ένα διπλοειδές ζεύγος χρωμοσωμάτων σε κάθε θυγατρικό κύτταρο. Σε αυτή την φάση του κυτταρικού κύκλου είναι πλέον ορατά μεμονωμένα χρωμοσώματα και οργανώνεται η μιτωτική άτρακτος. Το σημείο ελέγχου αυτής της φάσης (**σημείο ελέγχου της μίτωσης** ή M phase checkpoint) ελέγχει την ύπαρξη ζευγαρωμένων κινητοχώρων προκειμένου να συνεχίσει η μίτωση. [Lewin, 2004]



Εικόνα 1.3: Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται μέσω των σημείων ελέγχου

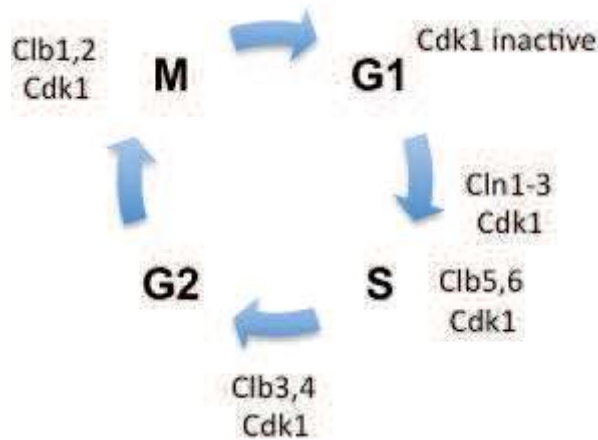


Εικόνα 1.4: Ο κυτταρικός κύκλος στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1 Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο των ζυμομυκήτων

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, οι οποίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες. Η αντίστοιχη κινάση στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* είναι η Cdk1 ή Cdc28. Εννέα διαφορετικές κυκλίνες (Cln1-3 και Clb1-6) σχηματίζουν σύμπλοκο με την Cdc28 και ελέγχουν ειδικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1.4) [Enserink, 2011].

Στην έναρξη της φάσης G1, η Cdc28 είναι ανενεργή. Κατά την μετάβαση από την G1 στην φάση S, η Cdc28 συνδέεται με τις Cln1, Cln2 και Cln3. Στην φάση S η Cdk1 αλληλεπιδρά με τις Clb5,6 ενώ κατά την μετάβαση από την S στην G2 με τις Clb3,4. Τέλος η μετάβαση από την G2 στην M απαιτεί την πρόσδεση της Cdk1 (Cdc28) στις Clb1,2 [Enserink, 2011; Koch et al, 1996].



Εικόνα 1.5: Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από την πρόσδεση της κινάσης Cdk1 (Cdc28) στις αντίστοιχες κυκλίνες της κάθε φάσης

Γενικά στις ζύμες η έκφραση των γονιδίων της Έναρξης (του αντίστοιχου σημείου περιορισμού στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα) εξαρτάται από τα σύμπλοκα μεταγραφικών παραγόντων SBF και MBF. Τα σύμπλοκα αυτά αποτελούνται από τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή Swi6 και μια πρωτεΐνη που συνδέεται με το DNA, την Swi4 ή Mbp1, αντίστοιχα για τον κάθε παράγοντα. Ο SBF ελέγχει την μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, ενώ γονίδια που συνεπάγονται την σύνθεση ή την επιδιόρθωση του DNA είναι στόχοι του MBF. Απώλεια των Swi4 ή Mbp1, έχει ως αποτέλεσμα ένα μόνιμο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 καθώς και κυτταρική θνησιμότητα, κάτι το οποίο αποδεικνύει την ουσιώδη λειτουργία των συμπλόκων αυτών [Enserink, 2011].

Η μετάβαση από την μια φάση στην άλλη του κυτταρικού κύκλου λειτουργεί ως βιολογικός «διακόπτης», ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο μέσω βρόχων ανάδρασης. Στα πρώιμα στάδια της G1, η cdk1 είναι ανενεργή λόγω χαμηλών επιπέδων κυκλίνης και της ύπαρξης CKIs (cyclin dependent kinase inhibitors). Καθώς το κύτταρο προχωρά στο όψιμο στάδιο της G1, τα επίπεδα της κυκλίνης αυξάνονται. Στον *Saccharomyces cerevisiae* αρχικά ενεργοποιείται η κυκλίνη Cln3 και σχηματίζει σύμπλοκο με την cdk1. Το σύμπλοκο Cln3-Cdk1 φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται Whi5 [Enserink, 2011; Constanzo et al, 2004].

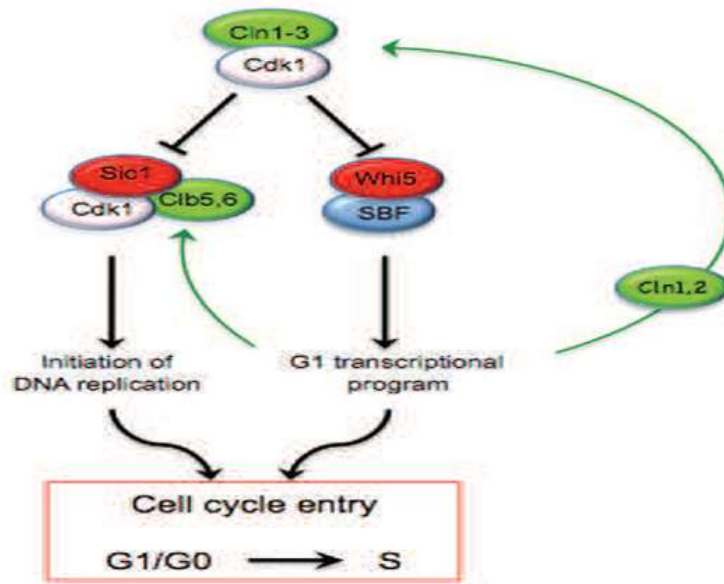
Ο Whi5 είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας, ο οποίος αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό σύμπλοκο SBF (Swi4/Swi6) που απαιτείται για την μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην είσοδο του κυτταρικού κύκλου και την αντιγραφή του DNA. Ο ρόλος του Whi5 είναι να στρατολογεί τις διακετυλάσες των ιστονών (HDACs)

που συγκρατούν στενά συνδεδεμένη την χρωματίνη που περιβάλλει το σύμπλοκο Whi5-SBF με τις ιστόνες. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ισοδύναμη με την Rb, την κατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος [Wagner *et al.*, 2009; Constanzo *et al.*, 2004].

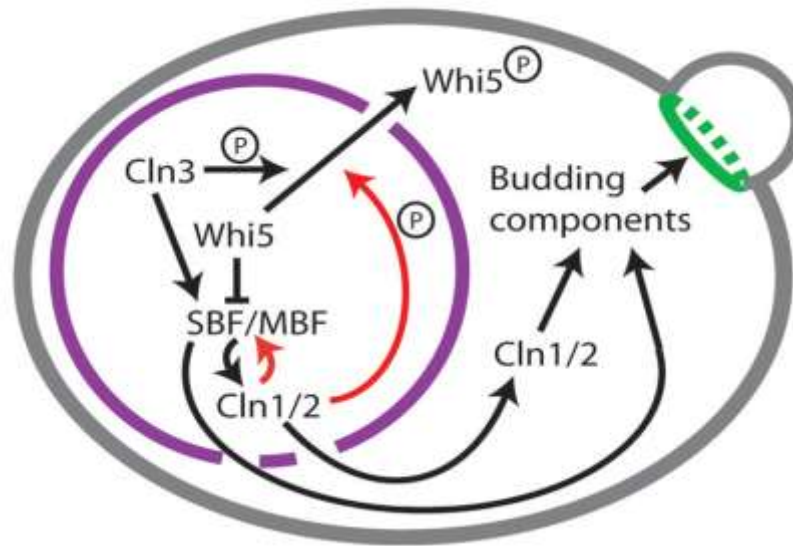
Όταν ο Whi5 προσδέεται στο σύμπλοκο SBF, το κύτταρο αδυνατεί να εισέλθει στον κυτταρικό κύκλο (Εικόνα 1.5). Κατά την έναρξη του κυτταρικού κύκλου, το σύμπλοκο Cln3-Cdk1 φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τον Whi5, προκαλώντας διαχωρισμό του από τον υποκινητή του SBF και προωθώντας την έξοδό του από τον πυρήνα (Εικόνα 1.6) [Skotheim J.M. *et al.*, 2008]. Έτσι το σύμπλοκο SBF είναι ελεύθερο να ενεργοποιήσει την μεταγραφή γονιδίων που είναι απαραίτητα για την φάση G1 και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στα κύτταρα όπου λείπει η πρωτεΐνη Whi5, προωθείται η μόνιμη μεταγραφή γονιδίων που εξαρτώνται από το SBF, με αποτέλεσμα να τα κύτταρα να περνούν γρήγορα από το σημείο Έναρξης και να έχουν πιο μικρό μέγεθος από τα φυσιολογικά. Αντίστοιχα οι μηχανισμοί που καταστέλλουν τον MBF στην αρχή της φάσης G1 ή τον ενεργοποιούν κατά την έναρξη του κυτταρικού κύκλου, δεν είναι πλήρως γνωστοί. Παρόλα αυτά ο Nrm1, που είναι ένας από τους στόχους του MBF, αποκρίνεται σε καταστολή του MBF κατά την έξοδο από την G1 [Wagner *et al.*, 2009; Constanzo *et al.*, 2004].

Οι Cln1 και Cln2 λαμβάνουν μέρος στο μεταγραφικό πρόγραμμα μέσω βρόχου θετικής ανάδρασης [Skotheim *et al.*, 2008]. Οι νεοσυντιθέμενες κυκλίνες επάγουν περαιτέρω την φωσφορυλίωση του Whi5 οδηγώντας σε περαιτέρω ενεργοποίηση του SBF. Επιπλέον οι κυκλίνες αυτές συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των κυκλινών τύπου B (Clb), στην αντιγραφή του DNA και στην εμφάνιση του εκβλαστήματος. Από την άλλη πλευρά η κυκλίνη Cln3 εκτός από τον σημαντικό της ρόλο στην έναρξη του κυτταρικού κύκλου είναι και ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου, καθώς επιβεβαιώνει ότι τα κύτταρα έχουν φτάσει στο κατάλληλο μέγεθος ώστε να επιτευχθεί η μεταγραφή [Wagner *et al.*, 2009].

Η είσοδος στον κυτταρικό κύκλο απαιτεί επίσης την καταστολή ενός CKI, του Sic1, ο οποίος αναστέλλει τα σύμπλοκα Clb5-Cdk1 και Clb6-Cdk1. Ο Sic1 είναι απαραίτητος για τον έλεγχο του ακριβή χρόνου εισόδου στην φάση S. Διατηρεί τα σύμπλοκα Clb5/6-Cdk1 ανεσταλμένα και θέτει ένα κατώτατο όριο (κατώφλι) για την ενεργοποίηση του Clb-Cdk1 κατά την μετάβαση από την G1 στην S. Τα σύμπλοκα αυτά ενεργοποιούν την αντιγραφή του DNA. Ο Sic1 φωσφορυλιώνεται από τα σύμπλοκα Cln-Cdk1, τα οποία τον στοχοθετούν, ώστε να προσδεθεί στον SBF. Η έκφραση του Sic1 πυροδοτείται όταν τα κύτταρα εξέρχονται από την μίτωση και κορυφώνεται σε πρώιμο στάδιο της φάσης G1. Επομένως για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο πρέπει να ανασταλλεί η δράση και του Whi5 και του Sic1 (Εικόνα 1.5). [Enserink, 2011]



Εικόνα 1.6: Η ρύθμιση της εισόδου στον κυτταρικό κύκλο στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

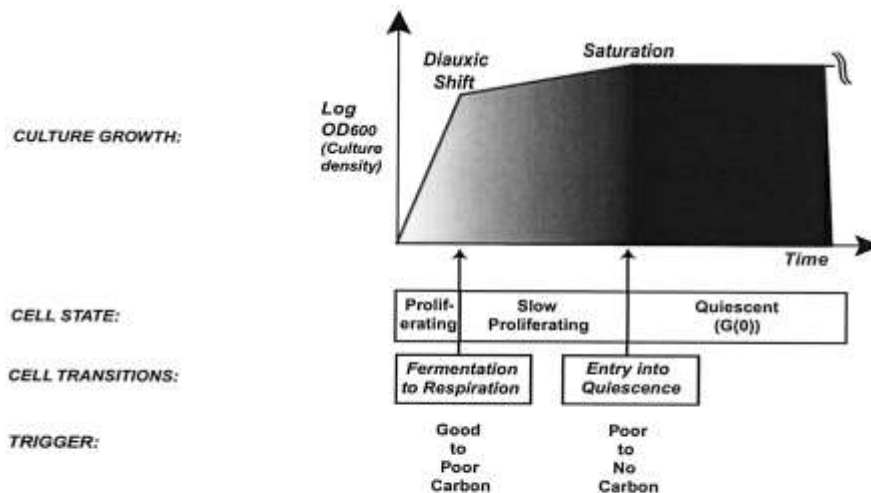


Εικόνα 1.7: Ο ρόλος των κυκλινών για την έναρξη και πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

1.3 Φάσεις ανάπτυξης από τις οποίες διέρχεται μια καλλιέργεια *Saccharomyces Cerevisiae*

Μια καλλιέργεια κυττάρων ζυμομύκητα, η οποία αναπτύσσεται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (YPD: yeast extract, peptone, dextrose) διέρχεται από τις εξής φάσεις ανάπτυξης:

- **Λανθάνουσα φάση** (Lag phase): κατά την διάρκεια αυτής της φάσης τα κύτταρα προσαρμόζονται στις συνθήκες ανάπτυξης. Ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν στην καλλιέργεια δεν αυξάνεται σε αυτή την φάση.
- **Λογαριθμική ή Εκθετική φάση** (Exponential or logarithmic phase): σε αυτή την φάση τα κύτταρα αναπτύσσονται εκθετικά. Στην αρχή τα κύτταρα αναπτύσσονται με ζύμωση της διαθέσιμης γλυκόζης προς παραγωγή αιθανόλης. Όταν η γλυκόζη αρχίζει να εξαντλείται σταματά η ανάπτυξη και διακοπή της αναπνευστικής αλυσίδας για της παραγωγή ενέργειας. Αυτή η περίοδος της είναι γνωστή ως διαυξίμη μετατόπιση (diauxic shift).
- **Μετα-διαυξίμη φάση** (post-diauxic phase): κατά την φάση αυτή της ανάπτυξης, τα κύτταρα αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με αυτά που βρίσκονται στην εκθετική φάση. Τα κύτταρα της φάσης αυτής χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την αιθανόλη που παράχθηκε από την προηγούμενη φάση.
- **Στατική φάση** (stationary phase): ο αριθμός των κυττάρων της φάσης αυτής παραμένει σταθερός. Στην συγκεκριμένη φάση υπάρχουν κύτταρα, τα οποία προετοιμάζονται να οδηγηθούν σε απόπτωση, κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ακόμα με αργό ρυθμό και κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση αδράνειας, γνωστή ως G₀, στην οποία μπορούν να παραμένουν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Μια καλλιέργεια *Saccharomyces cerevisiae* εισέρχεται σε αυτή την φάση μετά από 5 με 7 ημέρες [Herman, 2002; Gray et al, 2004; Brejning et al, 2002; Galdiery et al, 2010].



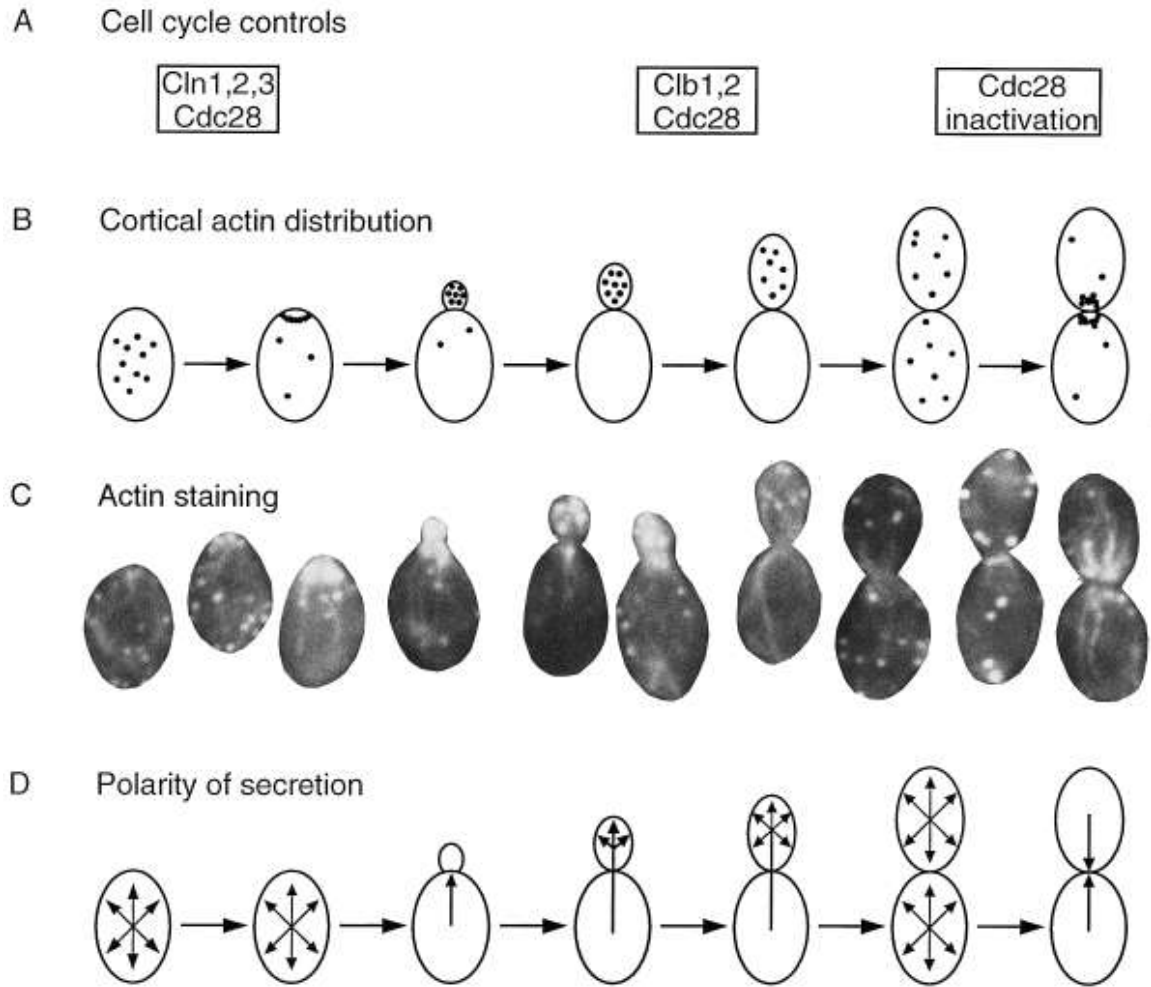
Εικόνα 1.8: Τα στάδια ανάπτυξης μιας καλλιέργειας ζυμομύκητα

1.4 Η οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού στον *Saccharomyces Cerevisiae*

Ο κυτταροσκελετός όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων οργανώνεται σε μικροσωληνίσκους, μικρονημάτια και ενδιάμεσα νημάτια. Ο κυτταροσκελετός στα κύτταρα της ζύμης συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διεργασιών, όπως: η κυτταρική διαίρεση, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, η κίνηση και η τοποθέτηση οργανιδίων στο κύτταρο, ο σχηματισμός εκβλαστήματος, η πολωμένη ανάπτυξη, την ενδοκυττάρωση και την έκκριση. Οι μικροσωληνίσκοι δομούνται από μόρια τουμπουλίνης, ενώ τα μικρονημάτια από μόρια ακτίνης [Alberts et al, 2006; Winsor et al, 1997].

Η ακτίνη είναι μία πρωτεΐνη 375 αμινοξέων με καλά χαρακτηρισμένη ενεργότητα ATPάσης. Τα περισσότερα μόρια ακτίνης ακετυλιώνονται στο αμινοτελικό τους άκρο και μεθυλιώνονται σε κατάλοιπα ιστιδίνης. Η ακτίνη είναι παρούσα στα κύτταρα σαν μονομερές (G ακτίνη) ή σαν πολυμερές (F ακτίνη). Τα μικρονημάτια αποτελούνται κυρίως από πολυμερή ακτίνης και άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται που την ελέγχουν [Winsor et al, 1997].

Στον ζυμομύκητα τη ακτίνη μπορεί να απεικονιστεί με την φθορίζουσα χρωστική φαλλοϊδίνη ως δυο τύποι πολυμερών δομών: τα κυτταροπλασματικά νημάτια ακτίνης και τις κηλίδες ακτίνης, οι οποίες ανακατανέμονται κατά την ανάπτυξη τόσο στα απλοϊδή, όσο και στα διπλοϊδή κύτταρα ζύμης. Με την έναρξη του κυτταρικού κύκλου μετά την φάση G0 οι κηλίδες ακτίνης είναι κατανεμημένες σε όλη την επιφάνεια του κυττάρου και τα νημάτια ακτίνης είναι προσανατολισμένα στο κυτταρόπλασμα. Λίγο πριν την δημιουργία του εκβλαστήματος οι κηλίδες ακτίνης βρίσκονται στο σημείο από όπου εκφύεται το εκβλάστημα και τα νημάτια ακτίνης στην ευρύτερη περιοχή γύρω από το σημείο αυτό. Οι κηλίδες ακτίνης συγκεντρώνονται στην περιοχή του εβλαστήματος κατά την αύξηση της κυτταρικής επιφάνειας, έως ότου το εκβλάστημα φτάσει στο κατάλληλο μέγεθος. Στην συνέχεια τα νημάτια και οι κηλίδες ακτίνης κατανέμονται και πάλι ισόποσα σε όλο το κύτταρο. Ενώ κατά την κυτταροκίνηση ο κηλίδες ακτίνης σχηματίζουν δακτύλιο στο σημείο όπου θα αποκοπεί το εκβλάστημα (εικόνα 1.8) [Winsor et al, 1997].

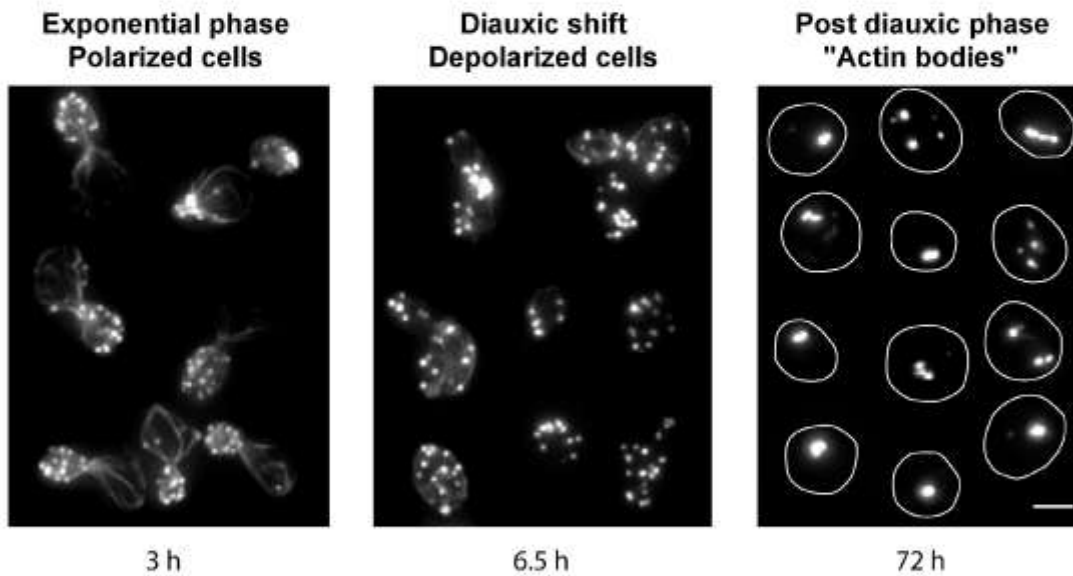


Εικόνα 1.9: Η κατανομή των κηλίδων και νηματίων ακτίνης κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Κατά την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών σε μια καλλιέργεια ζυμομύκητα, η ακτίνη οργανώνεται σε ειδικές δομές, τα σωμάτια ακτίνης (actin bodies). Τα σωμάτια ακτίνης αποτελούνται από F-ακτίνη και πρωτεΐνες που προσδένονται στην ακτίνη. Σε αντίθεση με τα νημάτια και τις κηλίδες ακτίνης, τα σωμάτια ακτίνης είναι ακίνητα και όσο η ακτίνη είναι οργανωμένη σε αυτή την μορφή δεν παρατηρούνται αλλαγές στην οργάνωσή της. Κατά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου στα κύτταρα, τα σωμάτια ακτίνης εξαφανίζονται και εμφανίζονται και πάλι τα νημάτια και οι κηλίδες ακτίνης και, δεδομένου ότι δεν υπάρχει *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση, θα συναρμολογηθεί και πάλι ο κυτταροσκελετός [Sagot *et al*, 2006].

Κατά την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας, τα σωμάτια ακτίνης εμφανίζονται στην μετα-διαύξιμη φάση. Πιο συγκεκριμένα τα κύτταρα που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους είναι πολωμένα καθώς η ακτίνη εμφανίζεται κυρίως στο εκβλάστημα, στην διαύξιμη μετατόπιση ο κυτταροσκελετός εκπολώνεται και η ακτίνη εντοπίζεται

τόσο στο μητρικό, όσο και στο θυγατρικό κύτταρο ενώ κατά την μετα-διαύξιμη φάση η ακτίνη σχηματίζει τα σωματίδια ακτίνης (εικόνα 1.9) [Sagot *et al*, 2006].



Εικόνα 1.10: Η κατάσταση της ακτίνης του κυτταροσκελετού κατά την εκθετική φάση, την διαύξιμη μετατόπιση και την μετα-διαύξιμη φάση

1.5 Η στατική φάση

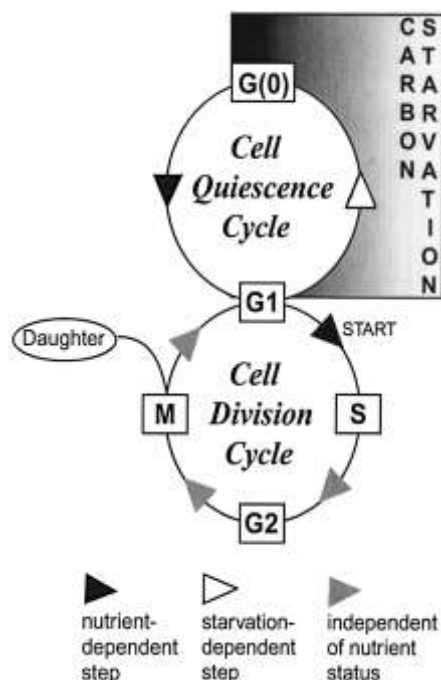
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στις ζύμες η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και είσοδο σε μία φάση αδράνειας, γνωστή ως στατική φάση ή φάση G0, που είναι μεταβολικά ανενεργή με στόχο τα κύτταρα να ανταπεξέλθουν στις υπάρχουσες συνθήκες ανάπτυξης. Η είσοδος σε αυτή την φάση δεν αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο των ζυμομυκήτων, αλλά και των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Επιπλέον την ιδιότητα της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο έχουν και τα προκαρυωτικά κύτταρα [Gray *et al*, 2004; Klosinska *et al*, 2011].

Τα κύτταρα της φάσης αυτής παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τα διαχωρίζουν από τα κύτταρα που πραγματοποιούν τον κυτταρικό τους κύκλο. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε αυτή την φάση δεν πολλαπλασιάζονται, αποτυγχάνουν να συσσωρεύσουν όγκο και μάζα και στην πλειοψηφία τους δεν παρουσιάζουν εκβλαστήματα [Aragon *et al*, 2008]. Ο μεταγραφικός ρυθμός των κυττάρων αυτών είναι τρεις με πέντε φορές μικρότερος από εκείνον των κυττάρων που αναπτύσσονται εκθετικά. Η έκφραση πολλών γονιδίων, όπως αυτών που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες ή τις πολυμεράσες I και II, καταστέλλονται και ταυτόχρονα αυξάνεται η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου σε αυτή την φάση (SNZ1, HSP26, UBI4). Επιπλέον αναστέλλεται η αποικοδόμηση του mRNA [Gray *et al*, 2004].

Η συνολική πρωτεϊνοσύνθεση των κυττάρων μειώνεται περίπου στο 0,3 %. Τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και επάγεται η διαδικασία της αυτοφαγίας, κατά την οποία τα συστατικά του κυτταροπλάσματος μεταφέρονται στα κενοτόπια στις ζυμες (ή στα λυσοσώματα στους ανώτερους ευκαρυωτικούς) για αποικοδόμηση και επαναχρησιμοποίηση τους. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα γίνονται πιο παχιά ενώ η ακτίνη του κυτταροσκελετού οργανώνεται σε ειδικές δομές, τα σωμάτια ακτίνης (actin bodies). Σχετικά με τα λογαριθμικά αναπτυσσόμενα κύτταρα, τα κύτταρα της στατικής φάσης είναι θερμο- και οσμω- ανθεκτικά αλλά και ανθεκτικά στην πέψη με το ένζυμο ζυμολυάση [Gray *et al*, 2004; Klosinska *et al*, 2011].

Η φάση G1 αποτελεί το κοινό σημείο μεταξύ της κατάστασης αδράνειας και του κυτταρικού κύκλου. Κατά τα πρώιμα στάδια της φάσης αυτής, δηλαδή πριν την Έναρξη, το κύτταρο αποφασίζει αν θα συνεχίσει τον κυτταρικό κύκλο ή θα εισέλθει στην φάση αδράνειας, ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Όταν στην καλλιέργεια υπάρχουν θρεπτικά συστατικά, το κύτταρο τα χρησιμοποιεί και συνεχίζει τον κυτταρικό κύκλο. Σε περίπτωση εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών το κύτταρο εισέρχεται στον «κύκλο αδράνειας» (εικόνα 1.10). Όταν σε αυτά τα κύτταρα προστεθεί πηγή άνθρακα (γλυκόζη), τότε αυτά εισέρχονται και πάλι στον κυτταρικό τους κύκλο [Gray *et al*, 2004].

Αντίθετα, το θερμικό σοκ, η επίδραση χημικών όπως, το μεθυλομεθαν-σουλφονικό οξύ και οι τοξίνες, μπορούν να επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες τόσο σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται όσο και σε κύτταρα που βρίσκονται στην στατική φάση [Gray *et al*, 2004].

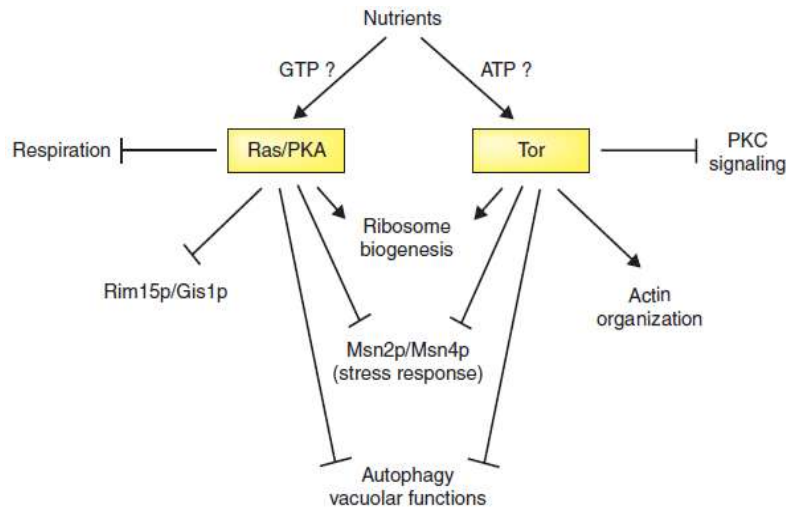


Εικόνα 1.11: Η αλληλεπίδραση μεταξύ κυτταρικού κύκλου και «κύκλου αδράνειας»

1.5.1 Είσοδος στην στατική φάση:

Η είσοδος σε αυτή την φάση ελέγχεται από δύο σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, το μονοπάτι Ras και το μονοπάτι TOR. Η παρουσία πλούσιου θρεπτικού μέσου αποτελεί σήμα για την ενεργοποίηση τόσο του μονοπατίου TOR όσο και του μονοπατιού Ras/PKA (εικόνα 1.11). Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε καταστολή και των δύο μονοπατιών και έτσι πυροδοτείται η είσοδος στην φάση αδράνειας [Herman, 2002].

Στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* οι πρωτεΐνες Ras, Ras1p και Ras2p, είναι μικρές GTP-δεσμευόμενες πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση PKA. Οι TOR πρωτεΐνες, Tor1p και Tor2p, είναι αυτοφωσφορυλιώμενες πρωτεΐνες με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Και τα δύο αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην θετική ρύθμιση διαφόρων διεργασιών όπως η μετάφραση και η αποικοδόμηση πρωτεϊνών [Herman, 2002].



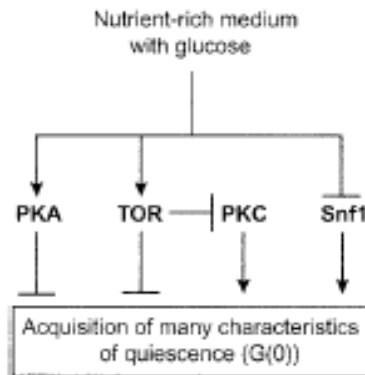
Εικόνα 1.12: Για την είσοδο στην φάση G0 απαιτείται η αναστολή των μονοπατιών Ras/PKA και TOR

Έχειδειχθεί ότι η πρωτεϊνική κινάση Rim15p, ως ένα PKA υπόστρωμα, είναι απαραίτητη για την είσοδο στην φάση G0. Μεταλλάξεις στις οποίες λείπει η Rim15p είναι βιώσιμες, όμως τα κύτταρα αυτά δεν παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά της φάσης G0, τα οποία εμφανίζονται με την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών. Τα αποτελέσματα την εισόδου στην φάση G0, επηρεάζεται και από τον μεταγραφικό παράγοντα Gis1p. Ακόμη είναι άγνωστο αν ο Gis1 είναι υπόστρωμα της Rim15 ή αν επιδρά σε αυτήν με έμμεσο τρόπο. Τα κύτταρα στα οποία λείπει ο Gis1 παρουσιάζουν ελάττωμα στην συσσώρευση του γλυκογόνου και σταματούν τον κυτταρικό τους κύκλο στην G1, αλλά παρουσιάζουν και σημαντικό πρόβλημα βιωσιμότητας στην στατική φάση [Herman, 2002].

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι για την είσοδο στην στατική φάση (φάση G0) εμπλέκεται και η καρβοξυ-τελική επικράτεια (CTD) της Rpb1p, της μεγαλύτερης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II. Η CTD της Rpb1p είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη επαναλαμβανόμενη δομή, η οποία είναι σημαντική για την ρύθμιση των πολλαπλών σταδίων για την παραγωγή ώριμου μορίου mRNA. Έλλειψη τμήματος ή και ολόκληρης της CTD της Rpb1p εμποδίζουν την ομαλή είσοδο στην στατική φάση και σε συνδυασμό με μεταλλάξεις που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας του μονοπατιού Ras/PKA οδηγεί σε μη βιώσιμη κατάσταση. Με βάση αυτή την παρατήρηση πιθανολογείται ότι η σηματοδοτική οδός Ras/PKA συντονίζει την γονιδιακή έκφραση με την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών ρυθμίζοντας τη λειτουργία των πρωτεϊνών που συνδέονται με τη CTD της Rpb1p [Herman, 2002].

Από την άλλη πλευρά, όταν το μονοπάτι TOR είναι ενεργό, καταστέλλει το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης C (Protein Kinase C-PKC). Το μονοπάτι της PKC

ευθύνεται για την βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Όταν είναι ενεργό προσδίδει στα κύτταρα ικανότητα να παρουσιάσουν κάποια από τα χαρακτηριστικά της στατικής φάσης, όπως τα παχιά κυτταρικά τοιχώματα ή την δημιουργία σωματίων ακτίνης (actin bodies). Επομένως η αναστολή του μονοπατιού TOR και η επακόλουθη ενεργοποίηση της PKC, είναι απαραίτητη για την είσοδο του κυττάρου στην στατική φάση. Κύτταρα που παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε στόχους του μονοπατιού TOR, αποπύπτουν μέσω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών (Εικόνα 1.12) [Herman, 2002].



Εικόνα 1.13: Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην είσοδο στην φάση G0

Τέλος για την είσοδο σε αυτή την φάση απαιτείται η ενεργοποίηση του μονοπατιού Snf1. Το μονοπάτι αυτό παρουσία θρεπτικών συστατικών είναι ανενεργό και ενεργοποιείται με την εξάντλησή τους. Το ενεργό Snf1 μετατρέπει τον μεταβολισμό των κυττάρων από ζυμωτικό σε αναπνευστικό, μια απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο στην στατική φάση [Gray *et al*, 2004].

1.5.2 Έξοδος από την στατική φάση

Για να εξέλθουν τα κύτταρα από την φάση G0 απαιτείται ο εμβολιασμός τους σε πλούσιο θρεπτικό μέσο, το οποίο θα περιέχει άφθονη την κύρια πηγή άνθρακα (γλυκόζη). Έτσι το μονοπάτι TOR ενεργοποιείται και τα κύτταρα εισέρχονται συγχρονισμένα στον κυτταρικό κύκλο. Μετά από 1 ώρα από τον εμβολιασμό τους έχουν χάσει σχεδόν όλα τα χαρακτηριστικά της φάσης G0, τα οποία είναι: ανθεκτικότητα, παχιά κυτταρικά τοιχώματα, actin bodies, μεγάλα κενοτόπια. Ακόμη, η κινάση του κυτταρικού κύκλου, Cdc28, προσδένεται στην κυκλίνη Cln3 ώστε να ενεργοποιηθεί ξανά ο κυτταρικός κύκλος [Gray *et al*, 2004].

1.6 Τα γονίδια που σχετίζονται με τη φάση G0

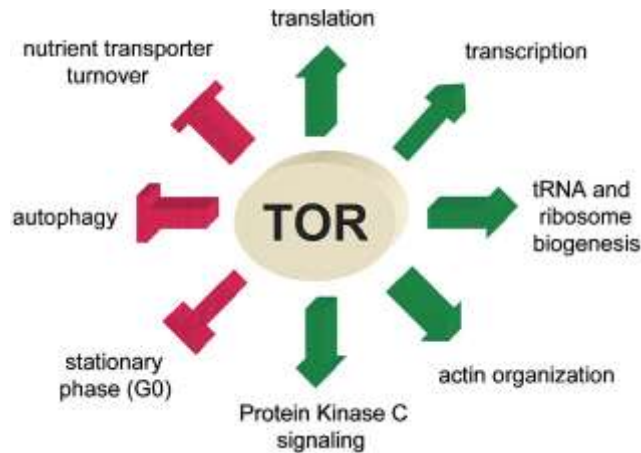
Η είσοδος στην στατική φάση, όπως προαναφέρθηκε, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Η αναστολή αυτή συνεπάγεται την επαγωγή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων, των γονιδίων που σχετίζονται με την φάση G0 (G0 related genes) και τα οποία αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω [Gray *et al*, 2004].

1.6.1 Γονίδια που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τα μονοπάτια TOR και RAS/PKA

Το μονοπάτι TOR:

Το μονοπάτι TOR είναι ένας εξαιρετικά συντηρημένος σηματοδοτικός μηχανισμός, ο οποίος αντιλαμβάνεται τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών και τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου. Βοηθά το κύτταρο να προσαρμοστεί σε πιθανές περιβαλλοντικές αλλαγές και είναι ένα από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην είσοδο στην φάση G0. Το μονοπάτι αυτό είναι ενεργό παρουσία θρεπτικών συστατικών και ανενεργό όταν τα θρεπτικά συστατικά εξαντληθούν ή όταν η κινάση TOR ανασταλεί από το αντιβιοτικό ραπαμυκίνη [Schmelzle *et al.*, 2000; Ronit *et al*, 2010].

Ο μηχανισμός αυτός ρυθμίζει μεγάλο αριθμό διεργασιών. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης TOR επάγει την διαδικασία της μεταγραφής και την μετάφρασης, την βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων και των tRNA, την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού και την ενεργοποίηση της PKC σηματοδοτικής οδού. Αντίθετα καταστέλλει την διαδικασία της αυτοφαγίας και την είσοδο στην στατική φάση (εικόνα 1.13) [Schmelzle *et al.*, 2000].

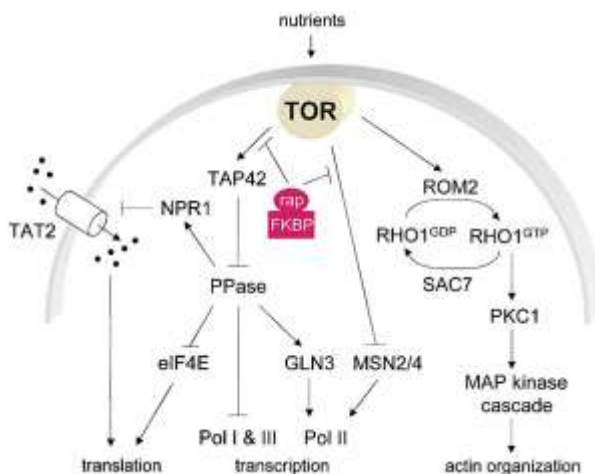


Εικόνα 1.14: Το μονοπάτι TOR εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών διεργασιών

Η ύπαρξη θρεπτικών συστατικών και κυρίως της πηγής άνθρακα (γλυκόζη) οδηγεί, με τρόπο ακόμα άγνωστο, στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης TOR. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TAP42, η οποία συνδέεται και καταστέλλει φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης, όπως η PP2A (Protein Phosphate 2A) και η Sit4. Η αλληλεπίδραση της TAP42 με τις φωσφατάσες οδηγεί στην απενεργοποίησή τους, κάτι που τις αποτρέπει να συνδεθούν με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E), ο οποίος θα παραμείνει φωσφορυλιωμένος και ενεργός. Ο eIF4E στη συνέχεια συνδέεται με το 5' άκρο του mRNA και επάγει την μετάφραση [Schmelzle *et al*, 2000].

Όταν η κινάση TOR είναι ανενεργή (σε περίπτωση εξάντλησης ή έλλειψης θρεπτικών συστατικών), η πρωτεΐνη TAP42 είναι κατεσταλμένη. Η κατάσταση αυτή επιτρέπει στις φωσφατάσες τόσο να αποφωσφορυλιώσουν τον eIF4E και να καταστείλουν την μετάφραση, όσο και να καταστείλουν τις πολυμεράσες I και III καταστέλλοντας την μεταγραφή. Οι ενεργές φωσφατάσες μπορούν ταυτόχρονα να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο Gln3, που θα ενεργοποιήσουν την μεταγραφή γονιδίων, η έκφρασή των οποίων επιτυγχάνει την επιβίωση του κυττάρου σε περιορισμένα θρεπτικά συστατικά (εικόνα 1.14) [Schmelzle *et al*, 2000].

Ο μεταγραφικός παράγοντας Gln3, συμμετέχει στην μεταγραφή γονιδίων που επιτυγχάνουν την επιβίωση του κυττάρου σε χαμηλά επίπεδα πηγής αζώτου. Παρουσία φωσφατασών (άρα και ανενεργής κινάσης TOR) ο Gln3 αποφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται, μετακινείται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί την μεταγραφή των κατάλληλων γονιδίων που επιτρέπουν την επιβίωση παρουσία χαμηλών επιπέδων αζώτου στα θρεπτικά συστατικά. Στην περίπτωση όπου η κινάση TOR είναι ενεργή, οι φωσφατάσες απενεργοποιούνται μέσω της TAP42, επομένως ο Gln3 παραμένει φωσφορυλιωμένος και ανενεργός στο κυτταρόπλασμα [Rai *et al*, 2013].



Εικόνα 1.15: Το μονοπάτι TOR στις ζύμες

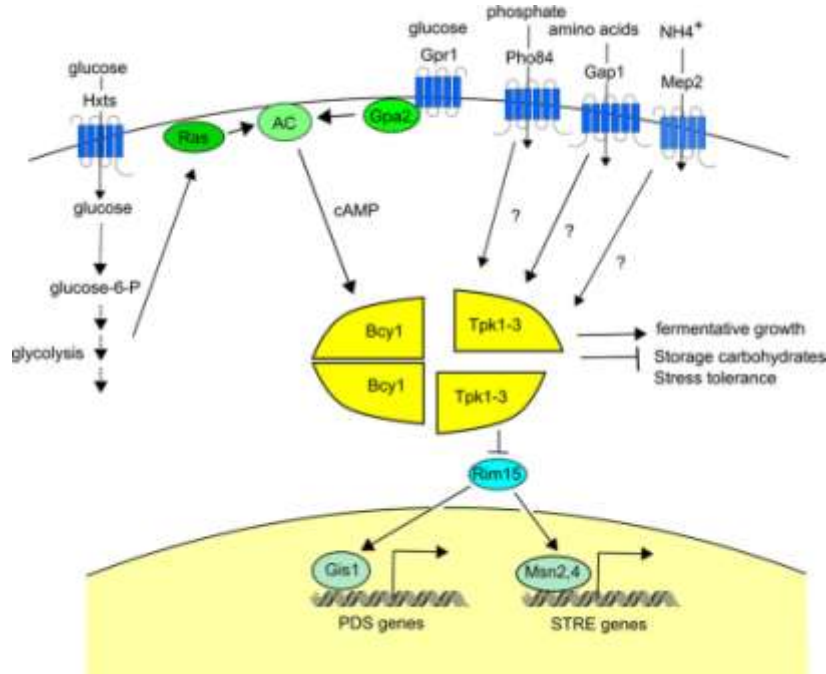
Το σηματοδοτικό μονοπάτι TOR ελέγχει ακόμη και την οργάνωση του κυτταροσκελετού από τα ινίδια ακτίνης. Το ενεργό TOR ενεργοποιεί τις CTPases RHO μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης ROM2, οι οποίες ενεργοποιούν την σηματοδοτική οδό των MAP κινασών. Έτσι η ακτίνη οργανώνεται σε ινίδια ακτίνης σε όλο το μήκος του κυτταροσκελετού. Η αναστολή του μονοπατιού TOR, μέσω της εξάντλησης θρεπτικών συστατικών, καταστέλλει τις CTPases RHO και οργανώνει την ακτίνη του κυτταροσκελετού σε ειδικές δομές που είναι γνωστές ως σωματίδια ακτίνης (actin bodies) [Laporte et al, 2011].

Το μονοπάτι RAS/PKA:

Το μονοπάτι της εξαρτώμενης από το cAMP πρωτεϊνικής κινάσης (protein kinase cAMP- dependent -PKA) είναι συντηρημένο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αν και η δομή της οδού δεν είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα, η οδός εμπλέκεται αμετάβλητα στην ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων και του οργανισμού. Όταν οι συγκεντρώσεις του cAMP είναι χαμηλές, η PKA είναι ανενεργή και υφίσταται ως τετραμερές αποτελούμενο από δύο καταλυτικές υπομονάδες και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Υπάρχουν τρία γονίδια που κωδικοποιούν τις τρεις μορφές της καταλυτικής υπομονάδας, τα trk1, trk2 και trk3. Η ρυθμιστική υπομονάδα κωδικοποιείται από το bcy1. Όταν η συγκέντρωση του cAMP είναι υψηλή, το νουκλεοτίδιο συνδέεται με τις ανασταλτικές ρυθμιστικές υπομονάδες, BCY1 και τις εμποδίζει να αλληλεπιδράσουν, ενεργοποιώντας ταυτόχρονα τις καταλυτικές υπομονάδες (εικόνα 1.15). Οι πρωτεΐνες TRK1, TRK2 και TKP3 έχουν διαφορετικές λειτουργίες [Gray et al, 2004; Conrad et al, 2013].

Το μονοπάτι της PKA δρα κυρίως αναστέλλοντας στην είσοδο στην στατική φάση. Μεταλλάγματα από τα οποία λείπει το cAMP, είναι ανίκανα να επιτελέσουν την διαδικασία του πολλαπλασιασμού και σταματούν την ανάπτυξή τους προσομοιάζοντας

την στατική φάση. Η ιδιοστατική ενεργοποίηση της PKA μέσω διαγραφής του *bey1*, έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο στην διαύξιμη μετατόπιση, αποδεικνύοντας ότι η καθοδική ρύθμιση του μονοπατιού της PKA είναι απαραίτητη για την επιτυχή έναρξη και πρόοδο στην μετα-διαύξιμη φάση [Gray et al, 2004; Conrad et al, 2013].



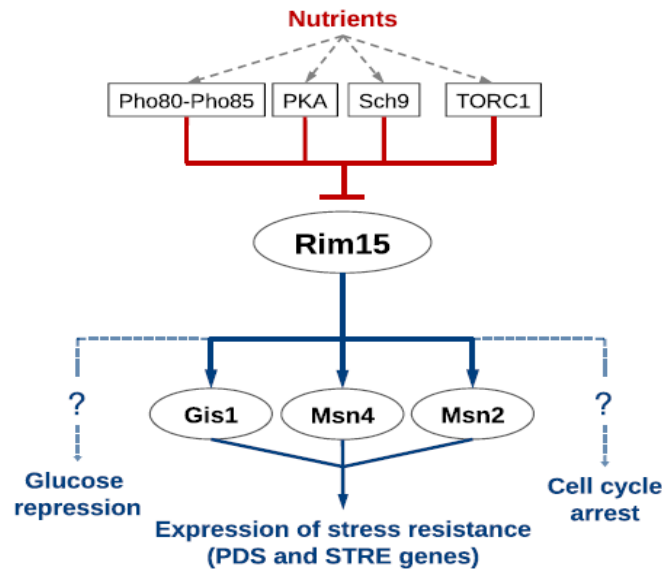
Εικόνα 1.16: Το μονοπάτι PKA στον ζυμομύκητα

Εκτός από τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην είσοδο στην στατική φάση το μονοπάτι PKA, απαιτείται και για την έξοδο από την στατική φάση. Η ενεργοποίηση του κατά την έξοδο από την στατική φάση γίνεται μέσω της πρωτεΐνης RAS. Ταυτόχρονα την δράση της PKA ελέγχει και το μονοπάτι TOR [Gray et al, 2004; Conrad et al, 2013].

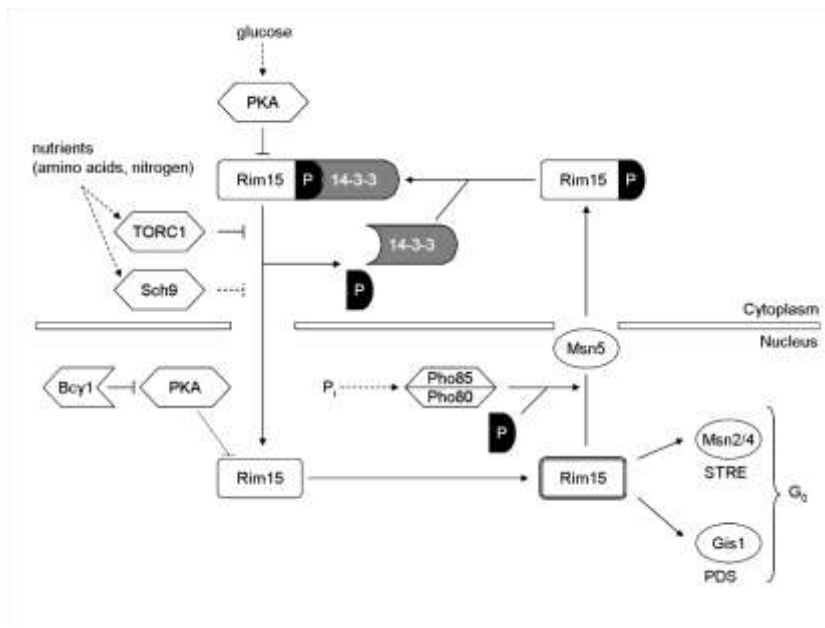
- **Το γονίδιο *rim15***

Το γονίδιο *rim15* κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr) RIM15, η οποία δέχεται σήματα από διάφορα δίκτυα σηματοδότησης, τα οποία αντιλαμβάνονται τα θρεπτικά συστατικά. Η ρυθμιστική δραστηριότητα και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης RIM15 εξαρτάται από την ανίχνευση των επιπέδων των θρεπτικών μέσω των μονοπατιών TOR, PKA και PHO, τα οποία αντιλαμβάνονται τα επίπεδα αζώτου, γλυκόζης και φωσφόρου, αντίστοιχα [Bisschops et al, 2014]. Το γονίδιο *rim15* χαρακτηρίστηκε αρχικά ως ρυθμιστής της έκφρασης μειωτικών γονιδίων, στην συνέχεια ανακαλύφθηκαν οι πλειοτροπικές δράσεις του γονιδίου και κυρίως ο ρόλος του στην είσοδο στην στατική φάση [Reinders et al, 1998; Pedruzzi et al, 2003].

Ένα βασικό μοντέλο λειτουργίας του RIM15 είναι η απόκριση στα περιβαλλοντικά στρες και η συντονισμένη έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο και η είσοδος στην στατική φάση. Το RIM15 αρχίζει ήδη να εκφράζεται κατά την διάρκεια της διαύξιμης φάσης, φαίνεται όμως να είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την επιβίωση κατά την επακόλουθη στατική φάση, στην οποία τα κύτταρα υποβάλλονται σε παρατεταμένη εξάντληση γλυκόζης. Υπό αυτές τις συνθήκες τα μονοπάτια PKA, TOR και PHO είναι ανενεργά, επιτρέποντας στο RIM15 να είναι ενεργό και να ενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες Gis1 και Msn2/4, οι οποίοι μεταγράφουν γονίδια που είναι απαραίτητα για την απόκριση στο στρες (εικόνα 1.16) [Bisschops *et al*, 2014]. Όταν η πρωτεΐνη RIM15 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα είναι ανεσταλμένη και φωσφορυλιωμένη από την PKA ή την TOR. Κατά την ενεργοποίησή της αποφωσφορυλιώνεται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες Gis1 και Msn2/4 (εικόνα 1.17). Δεδομένης της σημαντικότητας της πρωτεΐνης RIM15 για την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και την είσοδο στην στατική φάση είναι εξίσου σημαντική και η έκφραση του γονιδίου *rim15* που θα κωδικοποιήσει την πρωτεΐνη, και το οποίο αρχίζει κιόλας να εκφράζεται από την διαύξιμη μετατόπιση [Swinnen *et al*, 2006] .



Εικόνα 1.17: Τα μονοπάτια που ρυθμίζουν την λειτουργία του RIM15



Εικόνα 1.18: Η ρύθμιση του RIM15 από τα μονοπάτια της PKA και του TOR

- **Το γονίδιο *bcy1*:**

Το γονίδιο *bcy1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BCY1, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί την ρυθμιστική υπομονάδα της PKA. Πρόκειται για ένα γονίδιο που η έκφρασή του αυξάνεται κατά την στατική φάση, καθώς η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών σηματοδοτεί την αναστολή του μονοπατιού της PKA, μέσω της ενεργοποίησης της ρυθμιστικής υπομονάδας BCY1. Η διαγραφή του *bcy1*, έχει ως αποτέλεσμα την ιδιοστατική ενεργοποίηση της PKA, αυτή η αλλαγή προκαλεί τον θάνατο των κυττάρων στην διαύξιμη μετατόπιση. Επιπλέον κύτταρα τα οποία φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα για το *bcy1* με μεταλλάξεις στο C τελικό άκρο πεθαίνουν σε διαφορετικές στιγμές κατά την διάρκεια της μετα-διαύξιμης φάσης ή της στατικής φάσης, όταν δηλαδή αρχίζει η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών [Gray et al, 2004].

- **Τα γονίδια *ssa3*, *hsp26* και *hsp12*:**

Η έκφραση του γονιδίου *rim15* και, εν συνεχεία, η κωδικοποίηση της πρωτεΐνης RIM15 έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή και την έκφραση τριών γονιδίων που αποκρίνονται στο στρες (stress responsive genes), τα *ssa3*, *hsp26* και *hsp12*. Πρόκειται για γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες SSA3, HSP26 και HSP12, αντίστοιχα, και οι οποίες επιτελούν την λειτουργία μοριακών συνοδών για την απόκριση του κυττάρου στο στρες [Reinders et al, 1998]. Πιο συγκεκριμένα:

- ❖ **Το γονίδιο *ssa3*:** κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη SSA3, η οποία διαθέτει ενεργότητα ATPάσης και ανήκει στην πρωτεϊνική οικογένεια των HSP70. Συμμετέχει στην απόκριση στο στρες. Η πρωτεΐνη

του συμμετέχει στην SRP-εξαρτώμενη συμμεταφραστική στοχοθέτηση και μεταφορά πρωτεΐνης- μεμβράνης [Boorstein et al, 1990].

- ❖ **Το γονίδιο *hsp26*:** κωδικοποιεί την μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ, HSP26. Ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι να αναστέλλει την συσσωμάτωση των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Πρόκειται για μακρόβια πρωτεΐνη, η οποία κατά προτίμηση παραμένει στο μητρικό κύτταρο καθώς διαθέτει επικράτειες πρόσδεσης και με το mRNA [Ghosh et al, 2010].
- ❖ **Το γονίδιο *hsp12*:** κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HSP12, η οποία είναι πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης και συμμετέχει στην οργάνωσή της και ρυθμίζεται από τα μονοπάτια HOG1 και RAS/PKA [Varela et al, 1995].

Η ενεργοποίηση της RIM15, έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση των γονιδίων *ssa3*, *hsp26* και *hsp12*. Η διαγραφή του γονιδίου *rim15*, έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική αναστολή των γονιδίων αυτών [Reinders et al, 1998].

- **Το γονίδιο της πολύ-ουβικιτίνης, *ubi4***

Η ουβικιτινίωση είναι μια διαδικασία, μέσω της οποίας οι πρωτεΐνες και άλλα μόρια στοχοθετούνται με μόρια ουβικιτίνης και μεταφέρονται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Στον ζυμομύκητα υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν την ουβικιτίνη, τα *ubi1*, *ubi2* και *ubi3* και το γονίδιο *ubi4* που κωδικοποιεί την πολύ-ουβικιτίνη, UBI4 [Simon et al, 1999; Finley et al, 1987].

Η βασική λειτουργία της UBI4 είναι να παρέχει ουβικιτίνη στα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση στρες. Η μεταγραφή του γονιδίου *ubi4* στον *Saccharomyces cerevisiae* επάγεται έντονα από μία ποικιλία περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως το θερμικό σοκ, η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και η έκθεση σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA. Αυτή η μεταγραφική απόκριση του *ubi4* είναι πιθανό να είναι ο κύριος μηχανισμός για την αύξηση των αποθεμάτων ουβικιτίνης και της αποδόμησης του πρωτεϊνών του στρες που υπέστησαν βλάβη [Simon et al, 1999; Finley et al, 1987].

Επιπλέον η μεταγραφή του γονιδίου *ubi4* αυξάνεται κατά την έναρξη της στατικής φάσης, την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, κατά την διαδικασία της μειωτικής διαδικασίας και άμβλυση του οξειδωτικού στρες σε καλλιέργειες κυττάρων ζύμης. Στην πραγματικότητα έχει προταθεί ότι αυτή η παραγωγή ουβικιτίνης που επάγεται από το στρες και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ubi4*, διευκολύνει την αποικοδόμηση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών που συσσωρεύονται υπό συνθήκες στρες [Simon et al, 1999; Finley et al, 1987].

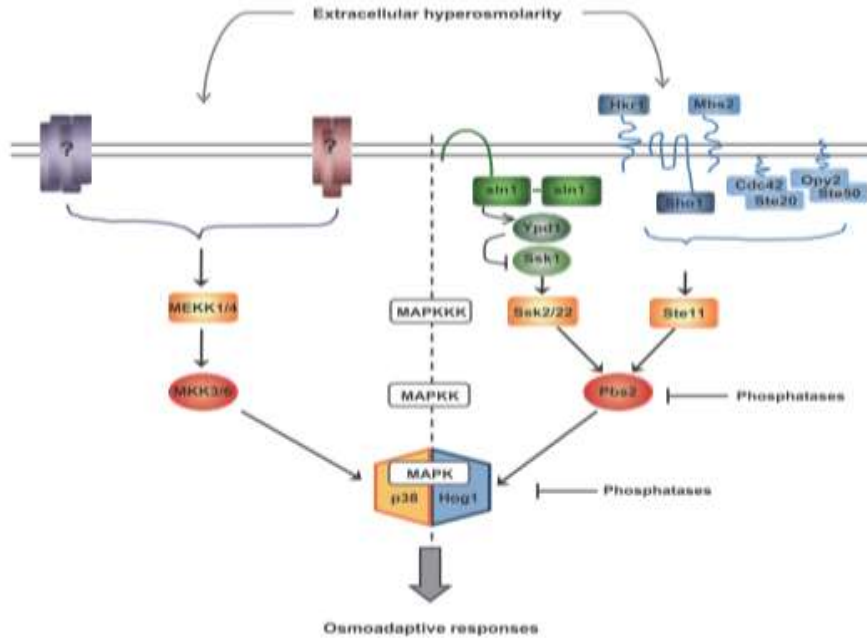
- **Το γονίδιο *snz1***

Το γονίδιο *snz1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SNZ1, η οποία ανήκει σε μια ιδιαίτερα συντηρημένη οικογένεια που συντίθενται κατά την είσοδο στην στατική φάση. Ρυθμίζεται ανοδικά από ένα άλλο γονίδιο, το *sno1*. Η έκφραση των *snz1/sno1* αυξάνεται κατά την μετα-διαύξιμη φάση. Η πρωτεΐνη του καταλύει τον σχηματισμό της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης, από την 5'-φωσφορική ριβόζη, την 3'-φωσφορική γλυκεαλδεΐδη και την αμμωνία, μια αντίδραση που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της βιταμίνης B6. Στην έκφραση των γονιδίων *snz1/sno1* εμπλέκονται οι κινάσες PHO καθώς στον υποκινητή των γονιδίων αυτών προσδένεται ο Pho4 με σκοπό να ρυθμίζει χρονικά την έκφραση των *snz1/sno1* έτσι ώστε να ρυθμίζονται την κατάλληλη χρονική στιγμή [Nishizawa et al, 2008; Braun et al, 1996; Rodriguez-Navarro et al, 2002; Padilla et al, 1998].

1.7 Το μονοπάτι HOG1

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μονοπατιών μεταγωγής σημάτων έχει ρόλο την προσαρμογή των κυττάρων στο οσμωτικό στρες. Τόσο στις ζύμες όσο και στα θηλαστικά υπάρχει μια συντηρημένη οικογένεια MAPKs, οι οποίες αποκρίνονται σε εξωκυττάρια περιβαλλοντικές αλλαγές μέσω των SAPKs (stress activated protein kinases). Οι SAPKs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ως απόκριση στα εξωκυττάρια ερεθίσματα που προκαλούν οσμωτικό στρες με στόχο την μεγιστοποίηση της επιβίωσης του κυττάρου. Η προσαρμοστική απόκριση όπου δημιουργείται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των SAPKs οδηγεί επιπλέον σε αλλαγές στην μετάφραση των πρωτεϊνών και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου [Duch et al, 2012].

Η απόκριση των κυττάρων στο οσμωτικό στρες οδηγεί σε γρήγορη και παροδική ενεργοποίηση των SAPKs. Κύριοι αντιπρόσωποι των SAPKs είναι η κινάση Hog1 στις ζύμες και η p38 στα θηλαστικά. Στις ζύμες το μονοπάτι Hog1 είναι ο βασικός διαμεσολαβητής της κυτταρικής προσαρμογής υπό οσμωτικό στρες και η καλύτερα χαρακτηρισμένη SAPK στους ευκαρυώτες. Το μονοπάτι Hog1 είναι ομόλογο του p38 [Duch et al, 2012].



Εικόνα 1.19 : Σύγκριση των μοριακών συστατικών των μονοπατιών Hog1 και p38

Δύο ανεξάρτητες υπομονάδες αισθητήρων πυροδοτούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού Hog1, ο Sln1 και ο Sho1. Κάθε υπομονάδα αισθητήρα είναι ικανή να πυροδοτήσει την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η υπομονάδα Sln1 σχετίζεται περισσότερο με τον έλεγχο και την υψηλότερη ευαισθησία στην γρήγορη απόκριση σε ευρύ φάσμα οσμωτικών αλλαγών. Ο πυρήνας του μονοπατιού αποτελείται από 3 MAPKs (Ssk2, Ssk22 και Ste11), οι οποίες ενεργοποιούν την Pds2 MAPK, η οποία στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Hog1 MAPK (εικόνα 1.18) [Duch et al, 2012].

Το ομόλογο μονοπάτι για τα θηλαστικά, p38, έχει ως κύριους ενεργοποιητές τις MEKK1/4 που ενεργοποιούν τις MKK3/6, οι οποίες ενεργοποιούν την p38. Αυτό το μονοπάτι ενεργοποιείται από πλήθος εξωτερικών ερεθισμάτων όπως κυτοκίνες, βλάβες στο DNA, οξειδωτικό και θερμικό στρες. Αντίθετα το μονοπάτι Hog1 ενεργοποιείται κυρίως από το οσμωτικό στρες και διαδραματίζει μικρό ρόλο στην απόκριση σε άλλες πηγές στρες (θερμότητα, οξείδωση, αποδιάταξη πρωτεϊνών). Παρά την διαφορά τους, τα δύο μονοπάτια ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, μέσω ελέγχου των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου [Duch et al, 2012].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρόοδος την φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τις κυκλίνες Cln1, Cln2 και Cln3, ενώ η είσοδος στην φάση S από τις κυκλίνες Clb5 και Clb6. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hog1 λόγω την έκθεσης του κυττάρου σε συνθήκες που επάγουν το οσμωτικό στρες, έχει ως αποτέλεσμα το παροδικό

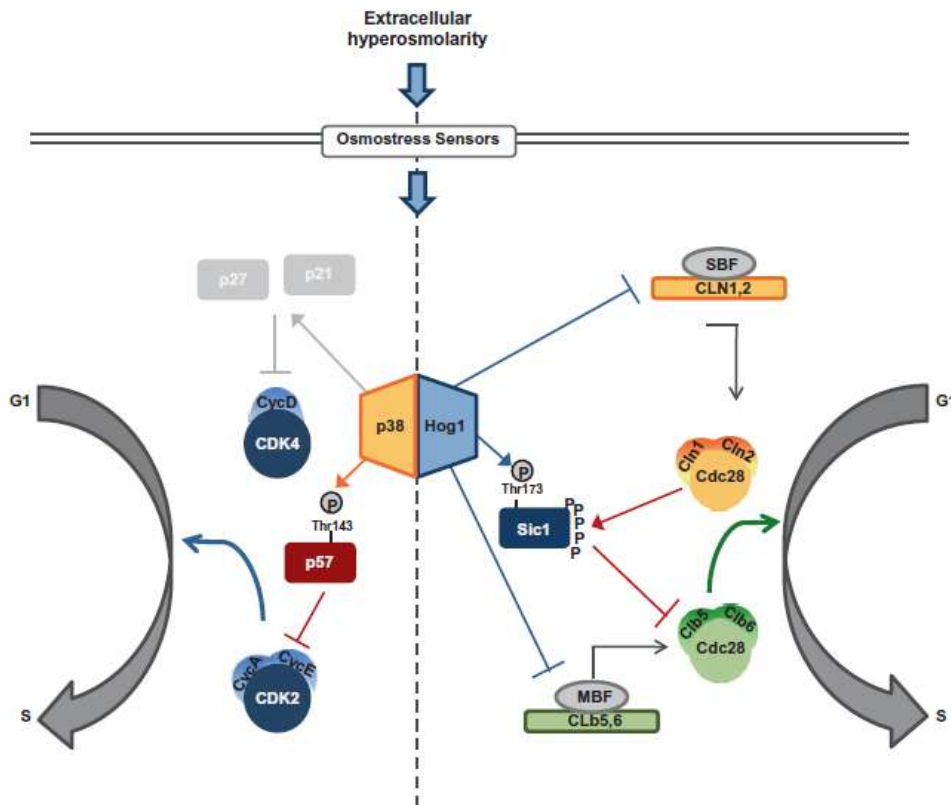
σταμάτημα στην φάση G1. Το σταμάτημα σε αυτή την φάση βοηθά στην σταθεροποίηση του αναστολέα Sic1. Η έκφραση του Sic1 πυροδοτείται όταν τα κύτταρα εξέρχονται από την μίτωση και κορυφώνεται σε πρώιμο στάδιο της φάσης G1 [*Duch et al*, 2012; *Mizunuma et al*, 2013].

Όταν τα κύτταρα διέρχονται από την φάση G1, η ενεργότητα του συμπλόκου Cln-cdc28 αυξάνεται και φωσφορυλιώνει την N-τελική επικράτεια του Sic, κάτι που την στοχοθετεί για ουβικιτινίωση από την cdc4 και αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Μόλις η Sic1 αποικοδομηθεί τα σύμπλοκα Clb5/6-Cdc28 ενεργοποιούνται και πυροδοτείται η αντιγραφή του DNA. Υπό οσμωτικό στρες, το Hog1 αλληλεπιδρά φυσικά με τον Sic1 και φωσφοφυλιώνει την θρεονίνη 173 του καρβοξυ-τελικού άκρου του Sic1. Αυτή η φωσφορυλίωση εμποδίζει την αλληλεπίδραση του Sic1 με την cdc4, μειώνοντας την αποικοδόμηση του και οδηγώντας σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G1 [*Duch et al*, 2012; *Mizunuma et al*, 2013].

Η σταθεροποίηση του Sic1 και το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 με τρόπο που εξαρτάται από το Hog1 είναι απαραίτητα για την προσαρμοστική απόκριση στο οσμωτικό στρες. Στην περίπτωση που από τα κύτταρα λείπει το Sic1 από τα κύτταρα ή υπάρχει κάποιο ελάττωμα στην θέση φωσφορυλίωσής του (θρεονίνη 173), μειώνεται η δυνατότητα επιβίωσης του κυττάρου σε συνθήκες οσμωτικού στρες [*Duch et al*, 2012].

Εκτός από την άμεση φωσφορυλίωση του Sic1, το Hog1 ρυθμίζει και την μετάβαση από την φάση G1 στην S, μέσω της καθοδικής ρύθμισης της έκφρασης των κυκλινών των φάσεων G1 και S (Cln1, Cln2 και Clb5 γονιδίων). Το Hog1 καταστέλλει την έκφραση των υποκινητών των SBF και MBF με τρόπο που παραμένει άγνωστος. Ο ρόλος κλειδί στην ρύθμιση αυτής της καταστολής του κυτταρικού κύκλου είναι η καθοδική ρύθμιση της κυκλίνης Clb5. Ενώ η καθοδική ρύθμιση των Cln1/2 ή η σταθεροποίηση του Sic1 φαίνεται να είναι σημαντική στην όψιμη G1 φάση (Εικόνα 1.19) [*Duch et al*, 2012].

Είναι λοιπόν εμφανής η αναγκαιότητα του αυστηρού ελέγχου της ρύθμισης του G1/S δικτύου από το Hog1 για την προσαρμογή σε περιπτώσεις οσμωτικού στρες. Η τριπλή στοχοθέτηση από το Hog1 (των Clns, Clb5 και Sic1) εξασφαλίζει παροδικό σταμάτημα στην φάση G1 σε οποιοδήποτε στάδιο την φάσης και αν βρίσκονται τα κύτταρα. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι το Hog1 μπορεί να ρυθμίζει την μετάβαση και στις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου [*Duch et al*, 2012].

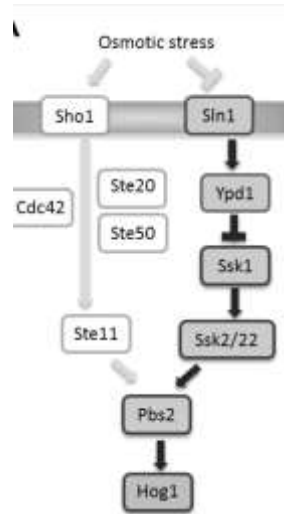


Εικόνα 1.20 : Ο ρυθμιστικός έλεγχος του Hog1 στην φάση G1

1.7.1 Ο ρόλος του Hog1 στην φάση G0

Εκτός από την επίδραση που έχει στις άλλες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, το Hog1 φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην έξοδο από την φάση G0. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα τα οποία στερούνται Hog1 καθυστερούν να εξέλθουν από την στατική φάση και να εισέλθουν και πάλι στον κυτταρικό κύκλο. Η καθυστέρηση αυτή δεν σχετίζεται με την έλλειψη βιωσιμότητας, κάτι που μαρτυρά πιθανή ρύθμιση της εξόδου από την φάση G0 από το Hog1. Επιπλέον παρατηρείται αλλαγή στην θέση αυτού του μορίου κατά την έξοδο από την φάση G0. Κατά την έξοδο το Hog1 ενεργοποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που είναι ανεξάρτητα από το στρες. Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η Hog1p MAPK ρυθμίζει την μετάβαση από την στατική φάση στον κυτταρικό κύκλο βοηθώντας τα κύτταρα να προσαρμόζονται κατά την μετάβαση στην εκάστοτε φάση του κυτταρικού κύκλου [Escote et al, 2011].

Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η κατά την εξάντληση της γλυκόζης το Hog1 συσσωρεύεται παροδικά στον πυρήνα με τρόπο ανεξάρτητο του οσμωτικού στρες, κάτι που είναι εμφανές από την κινητική και τον μηχανισμό ενεργοποίησης. Συγκεκριμένα το Hog1 ενεργοποιείται με αργό ρυθμό μόνο μέσω της Ssk1, παρακάμπτοντας την Sho1. Επιπλέον, ενώ κατά την εκθετική ανάπτυξη ή κατά το οσμωτικό στρες η Ssk1 αποικοδομείται γρήγορα, ενώ στην στατική φάση παραμένει σε σταθερά επίπεδα (εικόνα 1.20) [Vallejo *et al*, 2015].



Εικόνα 1.21: Η ενεργοποίηση του Hog1 από την Ssk1, κατά την εξάντληση της γλυκόζης

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη και η αποσαφήνιση του ρόλου των μονοπατιών TOR και HOG1 στην είσοδο και εν συνεχεία στην έξοδο από τη στατική φάση. Για την επίτευξη αυτού του στόχου έγινε χρήση μιας μεθοδολογίας εμπλουτισμού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0 (κλασμάτωση *Percoll*) από καλλιέργειες μύκητα σε συνθήκες εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών. Στα κύτταρα της φάσης G0 έγινε μορφολογική ανάλυση με μικροσκοπία φθορισμού για τον έλεγχο του κυτταρικού τοιχώματος και της κατάστασης της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Στην συνέχεια τα κύτταρα αυτά εμβολιάζονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο, όπου και πάλι ελέγχονται οι μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν. Για τις συνθήκες αναστολής των μονοπατιών HOG1 και TOR χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί χημικοί αναστολείς τους και μεταλλαγμένα στελέχη, στα οποία έχουν διαγραφεί τα γονίδια *rim15*, *hog1* και *pbs2*. Παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές τόσο στο κυτταρικό τοίχωμα, όσο και στην οργάνωση της ακτίνης κατά την αναστολή των δύο μονοπατιών. Επιπροσθέτως σε η είσοδος και η έξοδος από την στατική φάση έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση ή και την αναστολή της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων, μια κατάσταση που μεταβάλλεται με αναστολή των δύο μονοπατιών.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Επιλογή στελεχών

Για τα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκε το απλοειδές μεταλλαγμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, BY4742 (MAT α ;ura3 Δ 0;leu2 Δ 0;his3 Δ 1;lys2 Δ 0). Το στέλεχος αυτό προέρχεται από το πατρικό στέλεχος S288C, το οποίο προέρχεται από την εταιρία EUROSCARF, Φρανκφούρτη, Γερμανία.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη *hog1 Δ* , *rim15 Δ* και *hog4 Δ* , τα οποία μας παραχωρήθηκαν από εργαστήριο της κας Αλεξανδράκη Δέσποινας του Ινστιτούτου Μοριακή Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας της Κρήτης. Στα μεταλλαγμένα στελέχη έχουν διαγραφεί τα γονίδια *hog1*, *rim15* και *hog4*, αντίστοιχα, τα οποία κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες.

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά Μεταλλαγμένων Στελεχών

Στέλεχος	Συστημα- τική ονομασία	Γονότυπος	Χρωμόσωμα
<i>hog4Δ</i>	YJL128c	BY4742;MAT α ;ura3 Δ 0;leu2 Δ 0;his3 Δ 1;lys2 Δ 0;YJL128c::kanMX4	10
<i>hog1Δ</i>	YLR113w	BY4742;MAT α ;ura3 Δ 0;leu2 Δ 0;his3 Δ 1;lys2 Δ 0;YLR113w::kanMX4	12
<i>rim15Δ</i>	YFL033c	BY4742;MAT α ;ura3 Δ 0;leu2 Δ 0;his3 Δ 1;lys2 Δ 0;YFL033c::kanMX4	06

3.2 Θρεπτικά μέσα, αντιβιοτικά και αναστολείς

Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο YPD (Yeast-
Peptone-Dextrose). Η σύσταση αυτού του μέσου είναι: 1% γλυκόζη, 0,5% πεπτόνη, 0,3 % εκχύλισμα ζύμης και 0,3% εκχύλισμα μαλτόζης. Για την ανάπτυξη κυττάρων σε στέρεο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε η ίδια σύσταση με την προσθήκη 2% αγαρ. Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται στους 121°C για 15 λεπτά.

Η προσθήκη αντιβιοτικών γίνεται κατόπιν της αποστείρωσης του θρεπτικού, όταν η θερμοκρασία του φτάσει περίπου στους 48-50°C, ώστε να προστατευτεί η δομή τους. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Αμπικιλίνη σε συγκέντρωση ????? και η ραπαμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1 μ g/ml και ο αναστολέας Birb796 σε τελική συγκέντρωση. Τα αντιβιοτικά αυτά δρουν ως εξής:

- Αμπικιλίνη: η αμπικιλίνη ανήκει στα αντιβιοτικά β -λακτάμης και συγκεκριμένα στην ομάδα της πενικιλίνης και είναι μέλος της οικογένειας της αμινοπενικιλίνης. Είναι περίπου ισοδύναμη με την αμοξικιλίνη όσο αφορά την ενεργότητα. Η αμπικιλίνη δρα ως ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας του

ενζύμου τρανσπεπτιδάσης, το οποίο απαιτείται από τα βακτήρια για την σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Έχει βακτηριολυτική δράση, καθώς αναστέλλει το τρίτο και τελευταίο στάδιο σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος, προκαλώντας λύση του κυττάρου.

- Ραπαμυκίνη: (διαλυμένη σε DMSO) η ραπαμυκίνη αναστέλλει το μονοπάτι TOR μέσω την αλληλεπίδρασης με την FRB περιοχή της κινάσης TOR.
- Birb796: πρόκειται για έναν αναστολέα των SAPK3/p38α, ο οποίος στην p38α με τρόπο που ανταγωνίζεται την σύνδεση του ATP

3.3 Καλλιέργεια κυττάρων με στόχο την είσοδό τους στην στατική φάση

Τα κύτταρα μιας καλλιέργειας ζυμομύκητα μπορούν να εισέλθουν φυσιολογικά στην στατική φάση ανάπτυξης με την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και κυρίως της πηγής άνθρακα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ανάπτυξης κυττάρων σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για 7 ημέρες στους 30°C υπό ανάδευση στις 250rpm.

3.4 Κλασμάτωση κυτταρικών εκχυλισμάτων με την μέθοδο Percoll

Το διάλυμα Percoll χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό σωματιδίων, όπως κύτταρα, οργανίδια και ιοί, με βάση την πυκνότητα. Τα σωματίδια διαχωρίζονται βάσει της πυκνότητάς τους μέσω φυγοκέντρωσης. Το Percoll αποτελείται από κολλοειδή σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου με διάμετρο 15-30 nm (23% w/w σε H₂O) που είναι κεκαλυμμένα με πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP). Η καταλληλότητα αυτού του διαλύματος για πειράματα διαβάθμισης πυκνότητας έγκειται στο γεγονός ότι διαθέτει χαμηλό ιξώδες, χαμηλή οσμωτικότητα και μηδενική τοξικότητα για ρι κύτταρα και τα συστατικά τους.

Για την κλασμάτωση κυτταρικών εκχυλισμάτων με την χρήση του διαλύματος Percoll ακολουθείται η παρακάτω σειρά βημάτων:

1. Αραίωση 9:1 (vol/vol) του πυκνού Percoll με NaCl, ώστε η συγκέντρωση του NaCl να γίνει 167mM από 1,5M.
2. Για να δημιουργηθεί το κλάσμα του Percoll, 10ml από το αραιωμένο διάλυμα εισάγεται σε σωληνάκι Corax, χωρητικότητας 15ml, και φυγοκεντρούνται στις 13,800 rpm (19,240g) για 15 min στους 20°C σε κεφαλή σταθερής γωνίας (fixed angle rotor), με απενεργοποιημένο φρένο.
3. Περίπου 2×10^9 κύτταρα (200OD₆₀₀) φυγοκεντρούνται για 10 min στις 2,000rpm, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναωφείται σε 1ml Tris buffer.

4. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται στο διαβαθμισμένο διάλυμα Percoll. Η ποσότητα των κυττάρων σε κάθε κλάσμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5×10^8 κύτταρα, ώστε να επιτυγχάνεται καλός διαχωρισμός των κλασμάτων.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400g σε φυγόκεντρο που διαθέτει οριζόντια κεφαλή (swinging bucket rotor) για 60 min στους 20°C.
6. Τα κλάσματα συλλέγονται, με την βοήθεια πιπέτας paster και διαχωρίζονται από το διάλυμα του Percoll μέσω πλύσεων με φυσιολογικό ορό (5 όγκους φυσιολογικού ορού σε 1 όγκο κυτταρικού αιωρήματος). Η έκπλυση επαναλαμβάνεται 2 με 3 φορές και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από κάθε πλύση με φυγοκέντρηση στα 200g για 10min.
7. Το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80°C ώστε να απομονωθεί πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Ή εναλλακτικά στους 4°C (όχι για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό των 24 ωρών) ώστε να γίνει χρώση ή εμβολιασμός τους σε καλλιέργεια ανάκαμψης.

Tris buffer: 0,2M Tris-HCl pH7,5

3.5 Σήμανση του κυτταρικού τοιχώματος με την χρωστική concanavallin A

Η concanavallin Αείναι μια πρωτεΐνη που προέρχεται από το φυτό *Canavalia ensiformis* (φασόλι) και αποτελείται από διακλαδισμένες δομές πολυσακχαριτών και μπορεί να προσδένεται σε πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται λεκτίνες. Οι λεκτίνες εντοπίζονται ως επί τω πλείστον στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων.

Για την σήμανση του κυτταρικού τοιχώματος χρησιμοποιήθηκε το προϊόν ConcanavallinA (ConA) FITC Labeled (C 7642) από την εταιρεία Sigma. Η χρώση έγινε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Συλλογή 5×10^7 κύτταρων από την καλλιέργεια. Φυγοκέντρηση και πλύση με 1 ml solution D
2. Φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε 750 μl solution D όπου έχουν προστεθεί 50 μl conA από 1 mg/ml πυκνού διαλύματος conA (δηλ. 700 μl solution D και 50 μl conA). Επώαση στο σκοτάδι για 30 min με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου
3. Φυγοκέντρηση στα 500g για 5min και πλύση με 1 ml φυσιολογικό ορό.
4. Τα σημασμένα κύτταρα εναποτίθενται σε κυκλικές καλυπτρίδες (slides).

Προετοιμασία καλυπτρίδων: προσθήκη 100μl Alcian Blue. Επώαση για 1 ώρα και πλύση με νερό. Προσθήκη κυτταρικού αιωρήματος

SolutionD: 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7,2 στο οποίο προστίθεται NaCl σε τελική συγκέντρωση 150μM

Για την απεικόνιση στο μικροσκόπιο η σταθεροποίηση των slides γίνεται σε αντικειμενοφόρο με την χρήση διαλύματος mounting.

3.6 Σήμανση του κυτταρικού σκελετού με την χρωστική phalloidin

Η phalloidin είναι μια τοξίνη που προέρχεται από την *Amanita phalloides*. Δεσμεύεται με τα πολυμερή F- ακτίνης, σταθεροποιώντας την. Έτσι, μέσω αυτής της χρώσης είναι εύκολο να έχουμε εικόνα των περιοχών που είναι πλούσιες σε F- ακτίνη

Για την σήμανση του κυτταρικού σκελετού με την χρωστική phalloidin ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Σε 50ml καλλιέργειας προστίθενται 6ml φορμαλδεΰδη 37%. Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Φυγοκέντρηση στα 500g για 5min και πλύση με 1ml PBS
3. Επανάληψη πλύσης
4. Φυγοκέντρηση στα 500g για 5min και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1ml 0,2% Triton X-100σε SHA buffer. Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου
5. Φυγοκέντρηση στα 500g για 5min και πλύση με 1ml PBS
6. Επανάληψη πλύσης για δύο φορές
7. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 50μl phalloidin, η οποία έχει αραιωθεί 1:100 σε PBS. (phalloidin stock: 200 U/ml). Επώαση στο σκοτάδι για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
8. Πλύση με 0,5ml PBS
9. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 50μl PBSκαι τοποθέτηση στα slides. Επώαση overnight στους 4°C

Για την απεικόνιση στο μικροσκόπιο η σταθεροποίηση των slides γίνεται σε αντικειμενοφόρο με την χρήση διαλύματος mounting.

3.7 Χρώση του πυρήνα με DAPI

Το DAPI ή αλλιώς 4,6 διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη είναι μια φθορίζουσα ουσία, η οποία προσδένεται ισχυρά στις πλούσιες σε A-T περιοχές του DNA. Το DAPI μπορεί να διαπερνά τις μεμβράνες τόσο σε ζωντανά όσο και σε μονιμοποιημένα κύτταρα.

Σε ζωντανά ή μονιμοποιημένα κύτταρα τα οποία έχουν τοποθετηθεί σε slides ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Αναρρόφηση του υγρού και προσθήκη 50μl DAPI, το οποίο είναι αραιωμένο 1:1000 σε PBS
2. Πλύση με 100μl PBS
3. Επανάληψη πλύση

Για την απεικόνιση στο μικροσκόπιο η σταθεροποίηση των slides γίνεται σε αντικειμενοφόρο με την χρήση διαλύματος mounting.

3.8 Πειράματα συνδυαστικών χρώσεων

Οι τρεις παραπάνω χρώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με την εξής σειρά:

1. Χρώση κυτταρικού τοιχώματος με ConA, μιας και αυτή η χρωστική σημαίνει ζωντανά κύτταρα
2. Χρώση του κυτταρικού σκελετού με phalloidin, εφόσον γίνει η μονιμοποίηση με φορμαλδεύδη
3. Τέλος, η σήμανση του πυρήνα με DAPI

Για την απεικόνιση στο μικροσκόπιο η σταθεροποίηση των slides γίνεται σε αντικειμενοφόρο με την χρήση διαλύματος mounting.

3.9 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

1. Συλλογή $1,2 \times 10^8$ κυττάρων, απευθείας από την καλλιέργεια.
2. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 13.000g για 2min και φυλάσσεται το ίζημα
3. Πλύση με 1ml H₂O
4. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 100μl H₂O
5. Προσθήκη 100μl NaOH 0,2M
6. Επάωση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
7. Φυγοκέντρηση για 1min και φυλάσσεται το ίζημα
8. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 50μl protein loading buffer 1x
9. Φυγακέντρηση για 3min και φυλάσσεται το υπερκείμενο

Σε αυτό το στάδιο το εκχύλισμα των πρωτεϊνών μπορεί να διατηρηθεί στους -80°C. Ως protein loading buffer χρησιμοποιείται το Laemli Buffer χωρίς όμως αυτό να περιέχει κυανό της βρωμοφαινόλης, ώστε να γίνει εύκολα η ποσοτικοποίηση κατά Bradford.

Laemli Buffer 4x: 1M Tris, pH 6,8, 100% glycerol, 10 % SDS, 4,2 β-ME

3.10 Προσδιορισμός ποσότητας πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν προσδένεται σε πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης απορρόφησης στα 595nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του πρότυπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 2,5 ml διαλύματος Bradfordαραιωμένο 1:5 (0,25mg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60sec και ακολουθεί φωτομέτρηση.
2. Ποσότητα έως 40 μl δείγματος επαναδιαλύεται σε 2,5ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60 sec και φωτομετρείται στα 595nm

3.11 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος. Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

1. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης
2. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
3. Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα
4. Ανίχνευση πρωτεϊνών

3.11.1 Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης

Οι περισσότερες ηλεκτροφορητικές μέθοδοι διαχωρισμού των πρωτεϊνών γίνονται μέσω πηκτών πολυακρυλαμίδης. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης θα πρέπει να διασφαλίζουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες και τον ταυτόχρονο μη σχηματισμό συσσωματωμάτων.

Συνήθως ως αποδιατακτικό μέσο, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιοντικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία πριν την φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Επιπλέον προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στο δείγμα αποτρέπει τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπίδια προσδένονται στο SDS και φορτίζονται αρνητικά, η πρόσδεση αυτή είναι σχεδόν ανάλογη του μοριακού βάρους του πολυπεπτιδίου και ανεξάρτητο της αλληλουχία του.

Τα σύμπλοκα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στην πηκτή με βάση το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των πολυπεπτιδίων χρησιμοποιούνται ειδικοί μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών. Την εκτίμηση του μοριακού βάρους μπορούν να αλλοιώσουν μετατροπές του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως για παράδειγμα γλυκοζυλιώσεις που μεταβάλλουν το μοριακό βάρος.

Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο το ρυθμιστικό διάλυμα στην δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιοντική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της πηκτής. Τα σύμπλοκα SDS- πολυπεπτιδίου, όντας αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Οι πρωτεΐνες διέρχονται αρχικά διαμέσου μιας πορώδους πηκτής επιστοιβάξης (stacking gel) και στην συνέχεια κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού (separating gel).

Τα ιόντα χλωρίου που υπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στην πηκτή επιστοιβάξης σχηματίζουν ένα προπορευόμενο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ το προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη, υπάρχει μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπίδια στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH της πηκτής ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στην πηκτή διαχωρισμού ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Ελεύθερα από τον κινούμενο οροθετικό δείκτη, το σύμπλοκα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στην πηκτή διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) κατά την Παρασκευή των πηκτών επιτυγχάνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οι οποίες παρέχονται από το APS (Υπερθειϊκό αμμώνιο). Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηκτών εξαρτάται από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

1. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης στήνεται κατάλληλα (Mini-PROTEAN®II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθετείται στην ειδική δεξαμενή
2. Η δεξαμενή γεμίζεται με 1L περίπου 1x SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών
3. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρηση τους σε διάλυμα 1x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης, βράσιμο στους 90°C για 5 λεπτά και φόρτωσή τους στην πηκτή
4. Φορτώνεται επίσης μάρτυρας για τον μετέπειτα κατά προσέγγιση υπολογισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών
5. Η δεξαμενή καλύπτεται και η διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος την πηκτή.

Πίνακας 3.2: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδης διαχωρισμού

Συστατικά πηκτής διαχωρισμού	6%	8%	10%	12%	15%
ddH ₂ O	5.3ml	4.6ml	4ml	3.3ml	2.3ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
10% SDS	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
30% acrylamide mix	2ml	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml
10% ammonium persulfate (APS)	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
TEMED	0.008ml	0.006ml	0.004ml	0.004ml	0.004ml
Τελικός όγκος	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml

Πίνακας 3.3: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδης επιστοιβαξης

Συστατικά πηκτής επιστοιβαξης	5%
ddH ₂ O	2.7ml
1 M Tris pH 6.8	0.5ml
10% SDS	0.04ml
30% acrylamide mix	0.67ml
10% ammonium persulfate (APS)	0.04ml
TEMED	0.004ml
Τελικός όγκος	4ml

Διαλύματα:

1x διάλυμα φόρτωσης (Laemli Buffer):	250 mM Tris pH 6.8
	25% glycerol
	2.5% SDS
	1% β- ME
10xδιάλυμαηλεκτροφόρησης (1L):	30gr Tris base
	144gr Glycine
	10gr SDS

3.11.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Όταν η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής, η ηλεκτροφόρηση σταματά. Στην συνέχεια ακολουθήσει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο νερό
2. 4 χαρτιά Whatman διαβρέχονται με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)
3. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποσυναρμολογείται και η πηκτή μεταφέρεται σε διηθητικό χαρτί Whatman 3mm
4. Τοποθετούνται στην ειδικά κασέτα της συσκευής υγρής μεταφοράς (wet transfer) από κάτω προς τα πάνω: fiber pad, 2 χαρτιά Whatman εμποτισμένα με διάλυμα μεταφοράς, πηκτή διαχωρισμού, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 2 χαρτιά Whatman εμποτισμένα με διάλυμα μεταφοράς, fiber pad (Εικόνα 3.1).
5. Τοποθετώ την κασέτα στην συσκευή μεταφοράς και γεμίζω με διάλυμα μεταφοράς την συσκευή
6. Ρυθμίζω την συσκευή να τρέχει στα 200mA στους 4°C για:
 - 1 ώρα και 30 λεπτά, όταν οι πρωτεΐνες που θέλω να εντοπίσω είναι <55kDa
 - 2 ώρες, όταν οι πρωτεΐνες που θέλω να εντοπίσω είναι >55kDa
 - 3 ώρες και 30 λεπτά, όταν οι πρωτεΐνες που θέλω να εντοπίσω είναι >200kDa

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer):(1x-1L)

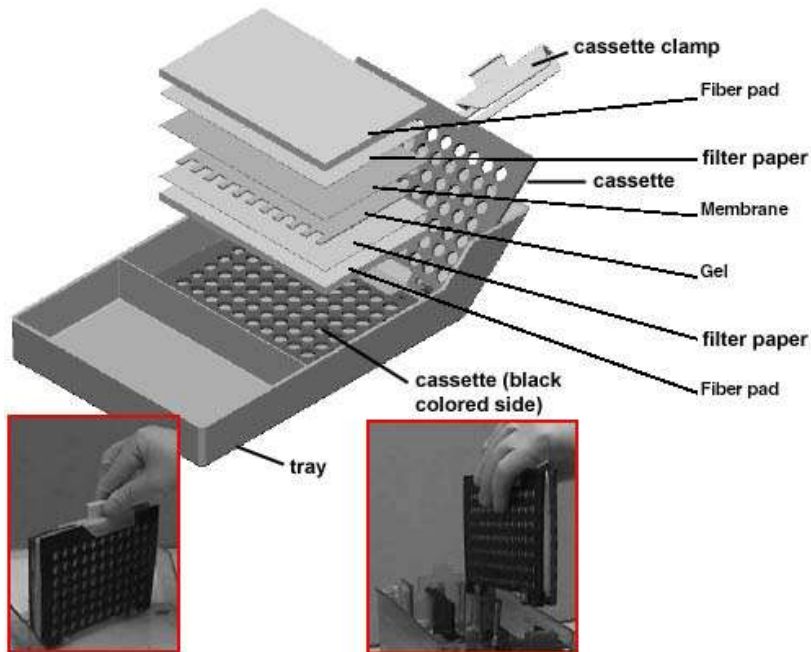
11,16gr Glycine

2,43gr TrisBase

200ml methanol

800ml H₂O

Το διάλυμα μεταφοράς θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 4°C, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί



Εικόνα 3.1: Διάταξη συσκευής ηλεκτρομεταφοράς

3.11.3 Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη επωάζεται με τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες που θέλουμε να εντοπίσουμε. Η διαδικασία ακολουθείται από τα παρακάτω βήματα:

1. Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα γάλακτος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει όλες τις ειδικές θέσεις δεσμεύσεις των αντισωμάτων αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο αυτές στις οποίες βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
2. Επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα overnight στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση.
3. Ακολουθούν 4 πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα γάλακτος
4. Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου
5. Ακολουθούν 4 πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα γάλακτος
6. Η μεμβράνη ξεπλένεται με 1x PBS

Διάλυμα γάλακτος (500ml):

25 gr σκόνη γάλακτος

475ml PBS 1x

1ml Tween 20 50%

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται με την μέθοδο χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το kit: Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate της εταιρίας Thermo Scientific. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης με 700μιαπό το κάθε διάλυμα εμφάνισης του kit για 1 λεπτό, μακριά από το φώς.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα σε κασέτα εμφάνισης.
3. Μετάβαση στο σκοτεινό θάλαμο και τοποθέτηση ενός φωτογραφικού φιλμ πάνω στην μεμβράνη για 1-15 λεπτά.
4. Εμφάνιση του φιλμ σε ειδικό μηχάνημα.
5. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η μεμβράνη στεγνώνεται και διατηρείται σε σκοτεινό μέρος.

3.12 Απομόνωση RNA

1. Συλλογή $2,5 \times 10^7$ κυττάρων και φυγοκέντρηση
2. Επαναιώρηση του υπερκειμένου σε 400μl διαλύματος AE (AE Buffer)
3. Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο του 1,5ml και προσθήκη 40μl 10% SDS και 20μl zymolyase. Vortex
4. Προσθήκη ίσου όγκου (460μl) όξινης φαινόλης.
5. Μεταφορά σε σωληνάριο του 1.5 ml που περιέχει κεραμικά σφαιρίδια διαμέτρου 2,8mm
6. Ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή Precellys 24 (Bertin technologies): 6000rpm-2φορές x30sec-10sec break
7. Μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλο σωληνάριο και επώαση για 4min στους 65°C
8. Μεταφορά του σωληναρίου σε dry ice/ ethanol bath
9. Vortex
10. Φυγοκέντρηση: στα 12.000g, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
11. Μεταφορά της υγρής φάσης σε νέο σωληνάριο και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αφυδρογονάσης σε αναλογία 25/24/1
12. Vortex

13. Φυγοκέντρηση: στα 12.000g, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
14. Μεταφορά της υγρής φάσης σε νέο σωληνάριο και προσθήκη ίσου όγκου Na acetate (3M, pH 5.3) και 2,5 όγκους αιθανόλη 95% (η οποία είναι παγωμένη στους -20° C)
15. Επώαση στους -20° C για 20min
16. Φυγοκέντρηση: στα 7.500g, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
17. Αποχύνω το υπερκείμενο και πλένω το ίζημα με 80% αιθανόλη
18. Αφήνω να στεγνώσει για περίπου 15min
19. Επαναιωρώ σε 20μl H₂O

AE Buffer: 50mM Na acetate pH5.3

10mM EDTA

Zymolyase (L2524-Sigma): το ένζυμο βίσκεται σε λυοφιλιωμένη μορφή και διαλύεται σε 1,2M sorbitol, 10mM CaCl₂, 0,1M TrisHCl pH 7,5, 35mM β- MeOH)

Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν σωληνάκια και H₂O απαλλαγμένα από RNAασες (RNase free).

3.13 Καθαρισμός του απομονωμένου RNA από γενωμικό DNA

Για την αποικοδόμηση του γενωμικού DNA που είναι πιθανόν να έχει παραμείνει κατά την απομόνωση του RNA, τα δείγματα υφίστανται κατεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Ο κύρια λειτουργία της DNase είναι η κατάλυση της διάσπασης των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Για τον καθαρισμό του RNA χρησιμοποιήθηκε το RQ1 RNase-Free DNase kit της εταιρείας Promega και ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Ανάμιξη των συστατικών της αντίδρασης:

Αντιδραστήριο:

RNA

Ρυθμιστικό διάλυμα της DNase, 10x (απαλλαγμένο από RNAses)

DNase (απαλλαγμένη από RNAses)

dH₂O (απαλλαγμένο από RNAses)

Τελικός όγκος

Όγκος:

1-8μl (500ng)

1μl

1μl

0-7μl

10μl

2. Επώαση της αντίδρασης στους 37° C για 30min. Η συνθήκη αυτή ενεργοποιεί και επιτρέπει στο ένζυμο να δράσει
3. Προσθήκη 1μl διαλύματος STOR, το οποίο απενεργοποιεί την δράση του ενζύμου.
4. Την απενεργοποίηση του ενζύμου ακολουθεί η επώαση της αντίδρασης στους 65°C για 10min, συνθήκη απαραίτητη για την δράση του διαλύματος STOP

5. Αποθήκευση του RNA προσωρινά στους -20°C ή απευθείας μετατροπή σε cDNA

3.14 Δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Για την δημιουργία του cDNA χρησιμοποιείται το RR037A kit της εταιρείας TAKARA:

1. Ανάμιξη των συστατικών της αντίδρασης

Αντιδραστήριο:

dH₂O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες)

Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) 5x

Oligo-dT (50mM)

Αντίστροφη μεταγραφάση (RT)

RNA (DNase treated)

Τελικός όγκος

Όγκος:

2μl

2μl

0,5μl (25pmol)

0,5μl

5μl

10μl

2. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 15min και ακολουθεί η απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85°C για 5min
3. Το cDNA φυλάσσεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί

Όλες οι αντιδράσεις έχουν και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου, στο οποίο δεν έχει προστεθεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (-RT), η ύπαρξη αυτού του επιπλέον δείγματος μας επιτρέπει να ελέγξουμε την ύπαρξη τυχόν χρωμοσωμικού DNA στο RNA, καθώς θα φανεί και σε αυτό προϊόν μετά την αντίδραση PCR.

3.15 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR):

Η PCR ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που στόχο έχει την ενίσχυση ενός ή μερικών αντιγράφων ενός τμήματος DNA, δημιουργώντας από χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Η τεχνική της PCR βρίσκει εφαρμογή σε περιπτώσεις όπως: κλωνοποίηση DNA για αλληλούχιση, λειτουργική ανάλυση γονιδίων, έλεγχος για ύπαρξη κληρονομούμενων ασθενειών, αναγνώριση γενετικών αποτυπωμάτων που χρησιμοποιούνται στην εγκληματολογία και την ιατροδικαστική, ανίχνευση λοιμωδών νοσημάτων, έλεγχος πατρότητας κ.α.

Τα βασικά συστατικά της αντίδρασης είναι:

- **DNA μήτρα (template):** είναι το DNA του οποίου την αλληλουχία θέλουμε να ενισχύσουμε
- **Εκκινητές (primers):** οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα DNA μεγέθους περίπου 15-20 bp, και οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς ένα τμήμα της αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Οι δύο εκκινητές είναι συμπληρωματικές προς τα 3' άκρα για κάθε κωδική και μη κωδική αλυσίδα του DNA στόχου.

- **DNA Πολυμεράση:** η πολυμεράση πρέπει να είναι θερμοανθεκτική, συνήθως είναι η Taq πολυμεράση ή οποιαδήποτε DNA πολυμεράση την οποίας η βέλτιστη θερμοκρασία είναι περίπου 70°C.
- **Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs):** τα δομικά συστατικά από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο μόριο DNA
- **Ρυθμιστικό διάλυμα:** το διάλυμα αυτό παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον ώστε η πολυμεράση να δρα με βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα
- **Δισθενή κατιόντα:** μαγνήσιο (Mg^{2+}) ή μαγγάνιο (Mn^{2+}), κυρίως χρησιμοποιείται το Mg^{2+} γιατί οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Mn^{2+} αυξάνουν το ποσοστό σφαλμάτων κατά την σύνθεση του DNA. Τα δισθενή κατιόντα απαιτούνται και αυτά για την δραστηριότητα της πολυμεράσης, πολλές φορές εμπεριέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα. Χωρίς την ύπαρξη του Mg^{2+} η πολυμεράση δεν αναγνωρίζει τα dNTPs ως υπόστρωμα. Το Mg^{2+} είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων στο πλαίσιο της επιμήκυνσης του DNA.

Η μέθοδος της PCR βασίζεται σε θερμική κυκλοποίηση, που αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους θέρμανσης και ψύξης, ώστε να είναι δυνατή η τήξη του DNA και η ενζυμική αντιγραφή του DNA. Οι εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς την περιοχή-στόχο και μαζί με την DNA πολυμεράση, είναι τα βασικά συστατικά για να επιτραπεί η επιλεκτική και επαναλαμβανόμενη ενίσχυση. Όπως προχωρεί PCR, το DNA που παράγεται είναι το ίδιο που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για αντιγραφή, θέτοντας σε κίνηση μια αλυσιδωτή αντίδραση στην οποία το μήτρα DNA ενισχύεται εκθετικά [Bartlett *et al*, 2003; Saiki *et al*, 1988; Pavlov *et al*, 2004] .

Τα βήματα κατά την θερμοκυκλοποίηση είναι τα εξής:

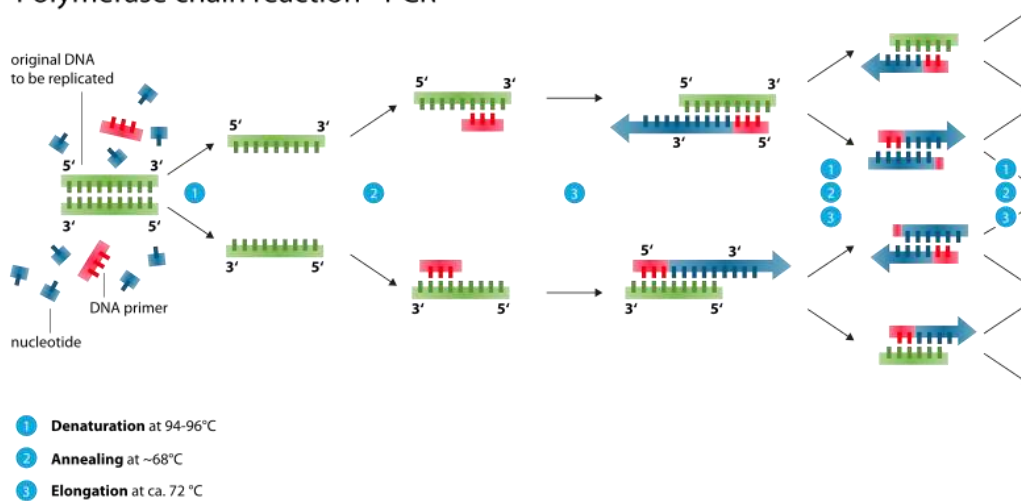
- **Έναρξη (initialization step):** είναι βήμα απαραίτητο για την ενεργοποίηση μιας πολυμεράσης που λειτουργεί σε υψηλές θερμοκρασίες και απαιτεί συγκεκριμένη θερμοκρασία εκκίνησης και γίνεται μια φορά κατά την έναρξη της αντίδρασης. Στο στάδιο αυτό συνίσταται θέρμανση της αντίδρασης σε μία θερμοκρασία 94-96° C, η οποία πραγματοποιείται για 1-9 λεπτά.
- **Μετουσίωση (denaturation step):** είναι το πρώτο βήμα κάθε κύκλου, η θερμοκρασία βρίσκεται στους 94-98° C για 20-30 δευτερόλεπτα. Κατά το στάδιο αυτό αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA και σπάζουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του, και το DNA βρίσκεται πλέον σε μονόκλωνη μορφή.
- **Πρόσδεση (annealing step):** πρόκειται για το δεύτερο βήμα κάθε κύκλου, κατά το οποίο η θερμοκρασία πέφτει στους 50-65°C (η θερμοκρασία είναι ενδεικτική για κάθε ζευγάρι εκκινητή) για 20-40 δευτερόλεπτα, ώστε να προσδεθεί ο εκκινητής στο DNA μήτρα.
- **Επιμήκυνση (elongation step):** η θερμοκρασία για αυτό το βήμα εξαρτάται από την πολυμεράση, η Taq πολυμεράση έχει βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία

75-80°C και συνήθως χρησιμοποιείται στους 72°C. Σε αυτό το στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτη τους νέους κλώνους που είναι συμπληρωματικοί προς τους κλώνους του DNA-μήτρα.

- **Τελική επιμήκυνση (final elongation):** αφού ολοκληρωθούν οι κύκλοι της αντίδρασης (ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται από το μήκος του DNA μήτρα, όσο μεγαλύτερο το μήκος τόσο περισσότεροι οι κύκλοι), ακολουθεί η τελική επιμήκυνση όπου υβριδοποιούνται όσα τμήματα του DNA ήταν μονομερή, ώστε το προϊόν της PCR να έχει επεκταθεί πλήρως. Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα βρίσκεται στους 70-74 °C για 5-15 λεπτά [Rychlik *et al*, 1990; Chien *et al*, 1976; Lawyer *et al*, 1993]].

Το προϊόν της αντίδρασης φυλάσσεται στους 4 °C για περαιτέρω επεξεργασία.

Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 3.2: Τα στάδια της PCR σχηματικά

Σχεδιασμός εκκινητών:

Οι εκκινητές σχεδιάζονται με βάση την αλληλουχία κάθε γονιδίου και οι περιοχές που ενισχύονται βρίσκονται εντός της κωδικής αλληλουχίας. Για την ακρίβεια στον *Saccharomyces cerevisiae* η κωδική αλληλουχία εκτίνεται σε όλο το γονίδιο και το γονιδίωμα του δεν διαθέτει ιντρόνια. Οι νοηματικοί εκκινητές (forward primers) έχουν ακριβώς την ίδια με την νοηματική αλυσίδα, ενώ οι μη νοηματικοί εκκινητές (reverse primers) έχουν συμπληρωματική αλληλουχία προς την νοηματική αλυσίδα.

3.15.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-time PCR) σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην μέθοδο της συμβατικής PCR. Η Real time PCR ανιχνεύει την ενίσχυση ενός στοχευόμενου μορίου DNA κατά την διάρκεια της PCR, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο, και όχι στο τέλος της, όπως στην συμβατική PCR. Η Real-time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποσοτικά ή ημι-ποσοτικά, δηλαδή πάνω / κάτω από ένα ορισμένο ποσό μορίων DNA [Watson et al,2004; Heid et al, 1996].

Δύο κοινές μέθοδοι για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο PCR είναι: οι μη-ειδική φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται με οποιοδήποτε δίκλωνο DNA (συχνά χρησιμοποιείται η χρωστική SYBRGreen, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA, και έτσι η αύξηση του αριθμού δίκλωνων μορίων DNA, αυξάνει και την έναυση του φθορισμού), και οι ειδικοί ανιχνευτές ειδικών αλληλουχιών DNA που αποτελείται από ολιγονουκλεοτίδια που έχουν επισημανθεί με ένα φθορίζον μόριο, το οποίο φθορίζει μόνο μετά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με συμπληρωματική αλληλουχία του [Watson et al,2004; Heid et al, 1996].

Ένα πρότυπο DNA-μήτρα κλωνοποιείται με την ίδια μεθοδολογία που ακολουθείται και στην συμβατική PCR, προκειμένου να ενισχυθούν μικρές ποσότητες DNA. Επίσης χρησιμοποιούνται τουλάχιστον ένα ζεύγος ειδικών εκκινήτων, δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και μια θερμο-σταθερή DNA πολυμεράση. Στο μίγμα αυτό προστίθεται ένα υπόστρωμα που σημαίνεται με ειδικό φθορίζον. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή που περιέχει αισθητήρες για τη μέτρηση του φθορισμού του φθορίζοντος μορίου, το οποίο έχει διεγερθεί στο απαιτούμενο μήκος κύματος και έτσι επιτρέπεται η μέτρηση του ρυθμού δημιουργίας ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων προϊόντων. Μέσω αυτής της διαδικασίας επιτρέπεται η μέτρηση του ρυθμού δημιουργίας του ενισχυμένου προϊόντος που προκύπτει σε κάθε κύκλο της PCR [Watson et al,2004; Heid et al, 1996].

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανίχνευση του φθορισμού του φθορίζοντος μορίου, αναλύονται μέσω ειδικού λογισμικού για να υπολογίσει η σχετική έκφραση του γονιδίου (ή του αριθμού των mRNA αντιγράφων) στα διάφορα δείγματα. Η ποσοτική PCR μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του DNA σε δείγματα για τον προσδιορισμό της παρουσίας και της αφθονίας μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε αυτά τα δείγματα. Αυτή η μέτρηση γίνεται μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης, και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο αυτή η μέθοδος ονομάζεται πραγματικού χρόνου PCR (δηλαδή, άμεση ή ταυτόχρονη PCR). Στην περίπτωση του ποσοτικού προσδιορισμού μορίων RNA, το πρότυπο είναι το συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο λαμβάνεται με αντίστροφη μεταγραφή του ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) [Watson et al,2004; Heid et al, 1996].

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό μορίων mRNA, με πρότυπο συμπληρωματικό DNA (cDNA), χρησιμοποιήθηκε το kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, της BioRad:

1. Η αντίδραση προετοιμάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.4):

Πίνακας 3.4: Συστατικά της αντίδρασης της Real-time PCR σύμφωνα με το kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix

Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος ανα 20μl αντίδρασης
SSOadvanced universal SYBP Green supermix(2x)	1x	5μl
Εκκινητές	250-500nM /εκκινητή	Μεταβαλλόμενος
DNA/cDNA μήτρα(προστίθεται στο στάδιο 3)	50ng-5pg	Μεταβαλλομενος
H ₂ O απαλλαγμένο από νουκλεάσες	Μεταβαλλόμενη	Μεταβαλλόμενος

2. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα που θα περιέχει: το SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, τους εκκινητές και το H₂O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες). Το μίγμα αυτό διανέμεται στα φρεάτια την πλάκας στην οποία θα λάβει χώρα η αντίδραση της PCR (PCR plate).
3. Προσθήκη του DNA (προσθήκη και H₂O- απαλλαγμένο από νουκλεάσες, όπου είναι απαραίτητα ώστε να ρυθμιστεί ο όγκος). Η PCR plate καλύπτεται με ειδική οπτικά διάφανη μεμβράνη. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 2000g
4. Η PCR plate τοποθετείται στον ειδικό θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος είναι ρυθμισμένος να πραγματοποιήσει το παρακάτω πρόγραμμα (πίνακας 3.5):

Πίνακας 3.5: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή

Ενεργοποίηση της πολυμεράσης και αποδιάταξη του DNA	3min στους 95°C
Αποδιάταξη	10sec στους 95°C
Προσδεση	1min στους 60°C
Ανάλυση καμπύλης τήξης	55-95°C, αύξηση 0.5°C για 5sec/βήμα

40 κύκλοι

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.6) παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων, των οποίων η έκφραση μελετάται:

Πίνακας 3.6: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδιο	5'→3' Αλληλουχία	Μέγεθος Αμπλικονίου bp
ALG9 forward	GGC CGA TCA CTA GAT GTG ATT	206
ALG9 reverse	CAC CGT ACA CTT GAT TCC ATT	
BCY1 forward	TAC GAC CGT GCC AAA CTT G	133
BCY1 reverse	CCT TCT TAG AGA CGT CCA C	
CLN1 forward	GGC CTC TAC AAT AGA CCT AAC C	206
CLN1 reverse	GGC ACT GTC ACA AGC ACT TTC G	
CLN2 forward	CTA CGA ACA AAT CAC GGG TCC	202
CLN2 reverse	GGG TAT TGC CCA TAC CAA AAG	
CLN3 forward	CAA GCA TCT TTT GGC CAA GCC	176
CLN3 reverse	GAG TTT TCT TGA GGT TGC TAC	
MSN4 forward	CCT ACT AGT CAA GCT CAC	153
MSN4 reverse	GGA CAG GAA CCT TAC CAT	
RIM15 forward	TAG AGC CAC TAG TGG TGT AAG	170
RIM15 reverse	AAG ACT CTA CTG GTT GCC	
RPL3 forward	CGT CCA CTA CGG TGA AAT	152
RPL3 reverse	GCA GTG TCA ATC CAC TTC	
SCH9 forward	CCA TCA TTG ATG TCC TCG	200
SCH9 reverse	GCT ATC TCC AGC CAT GCA	
SNZ1 forward	GAT GGT GTG TTT GTT GGC TC	180
SNZ1 reverse	CTC CAT TGG AAG CAT GAC	
SSA3 forward	CGT CTC AGG AAA CCA TTG	228
SSA3 reverse	TCT TCC ACT GTT GGA CCT GT	
STE20 forward	GCT TGC TCT ATC TTC G	197
STE20 reverse	GAT ATC TGG TCG TTG G	
TAF10 forward	CGG GTT TAA CGT AGC AGA TG	200
TAF10 reverse	CTT TGC TTG CTG TAG TCT TCT C	
UBI4 forward	GTG TTG AGA TTG AGA GGT G	198
UBI4 reverse	CTT CTA GTT GCT TAC CAG C	

4.Αποτελέσματα

4.1 Επιλογή του πειραματικού υλικού

Το αγρίου τύπου στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι το απλοειδές στέλεχος BY4742 του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Το στέλεχος αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες μελέτες που πραγματεύονται την είσοδο και την έξοδο από την στατική φάση. Επιπλέον υπάρχουν διαθέσιμοι γενετικά τροποποιημένοι τύποι του στελέχους αυτού με μεταλλαγές σε διάφορα γονίδια. Έχει αδρανοποιηθεί πάνω από το 90% των γονιδίων που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα.

Σε αυτό το χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της ύπαρξης τροποποιημένων στελεχών στηρίχθηκε και η παρούσα μελέτη, καθώς χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον 3 τροποποιημένα στελέχη με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης των μονοπατιών TOR και HOG1. Τα τροποποιημένα στελέχη *rim15Δ hog1Δ* και *pbs2Δ* χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και προέρχονται από το απλοειδές στέλεχος BY4742. Στα στελέχη αυτά έχει συμβεί διαγραφή των γονιδίων *rim15 hog1* και *pbs2*, αντίστοιχα.

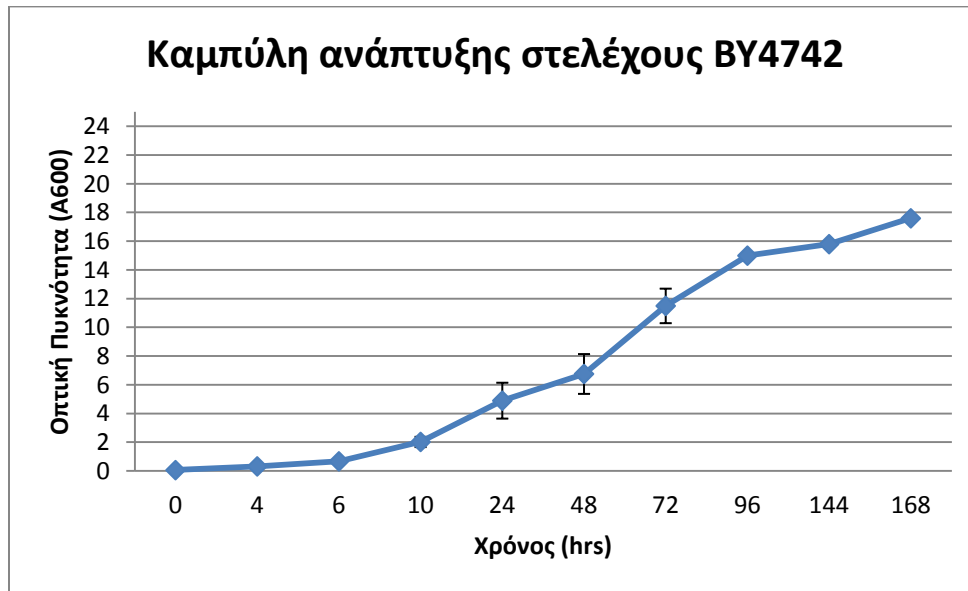
4.1.1 Φαινότυπος των μεταλλαγμένων στελεχών

- ***rim15Δ***: κύτταρα στα οποία έχει γίνει διαγραφή του γονιδίου *rim15* έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής. Υπό συνθήκες εξάντλησης της πηγής αζώτου, επάγεται η διαδικασία της απόπτωσης και αναστέλλεται η διαδικασία της αυτοφαγίας. Τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν χαμηλή αντοχή στο υπεροσμωτικό στρες και μειωμένη έμφυτη θερμο-ανθεκτικότητα. Συστηματικές μελέτες αποδεικνύουν την ευαισθησία του στελέχους στην επίδραση της ραπαμυκίνης [Weinberger et al, 2007; Bernard et al, 2007; Huang et al, 2012]
- ***hog1Δ***: το μετάλλαγμα αυτό είναι ευαίσθητο σε υπεροσμωτικές συνθήκες στρες και αποτυγχάνει να συσσωρεύσει γλυκερόλη υπό αυτές τις συνθήκες. Επιπλέον είναι ευαίθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες, τα οξέα και πολλαπλούς χημικούς παράγοντες όπως το SDS και το DTT [Schmidt et al, 2012; Prick et al, 2006].
- ***pbs2Δ***: το μετάλλαγμα αυτό παρουσιάζει φαινότυπους που σχετίζονται με ελαττώματα στο κυτταρικό τοίχωμα. Συγκεκριμένα αυτά τα κύτταρα συσσωρεύουν μεγάλη ποσότητα (1→6) β-D-γλυκάνης (συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος) και έχουν επίμηκες σχήμα. Είναι ευαίσθητο σε τοξίνες, σε αναγωγικούς παράγοντες, στο SDS και στο ενζυμο ζυμολύση. Παρουσιάζει μειωμένη ανθεκτικότητα στο υπεροσμωτικό στρες, μείωση της διαδικασίας της ενδοκυττάρωσης και ευαισθησία σε χημικούς παράγοντες [Schmidt et al, 2012; Mira et al, 2009; Jiang et al, 1995].

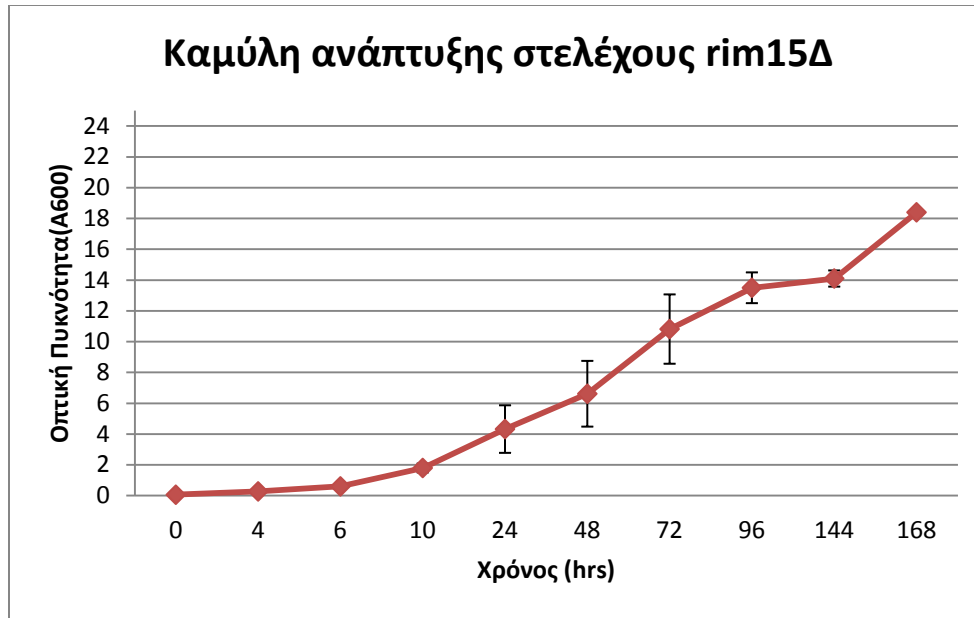
4.2 Ενεργοποίηση και χαρακτηρισμός των στελεχών

Τα στελέχη παρελήφθησαν ως στέρεες καλλιέργειες. Από αυτές δημιουργήθηκαν προκαλλιέργειες, οι οποίες στην συνέχεια ανανεώθηκαν σε νέες καλλιέργειες. Όταν η οπτική πυκνότητα στα 600nm έφτασε στα 4Abs, τα στελέχη αποθηκεύτηκαν ως stock στους -80°C με την προσθήκη γλυκερόλης. Για να ελεγχθεί το σωστό πάγωμα των κυττάρων, τα στελέχη επιστρώθηκαν σε στέρεες καλλιέργειες και παρατηρήθηκε ο τρόπος ανάπτυξής τους. Τα 4 στελέχη αναπτύσσονται γρήγορα και η μορφολογία των αποικιών τους είναι φυσιολογική εντός 24 ωρών.

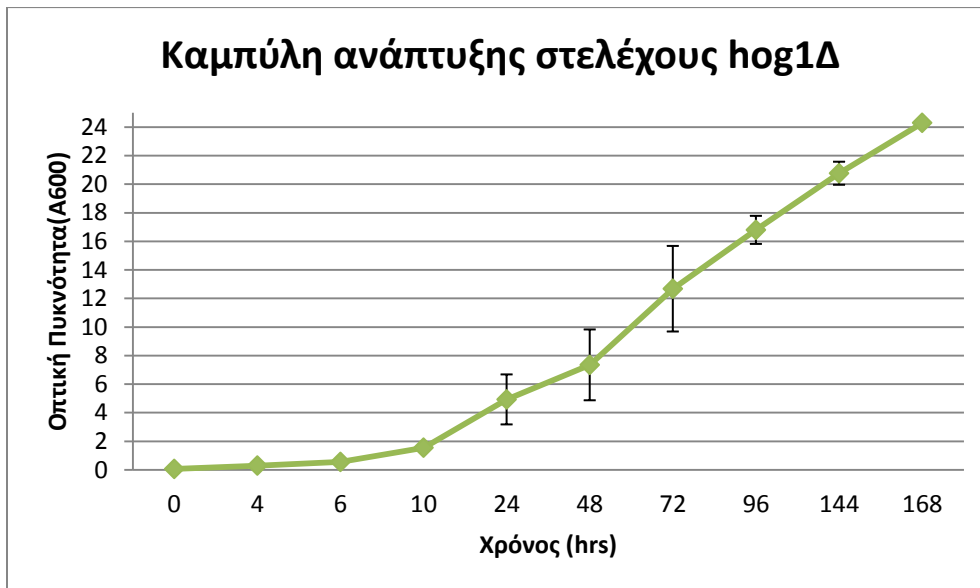
Στην συνέχεια οι αποικίες απομονώνονται από τις στέρεες καλλιέργειες και εμβολιάζονται σε υγρές καλλιέργειες που περιέχουν πλούσιο θρεπτικό μέσο. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται από τις υγρές καλλιέργειες κύτταρα ώστε να μετρηθεί η οπτική τους πυκνότητα και να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων στην καλλιέργεια. Έτσι κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του κάθε στελέχους (εικόνες 4.1-4.5).



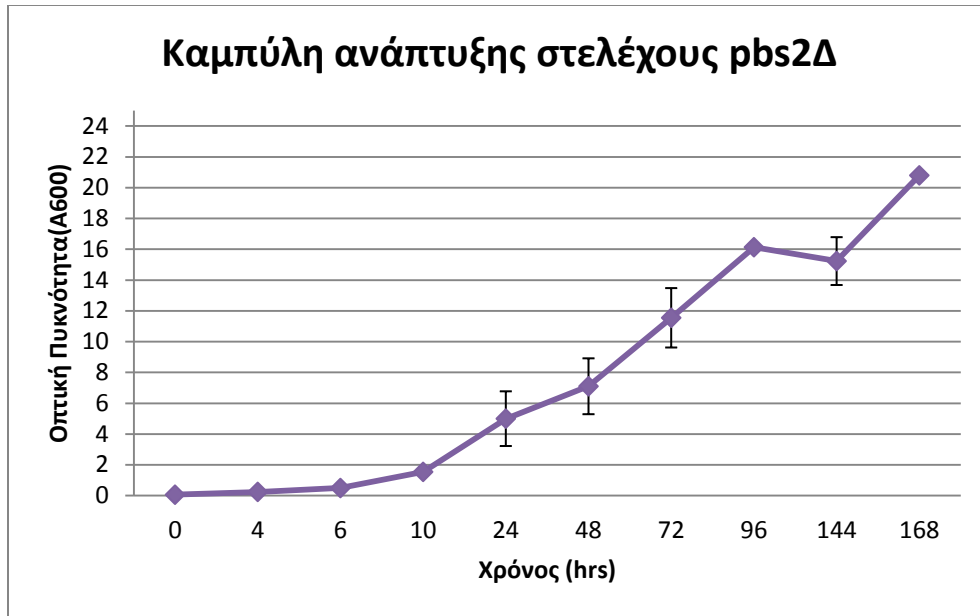
Εικόνα 4.1: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους BY4742



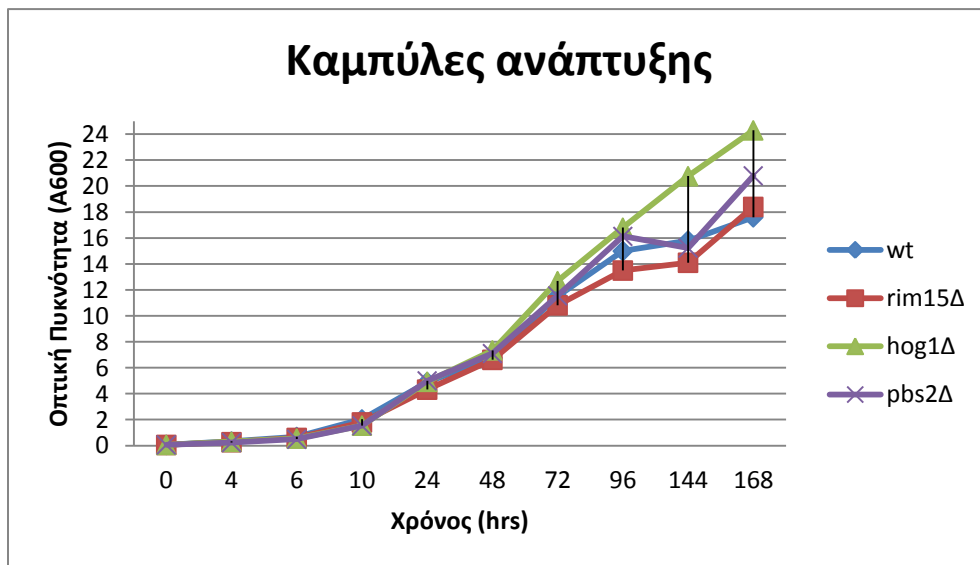
Εικόνα 4.2: Καμύλη ανάπτυξης του στελέχους *rim15Δ*



Εικόνα 4.3: Καμύλη ανάπτυξης του στελέχους *hog1Δ*



Εικόνα 4.4: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *pbs2Δ*



Εικόνα 4.5: Σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης των 4 στελεχών

Όπως είναι φανερό από τις παραπάνω καμπύλες και τα 4 στελέχη εισέρχονται στην στατική φάση 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Ταυτόχρονα δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μεταξύ των στελεχών στην ανάπτυξη, όσον αφορά στον αριθμό των κυττάρων

4.3 Καλλιέργεια των κυττάρων με σκοπό την είσοδο στην στατική φάση ανάπτυξης

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα κύτταρα μιας τυπικής καλλιέργειας *S. cerevisiae* εισέρχεται στη στατική φάση 5-7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Σύμφωνα με τις καμπύλες ανάπτυξης και τα 4 στελέχη εισέρχονται στη στατική φάση 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Έτσι λοιπόν και τα 4 στελέχη καλλιεργούνται για 7 ημέρες σε πλούσιο θρεπτικό μέσο. Σε αυτό το χρονικό διάστημα τα κύτταρα αναμένεται να έχουν χρησιμοποιήσει την πλειοψηφία των θρεπτικών συστατικών τους και κυρίως της πηγής άνθρακα, κάτι που θα έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο στη φάση αδράνειας (φάση G0) [Gray et al, 2004].

Ως πείραμα θετικού ελέγχου του πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα εκθετικής φάσης (12 ώρες ανάπτυξης), όπου το μονοπάτι TOR είναι ενεργό. Επιπλέον για το στέλεχος αγρίου τύπου BY4742, χρησιμοποιείται ως πείραμα ελέγχου της αναστολής του μονοπατιού TOR χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό ραπαμυκίνη για 24 ώρες.

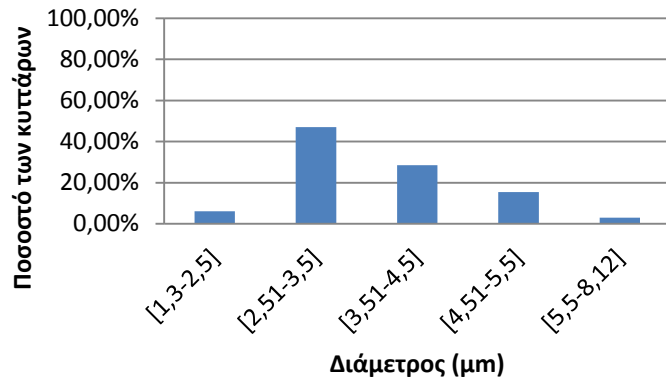
4.4 Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών οδηγεί στην αναστολή του μονοπατιού TOR

Όπως προαναφέρθηκε το μονοπάτι TOR αντιλαμβάνεται τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών και η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών οδηγεί στην απενεργοποίηση του μονοπατιού. Η απενεργοποίηση του TOR, και εν συνεχεία και άλλων μονοπατιών, λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, επιφέρει ποικίλες μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα [Gray et al, 2004]. Τέτοιου είδους αλλαγή αποτελεί η αύξηση του μεγέθους των κυττάρων. Όπως είναι εμφανές στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 4.6) τα κύτταρα της στατικής φάσης στο αγρίου τύπου στέλεχος, BY4742 είναι μεγαλύτερου μεγέθους από τα αντίστοιχα της εκθετικής φάσης.

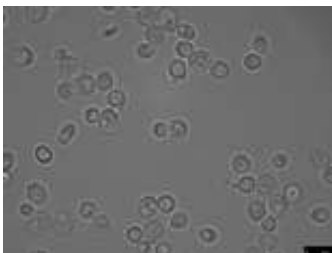
Εκθετική φάση



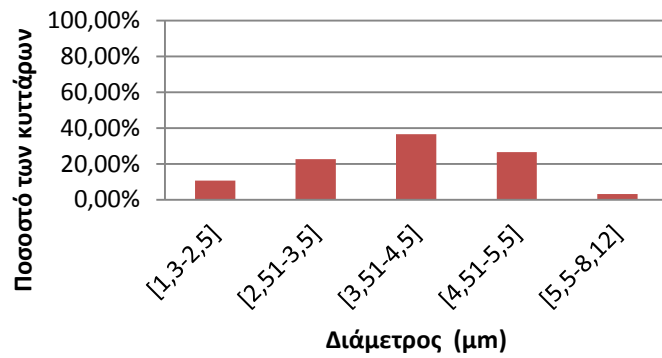
Εκθετική φάση BY4742



Στατική φάση



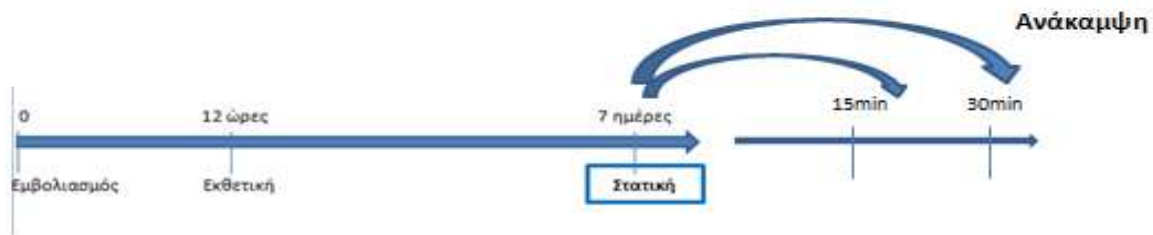
Στατική φάση BY4742



Εικόνα 4.6: Η εικόνα των κυττάρων BY4742 όπως προκύπτει από μικροσκοπία φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 1,6$) με την αντίστοιχη γραφική αναπαράσταση του ποσοστού των κυττάρων ανάλογα με την διάμετρο τους.

4.5 Τα κυτταρικά τοιχώματα του στελέχους BY4742 παχαίνουν κατά την είσοδο στην στατική φάση

Η φυσιολογική είσοδος των κυττάρων του ζυμομύκητα στη στατική φάση συμβαίνει λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών. Η ανανέωσή τους έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο από την στατική φάση και την συνέχιση του πολλαπλασιασμού. Για τον έλεγχο αυτής της διαδικασίας, τα κύτταρα του στελέχους BY4742 κύτταρα εμβολιάστηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο, και αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες στους 30°C υπό ανάδευση στις 250rpm. Στην συνέχεια τα κύτταρα της καλλιέργειας 7 ημερών εμβολιάζονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο, όπου αφήνονται να αναπτυχθούν για 5, 15 και 30 λεπτά. Η πειραματική πορεία συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 4.7).

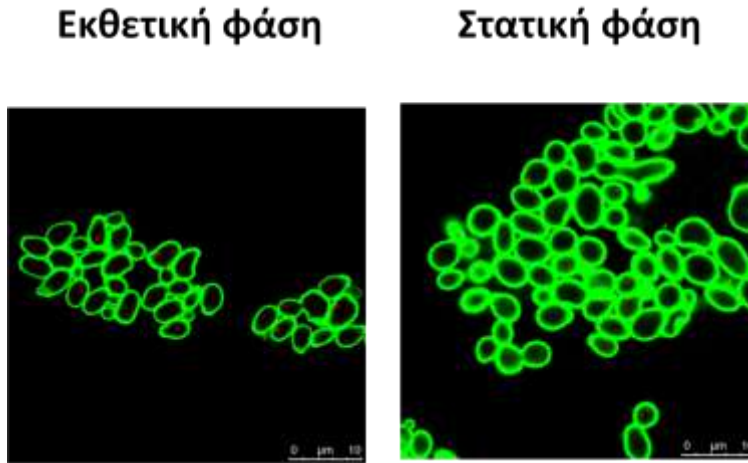


Εικόνα 4.7: Σχεδιάγραμμα της πειραματικής πορείας που ακολουθείται κατά την ανάκαμψη μιας στατικής καλλιέργειας

Το κυτταρικό τοίχωμα διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την ομοιόσταση των κυττάρων του ζυμομύκητα. Συγκεκριμένα, σταθεροποιεί τις εσωτερικές οσμωτικές συνθήκες. Το κυτταροπλασματικό περιβάλλον του ζυμομύκητα έχει υψηλότερη ωσμωτικότητα από το εξωκυτταρικό περιβάλλον, έτσι το κυτταρικό τοίχωμα αποτρέπει την εισροή νερού από το εξωτερικό του κυττάρου και την προκύπτουσα λύση του. Ταυτόχρονα προστατεύει το κύτταρο από φυσικές καταπονήσεις, διατηρεί το κυτταρικό σχήμα και περιορίζει την διαπερατότητα του κυττάρου σε μακρομόρια [Klis *et al*, 2006].

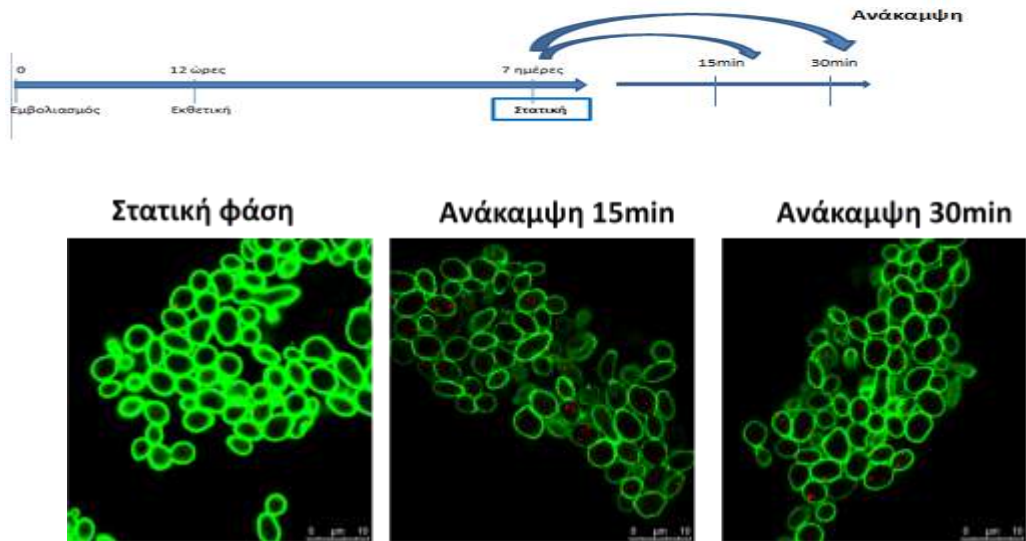
Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι τα κύτταρα που εισέρχονται στην φάση G0 παρουσιάζουν συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά, που τα διαχωρίζουν από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, με σημαντικότερο τα παχιά κυτταρικά τοιχώματα. Τα κύτταρα του ζυμομύκητα αλλάζουν την δομή των μαννοπρωτεϊνών του κυτταρικού τους τοιχώματος και τα επίπεδα N-γλυκοζυλίωσής τους καθώς επίσης αυξάνεται και ο αριθμός των δισουλφιδικών γεφυρών με σκοπό να προσφέρουν στο κύτταρο ανθεκτικότητα στα πρωτεολυτικά ένζυμα που υπάρχουν λόγω του στρες που προκαλείται από την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών [Gray *et al*, 2004; Klosinska *et al*, 2011].

Όπως προαναφέρθηκε, η χρωστική concanavallin A είναι μια πρωτεΐνη που προέρχεται από το φυτό *Canavali ensiformis* (φασόλι) και αποτελείται από διακλαδισμένες δομές πολυσακχαριτών και μπορεί να προσδέεται σε πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται λεκτίνες. Οι λεκτίνες απαρτίζουν το κυτταρικό τοίχωμα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, και με την χρήση αυτής της χρωστικής μπορούμε να έχουμε την εικόνα του κυτταρικού τοιχώματός του [TkaczL.S. etal., 1971].



Εικόνα 4.8: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους BY4742 στις συνθήκες εκθετικής και στατικής φάσης. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Έτσι κύτταρα που προέρχονται από την εκθετική και την στατική φάση ανάπτυξης σημαίνονται με την concanavallin A. Στην συνέχεια στα κύτταρα της στατικής φάσης ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο και επωάζονται για 15 και 30 λεπτά στους 30° C, υπό ανάδευση στις 250 rpm. Ακολουθεί η χρώση του κυτταρικού τοιχώματος, μονιμοποίηση και χρώση με τις χρωστική phalloidin, για την οποία θα γίνει εκτενής αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 4.9: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος του στελέχους BY4742 στις συνθήκες στατικής φάσης και ανάκαμψης για 15 και 30 λεπτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.8, τα κύτταρα της στατικής φάσης ανάπτυξης έχουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα, εν αντιθέσει με τα κύτταρα της εκθετικής φάσης, ενώ το κυτταρικό τοίχωμα λεπταίνει και πάλι 15 λεπτά μετά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου (εικόνα 4.9). Αυτό το φαινόμενο αυτό είναι πιθανό να ευνοεί την πιο εύκολη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από το περιβάλλον, κατά την ανάκαμψη των κυττάρων από την στατική φάση.

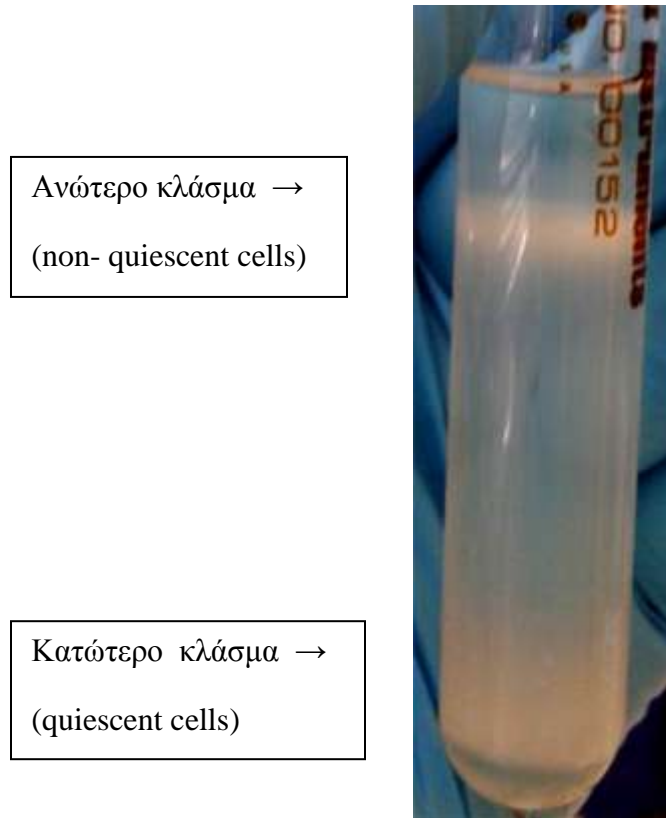
4.6 Απομόνωση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0 από καλλιέργεια 7 ημερών

Μια καλλιέργεια 7 ημερών αποτελείται από μικό πληθυσμό κυττάρων, καθώς σε αυτήν συνυπάρχουν κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με αργό ρυθμό, κύτταρα που πρόκειται να οδηγηθούν σε απόπτωση και κύτταρα που εξέρχονται από τον κυτταρικό τους κύκλο και εισέρχονται στη φάση G0. Αυτοί οι κυτταρικοί τύποι διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την πυκνότητα των κυττάρων και ο λόγος που συμβαίνει κάτι τέτοιο είναι η ύπαρξη των πυκνών κυτταρικών τοιχωμάτων και των πυκνών κενοτοπίων στα κύτταρα της φάσης G0. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό αναπτύχθηκε η μεθοδολογία κλασμάτωσης κυτταρικών εκχυλισμάτων βάσει πυκνότητας με την χρήση του διαλύματος Percoll.

Μια στατική καλλιέργεια φορτώνεται στο κλάσμα του percoll και έπειτα από φυγοκέντρηση δημιουργούνται δύο κλάσματα: το ανώτερο κλάσμα, όπου αποτελείται

από κύτταρα που αποπίπτουν ή από κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με αργό ρυθμό και το κατώτερο κλάσμα, που αποτελείται από κύτταρα που βρίσκονται στην φάση G0.

Η ποσότητα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ελέγχθηκε βιβλιογραφικά και πειραματικά, ώστε οι δύο φάσεις να είναι διακριτές. Τα κύτταρα που είναι στην φάση G0 συσσωρεύονται στο κατώτερο κλάσμα, λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας. Αντίθετα, τα κύτταρα που αποπίπτουν ή συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, κατανέμονται στο ανώτερο κλάσμα (εικόνα 4.10) [Allen et al, 2006]



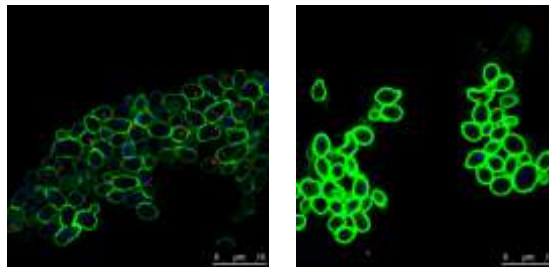
Εικόνα 4.10: Τα κλάσματα του percoll στο στέλεχος BY4742

Ο πληθυσμός των κυττάρων που κατανέμονται στο ανώτερο κλάσμα είναι μικρότερος, από αυτόν που κατανέμεται στο κατώτερο, κάτι που είναι αναμενόμενο δεδομένης της πληθώρας και της πυκνότητας των κυττάρων της φάσης G0 στο κλάσμα αυτό (εικόνα 4.10). Τα κύτταρα και των δύο κλασμάτων απομονώνονται και σημαίνονται τα κυτταρικά τους τοιχώματα.

4.7 Η χρώση του κυτταρικού τοιχώματος μας επιτρέπει να κατανοήσουμε μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων της φάσης G0

Με την σήμανση του κυτταρικού τοιχώματος, είναι φανερή η διαφορά στο πάχος των κυτταρικών τοιχωμάτων μεταξύ των κυττάρων του ανώτερου και του κατώτερου κλάσματος. Τα κύτταρα που κατανέμονται στο κατώτερο κλάσμα έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα, το οποίο με βάση τη βιβλιογραφία [Gray *et al*, 2004], είναι χαρακτηριστικό των κυττάρων που εισέρχονται στην φάση G0 ως αποτέλεσμα της προσαρμογής σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (εικόνα 4.11).

Ανώτερο κλάσμα Κατώτερο κλάσμα



Εικόνα 4.11: Η εικόνα του κυτταρικού τοιχώματος κυττάρων του ανώτερου και κατώτερου κλάσματος, όπως προκύπτει από συνεστιακή μικροσκοπία (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη, **μπλέ:** πυρήνας

4.8 Η ακτίνη οργανώνεται σε κηλίδες ακτίνης κατά την ανάκαμψη, με τρόπο εξαρτώμενο από TOR

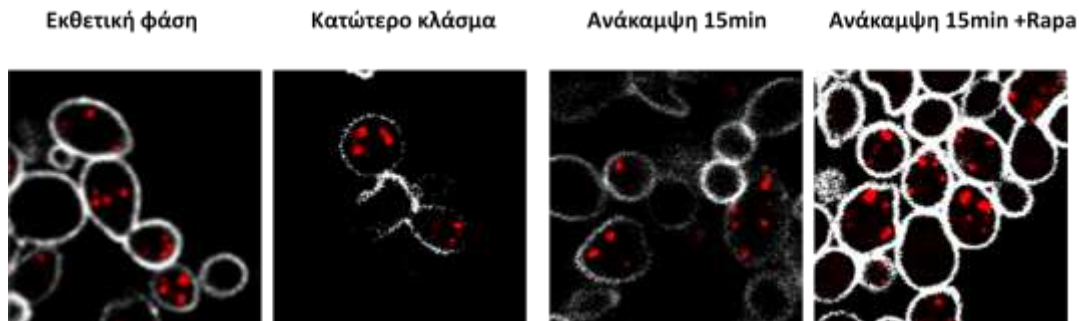
Όπως αναφέρθηκε εκτενώς και στην εισαγωγή τα κύτταρα μιας στατικής καλλιέργειας οργανώνουν την ακτίνη σε ειδικές δομές, τα σωματίδια ακτίνης (actin bodies). Η ακτίνη όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι άφθονα, σχηματίζει κηλίδες. Οι κηλίδες αυτές είτε εμφανίζουν πόλωση, δηλαδή είναι κατανεμημένες σε συγκεκριμένο τμήμα του κυτταροπλάσματος ή στο εκβλάστημα είτε εμφανίζουν εκπόλωση, δηλαδή είναι κατανεμημένες ομοιόμορφα σε όλο το κυτταρόπλασμα. Η κατάσταση της ακτίνης, (πολωμένη/εκπολωμένη/σωμάτια ακτίνης) καθορίζεται από την φάση ανάπτυξης των κυττάρων [Sagot *et al*, 2006].

Τα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος εμβολιάστηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για 15 λεπτά, παρουσία και απουσία του αναστολέα του μονοπατιού TOR (ραπαμυκίνη). Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην εικόνα 4.12. Ακολούθησε χρώση της ακτίνης του κυτταροσκελετού με την χρωστική phalloidin.



Εικόνα 4.12: Η πειραματική πορεία που ακολουθείται κατά την ανάκαμψη των κυττάρων του κατώτερου κλάσματος.

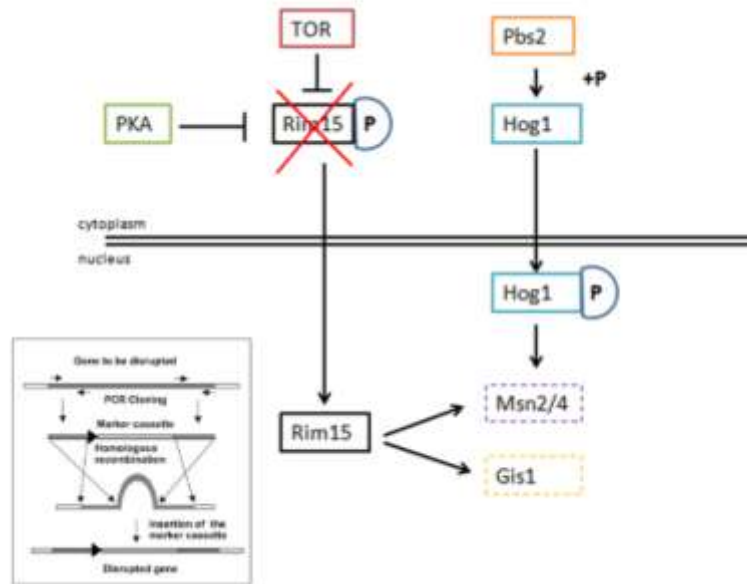
Όπως είναι εμφανές στην παρακάτω εικόνα η ακτίνη οργανώνεται σε κηλίδες κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (εικόνα 4.13). Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, και κατ' επέκταση και η είσοδος στη φάση G0, οδηγεί στην αναδιοργάνωση της ακτίνης σε σωματίδια. Η ανάκαμψη αυτών των κυττάρων για το χρονικό διάστημα των 15 λεπτών, έχει ως αποτέλεσμα την οργάνωση της ακτίνης σε κηλίδες, γεγονός που επιβεβαιώνει την έναρξη του πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 4.13: Η οργάνωση της ακτίνης στα κύτταρα της εκθετικής φάσης, του κατώτερου κλάσματος, της ανάκαμψης για 15 λεπτά παρουσία και απουσία του αναστολέα του μονοπατιού TOR. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

4.9 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Rim15 στην είσοδο στη φάση G0

Η πρωτεΐνη Rim15 είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και το γονίδιο που την κωδικοποιεί εκφράζεται κατά την είσοδο στη στατική φάση. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι να ρυθμίζει την είσοδο στη στατική φάση μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων Msn2 και Msn4. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί σημείο σύγκλισης των μονοπατιών TOR και Ras/PKA, καθώς δέχεται σήματα και από τα δύο μονοπάτια (εικόνα 4.14) [Bisschops *et al*, 2013].

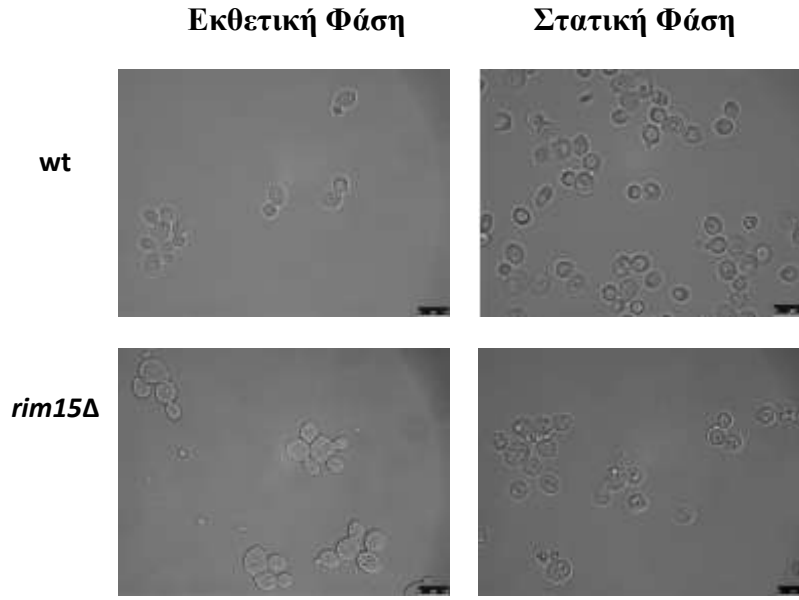


Εικόνα 4.14: Η πρωτεΐνη Rim15 αποτελεί σημείο σύγκλισης των μονοπατιών TOR και Ras/PKA

Για τον έλεγχο του ρόλου της πρωτεΐνης Rim15 στην είσοδο στην φάση G0, χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος *rim15Δ*, στο οποίο έχει γίνει διαγραφή του γονιδίου *rim15*.

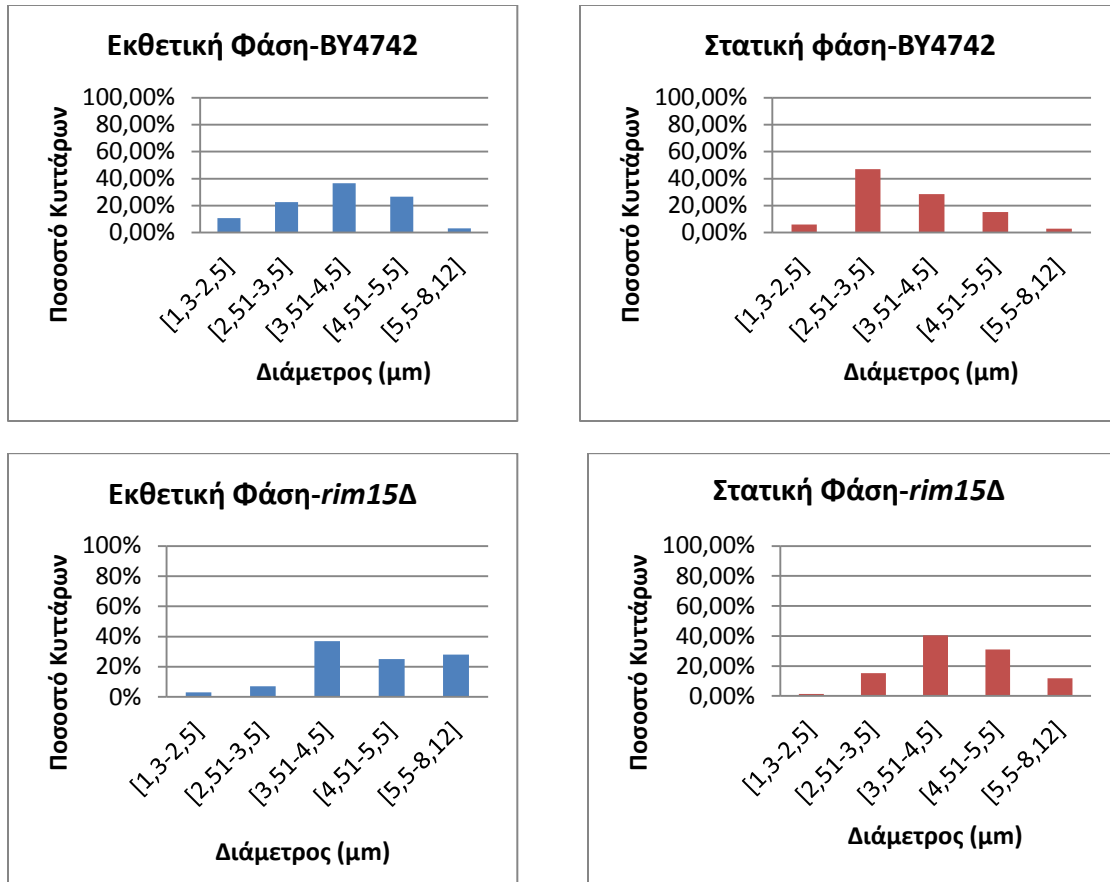
4.9.1 Τα *rim15Δ* κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος

Τα στελέχη αυτά αναπτύχθηκαν για 7 ημέρες, έως ότου εισέλθουν στη στατική φάση ανάπτυξης και ελέγχθηκαν ως προς την μορφολογία των κυττάρων τους (εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Η εικόνα των κυττάρων *rim15Δ* συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (BY4742) στην εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης, όπως προκύπτει από μικροσκοπία φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (TIRF) (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 1,6$)

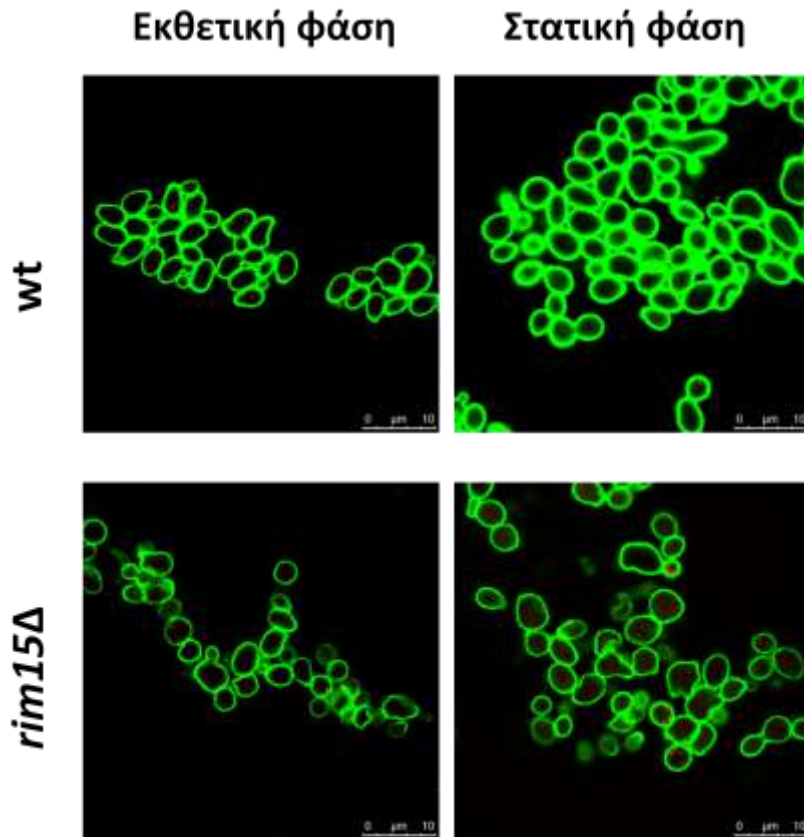
Όπως είναι εμφανές από την εικόνα 4.16 τα κύτταρα *rim15Δ* είναι μεγαλύτερα από τα αγρίου τύπου τόσο στην εκθετική όσο και στη στατική φάση. Αυτή η διαφορά παρουσιάζεται ποσοτικοποιημένη στα παρακάτω διαγράμματα (εικόνα 4.16), όπου παρατηρείται αύξηση των πληθυσμών των κυττάρων με διαμέτρους 4,51-5,5 μm και 5,5-8,12 μm .



Εικόνα 4.16: Διαγραμματική απεικόνιση του μεγέθους των κυττάρων *rim15Δ* στην εκθετική και στατική φάση

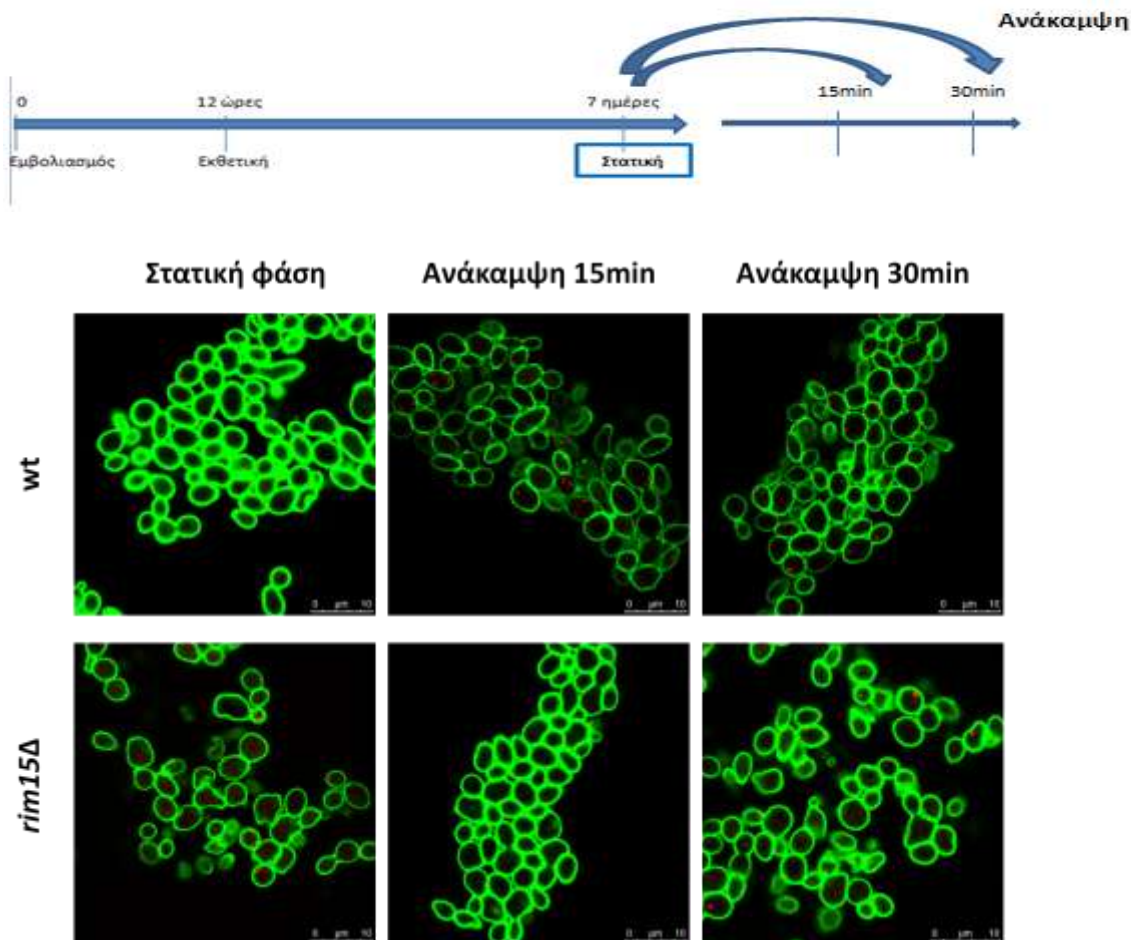
4.9.2 Το κυτταρικό τοίχωμα των *rim15Δ* δεν αυξάνει το πάχος των κυτταρικών τοιχωμάτων στην στατική φάση

Στη συνέχεια, ελέγχεται το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος κατά την εκθετική και στατική φάση. Παρατηρείται ότι απουσία του *rim15* το κυτταρικό τοίχωμα αδυνατεί να αυξήσει το πάχος του κατά την είσοδο στην στατική φάση (εικόνα 4.17).



Εικόνα 4.17: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *rim15Δ* κυττάρων κατά την εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

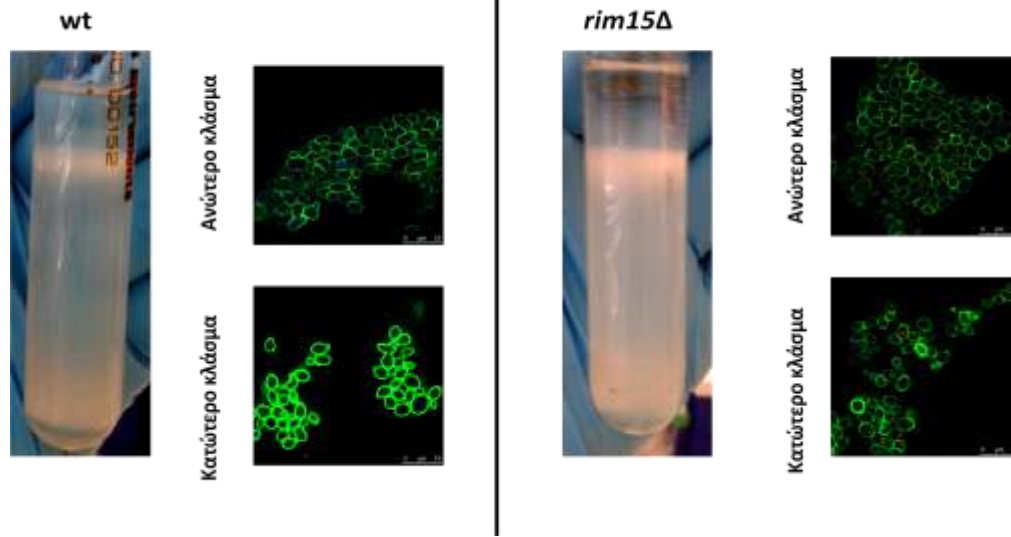
Τα κύτταρα της στατικής φάσης εμβολιάζονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για 15 και 30 λεπτά. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι κατά την ανάκαμψη τα *rim15Δ* δεν μειώνουν το πάχος των κυτταρικών τους τοιχωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή αδυναμία των κυττάρων να εισέλθουν στην φάση G0, απουσία *rim15* (εικόνα 4.18).



Εικόνα 4.18: Η απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *rim15Δ* κυττάρων κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, την ανάκαμψη για 15 λεπτά και την ανάκαμψη παρουσία ραπαμυκίνης για 15 λεπτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

4.9.3 Τα *rim15Δ* κύτταρα λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους δεν διαχωρίζονται σωστά κατά την κλασμάτωση με percoll

Τα *rim15Δ* κύτταρα κλασματώθηκαν με την μέθοδο του percoll για να ελεγχθεί η ύπαρξη των δύο πληθυσμών. Παρατηρείται μια διαφορετική κατανομή των *rim15Δ* κυττάρων στο διάλυμα του percoll, καθώς οι δυο φάσεις που δημιουργούνται είναι σαφώς μεγαλύτερες σε έκταση από τις αντίστοιχες στο αγρίου τύπου στέλεχος. Επιπλέον οι δύο αυτές φάσεις δεν είναι σαφώς διακριτές, αυτό σημαίνει ότι σε μια στατική καλλιέργεια του στελέχους *rim15Δ* υπάρχουν διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων που ποικίλλουν ως προς την πυκνότητά τους (εικόνα 4.19). Η παρατήρηση αυτή πιθανότατα οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος των *rim15Δ* κυττάρων.

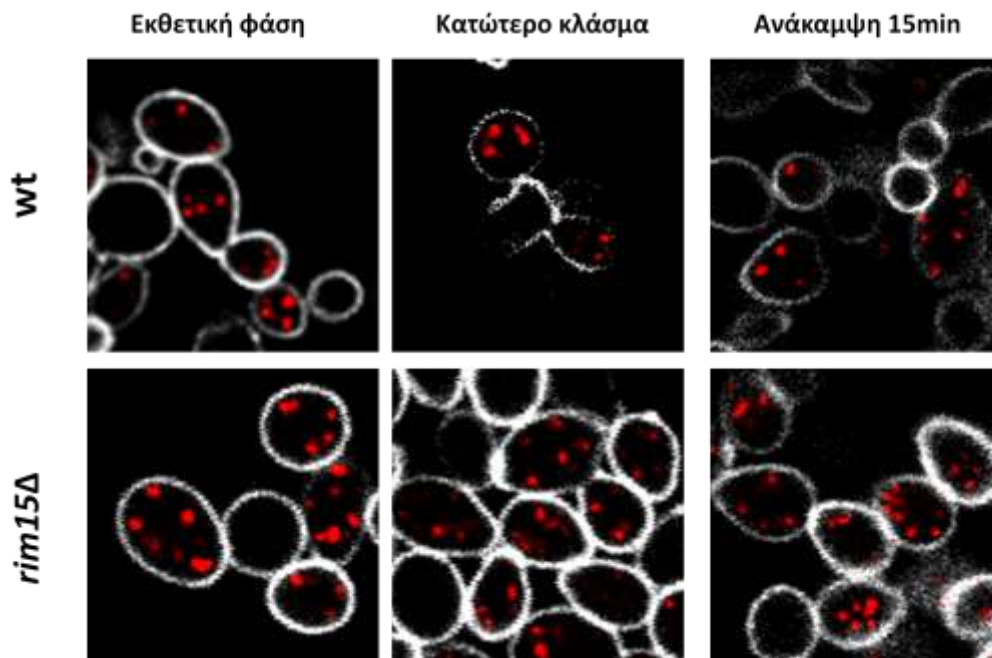


Εικόνα 4.19: Η απεικόνιση των κλασμάτων του percoll στα *rim15Δ* (δεξιά) συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (αριστερά) και η χρώση του κυτταρικού κλάσματος των κυττάρων που απομονώνονται από αυτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

Στην συνέχεια τα κύτταρα που απομονώθηκαν και από τα δύο κλάσματα σημαίνονται για την απεικόνιση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.19 τα *rim15Δ* του κατώτερου κλάσματος έχουν πιο παχιά κυτταρικά τοιχώματα συγκριτικά με το ανώτερο κλάσμα. Παρόλα αυτά τα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος του στελέχους αγρίου τύπου έχουν πιο παχιά κυτταρικά τοιχώματα σχετικά με τα αντίστοιχα του στελέχους *rim15Δ* (εικόνα 4.19).

4.9.4 Τα *rim15Δ* κύτταρα δεν οργανώνουν την ακτίνη σε σωματίδια κατά την είσοδο στη στατική φάση

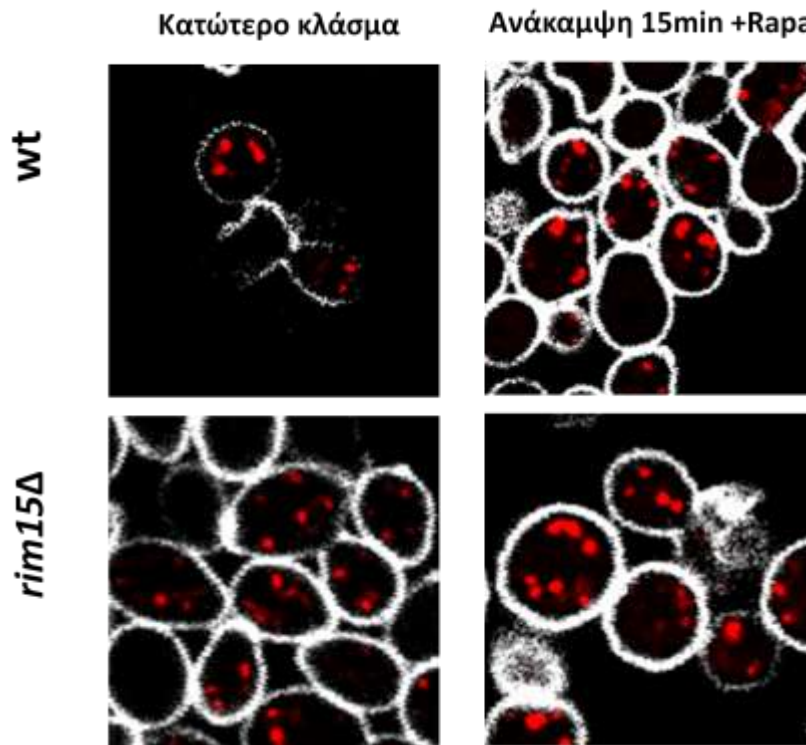
Η χρώση της ακτίνης στα κύτταρα *rim15Δ*, δίνει μια διαφορετική εικόνα για την οργάνωση του κυτταροσκελετού τους, σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα. Παρόλο που στην εκθετική φάση η εικόνα της ακτίνης μοιάζει με εκείνη των κυττάρων αγρίου τύπου (η ακτίνη σχηματίζει κηλίδες), στην περίπτωση της στατικής καλλιέργειας η εικόνα είναι διαφορετική (εικόνα 4.20).



Εικόνα 4.20: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης κατά την εκθετική φάση, στο κατώτερο κλάσμα του percoll και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά των κυττάρων *rim15Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Η ακτίνη σε μια στατική καλλιέργεια αναμένεται, λόγω εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, να οργανώνεται σε σωμάτια ακτίνης. Στην περίπτωση των *rim15Δ* κυττάρων ο πληθυσμός των κυττάρων του κατώτερου κλάσματος δεν οργανώνει την ακτίνη σε σωμάτια, όπως συμβαίνει στα αγρίου τύπου κύτταρα. Στην συνέχεια τα κύτταρα εμβολιάζονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για 15 λεπτά και ελέγχεται η κατάσταση της ακτίνης. Παρατηρείται, λοιπόν ότι κατά την ανάκαμψη η ακτίνη σχηματίζει κηλίδες στα κύτταρα *rim15Δ* (εικόνα 4.20).

Στη συνέχεια, τα κύτταρα *rim15Δ* τα κύτταρα ανακάμπτουν για 15 λεπτά παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού TOR (ραπαμυκίνη). Τα *rim15Δ* κύτταρα οργανώνουν την ακτίνη σε σωμάτια, όταν το μονοπάτι TOR είναι ανεσταλμένο (υπό την επίδραση δηλαδή της ραπαμυκίνης) (εικόνα 4.21).



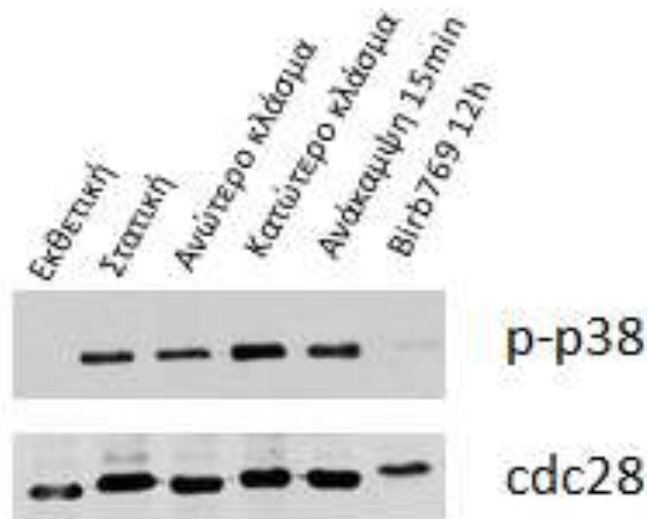
Εικόνα 4.21: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης στο κατώτερο κλάσμα του percoll και κατά την ανάκαμψη παρουσία ραπαμυκίνης των κυττάρων *rim15Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

4.10 Ο ρόλος του μονοπατιού HOG1 στην είσοδο και στη έξοδο από την στατική φάση

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο της εισαγωγής το μονοπάτι HOG1 αντιλαμβάνεται το οσμωτικό στρες και βοηθά στην απόκριση των κυττάρων στο στρες αυτό. Όπως πρόσφατα έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, το μονοπάτι HOG1 εμπλέκεται και στο στρες που προκαλείται λόγω την εξάντλησης της πηγής γλυκόζης σε ένα κύτταρο. Για την διερεύνηση του ρόλου του μονοπατιού HOG1 στην είσοδο στην φάση G0, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενεργοποιημένης Hog1 πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη HOG1 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την πρωτεΐνη p38 MAPK των ανώτερων

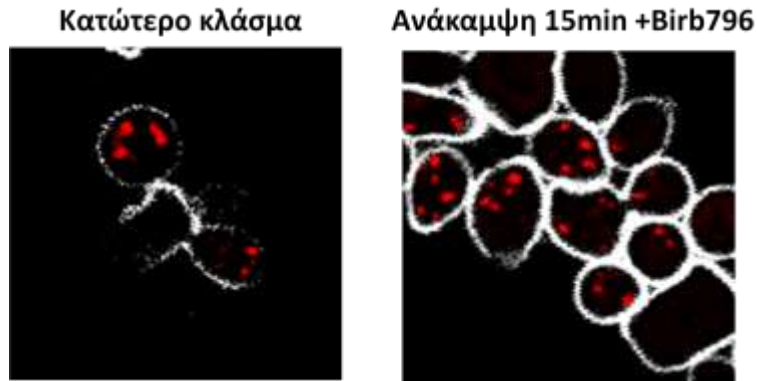
ευκαρυωτικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης HOG1 γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης, έτσι για τον έλεγχο των επιπέδων της ενεργής μορφής της HOG1 πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται αντίσωμα για την φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης p38 (phospho-p38).

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από το στέλεχος αγρίου τύπου BY4742, ελέγχονται με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στις εκάστοτε συνθήκες για τα επίπεδα της ενεργής HOG1πρωτεΐνης. Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη HOG1 είναι ανενεργή στην εκθετική φάση ανάπτυξης, ενώ ενεργοποιείται στη στατική φάση. Τα επίπεδα της ενεργής HOG1πρωτεΐνης αυξάνονται ιδιαίτερα στα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος, δηλώνοντας τον πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στην είσοδο των κυττάρων στη φάση G0. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής μειώνονται, σε σχέση με το κατώτερο κλάσμα, 15 λεπτά μετά την ανανέωση των θρεπτικών συστατικών (εικόνα 4.22).



Εικόνα 4.22: Η συμπεριφορά της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης HOG1, όπως φαίνεται μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιείται η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση Cdc28.

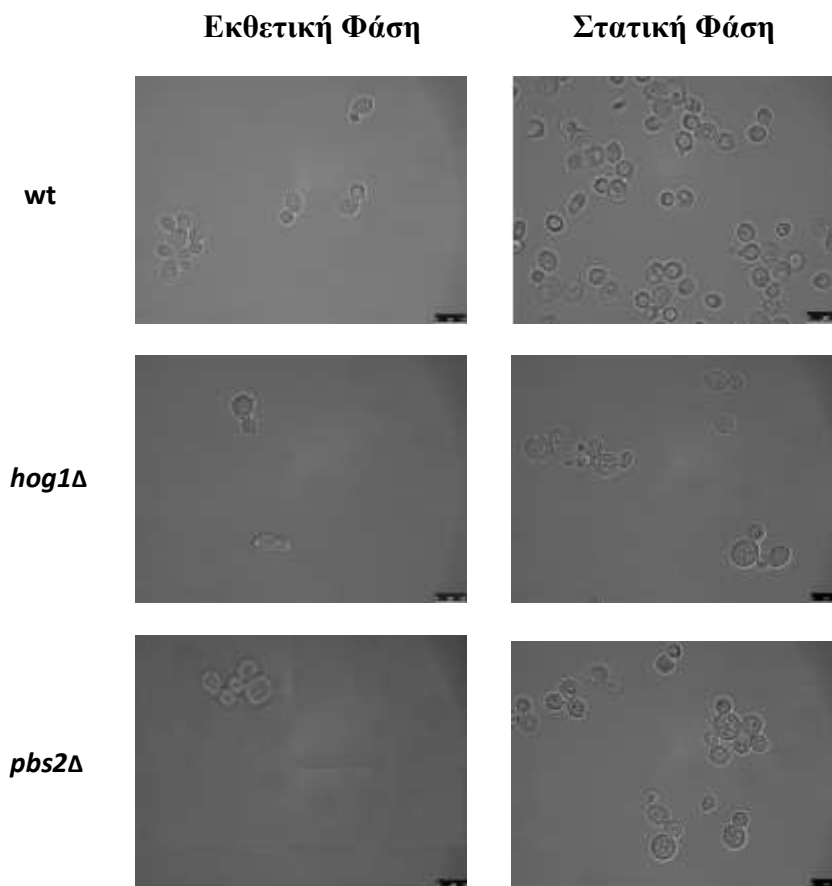
Στη συνέχεια ελέγχθηκε η οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού κατά την ανάκαμψη παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού HOG1 (υπό την επίδραση του αναστολέα Birb796). Παρατηρείται ότι η φαρμακευτική αναστολή του μονοπατιού HOG1 δεν επηρεάζει την οργάνωση της ακτίνης σε κηλίδες κατά την ανάκαμψη (εικόνα 4.23)



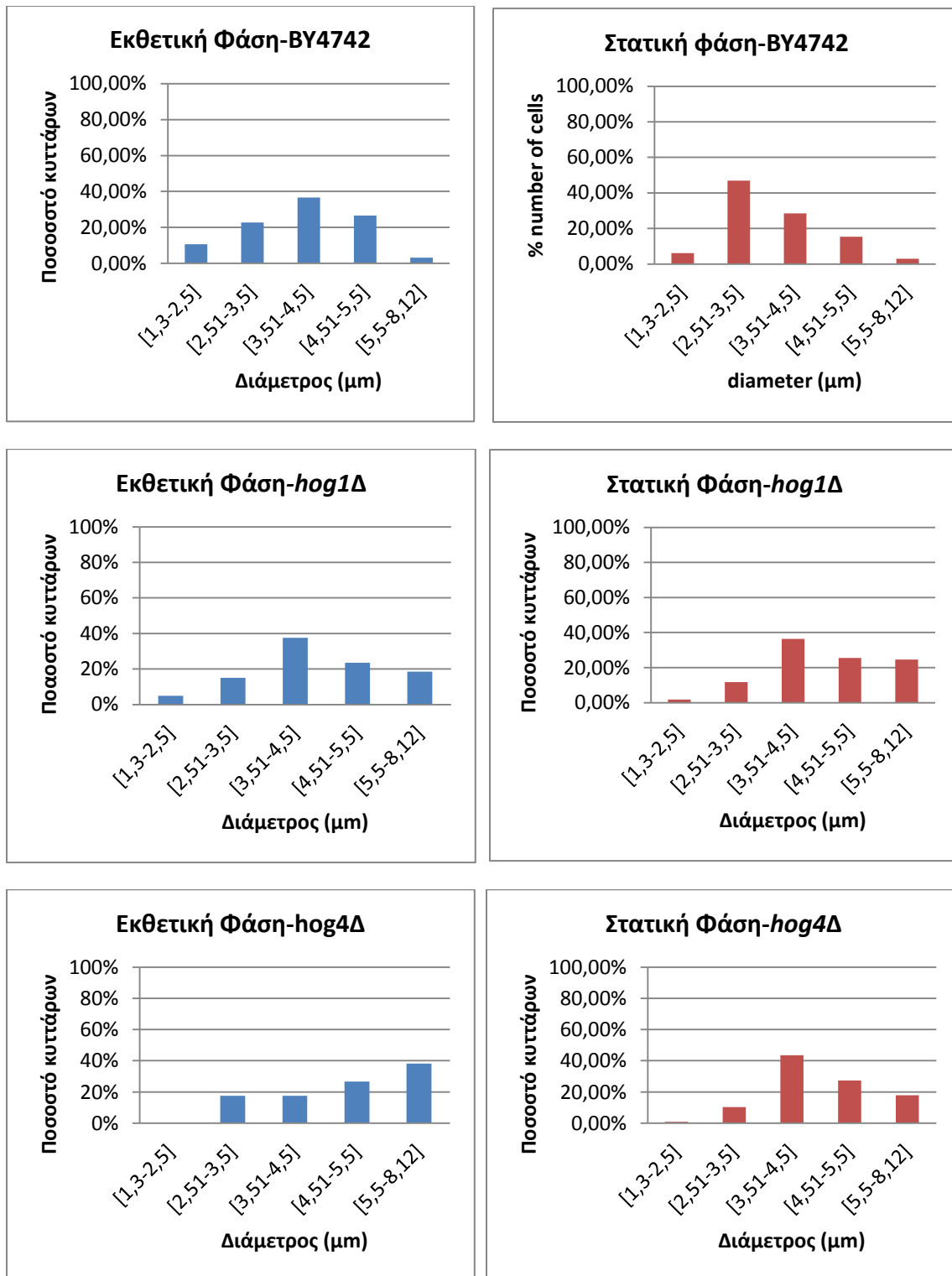
Εικόνα 4.23: Απεικόνιση της οργάνωσης της ακτίνης στα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά παρουσία Birb796 στα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του μονοπατιού HOG1 στην είσοδο και έξοδο από την στατική φάση, χρησιμοποιήθηκαν δυο μεταλλαγμένα στελέχη, τα *hog1Δ* και *pbs2Δ*. Στα στελέχη αυτά έχει γίνει διαγραφή των γονιδίων *hog1* και *pbs2* αντίστοιχα. Το γονίδιο *hog1* κωδικοποιεί την MAPK κινάση HOG1 και το γονίδιο *pbs2*, κωδικοποιεί την MAPK κινάση PBS2, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση HOG1 [Duch et al, 2012; Vallejo et al, 2015].

Τα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ* εμβολιάζονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο και ελέγχονται ως προς την μορφολογία τους, όταν βρίσκονται στην εκθετική και τη στατική φάση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.24 τα κύτταρα και των δυο μεταλλαγμένων στελεχών έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σχετικά με τα αγρίου τύπου, κάτι που επιβεβαιώνεται από την διαγραμματική απεικόνιση των διαμέτρων τους (εικόνα 4.25), όπου αυξάνονται οι πληθυσμοί των κυττάρων με διαμέτρους 4,51-5,5μm και 5,5-8,12μm και για τα δυο στελέχη.



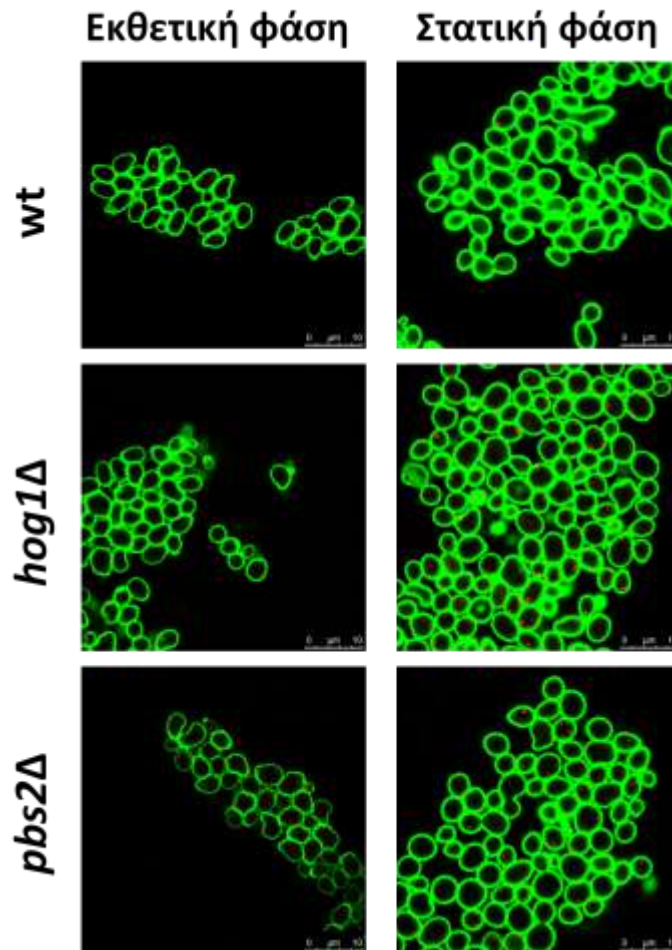
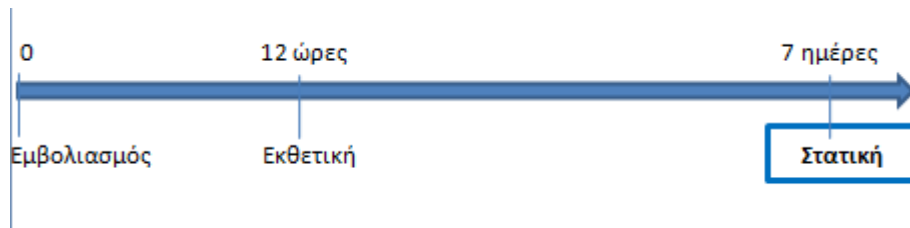
Εικόνα 4.24: Η μορφολογία των κυττάρων των στελεχών *hog1Δ* και *pbs2Δ* στην εκθετική και στατική φάση. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×1,6)



Εικόνα 4.25: Διαγραμματική απεικόνιση των διαμέτρων των κυττάρων *hog1Δ* και *pbs2Δ*

4.10.1 Τα μεταλλάγματα *hog1Δ* και *pbs2Δ* αυξάνουν το πάχος των κυτταρικών τους τοιχωμάτων κατά την είσοδο στην στατική φάση

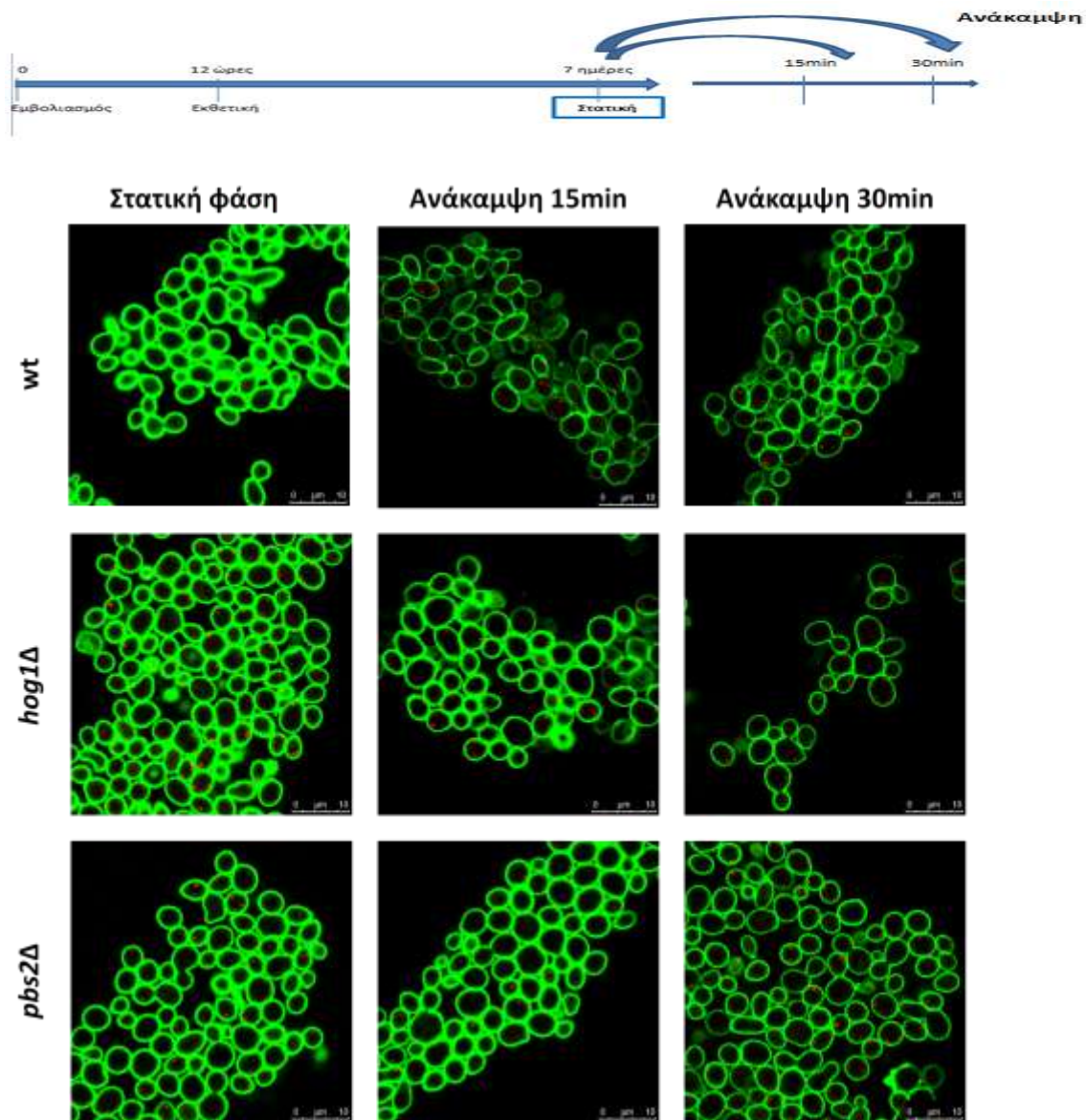
Τα *hog1Δ* και *pbs2Δ* κύτταρα ελέγχονται με ειδική χρώση για το πάχος του κυτταρικού τους τοιχώματος κατά την εκθετική ανάπτυξη και τη στατική φάση. Παρατηρείται ότι το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος αυξάνεται στα κύτταρα της στατικής φάσης (εικόνα 4.26).



Εικόνα 4.26: Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *hog1Δ* και *pbs2Δ* κυττάρων στην εκθετική και τη στατική φάση. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: ×3,2). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

4.10.2 Τα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ* καθυστερούν να μειώσουν το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος

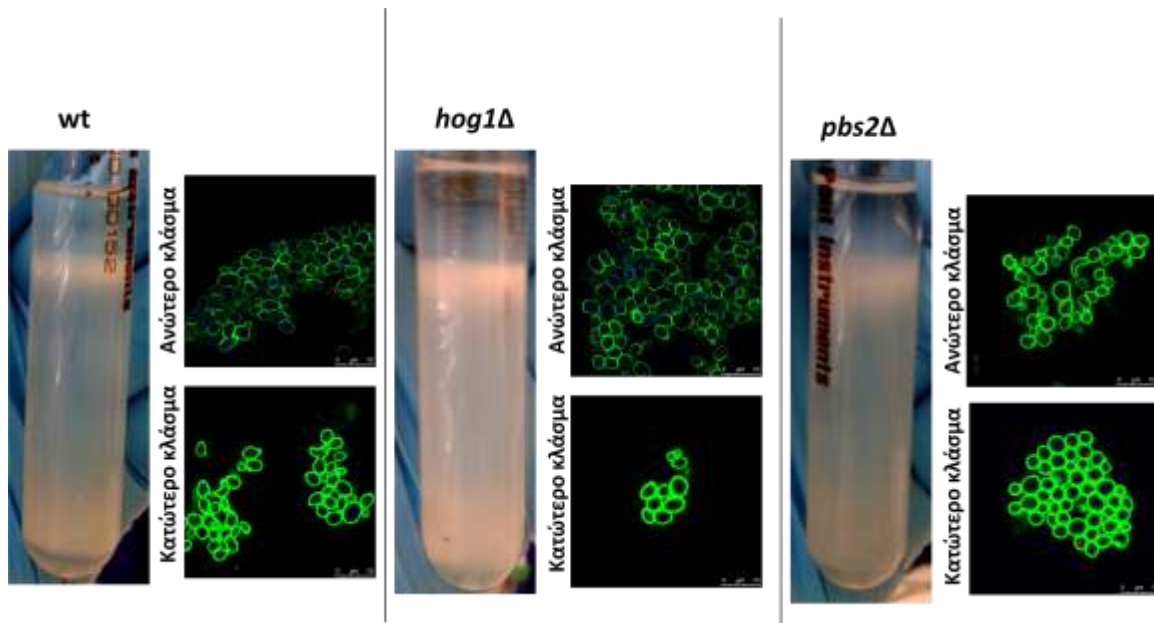
Στη συνέχεια τα *hog1Δ* και *pbs2Δ* κύτταρα εμβολιάζονται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για 15 και 30 λεπτά, στην συνέχεια ελέγχεται το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος με ειδική χρώση. Η απουσία τόσο του *hog1* όσο και του *pbs2* γονιδίου έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της μείωσης του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς η αλλαγή αυτή συμβαίνει κατά ανάκαμψη για 30 λεπτών (εικόνα 4.27).



Εικόνα 4.27: Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των *hog1Δ* και *pbs2Δ* κυττάρων στην στατική φάση και κατά την ανάκαμψη των 15 και 30 λεπτών. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

4.10.3 Τα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος των στελεχών *hog1Δ* και *pbs2Δ* έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα

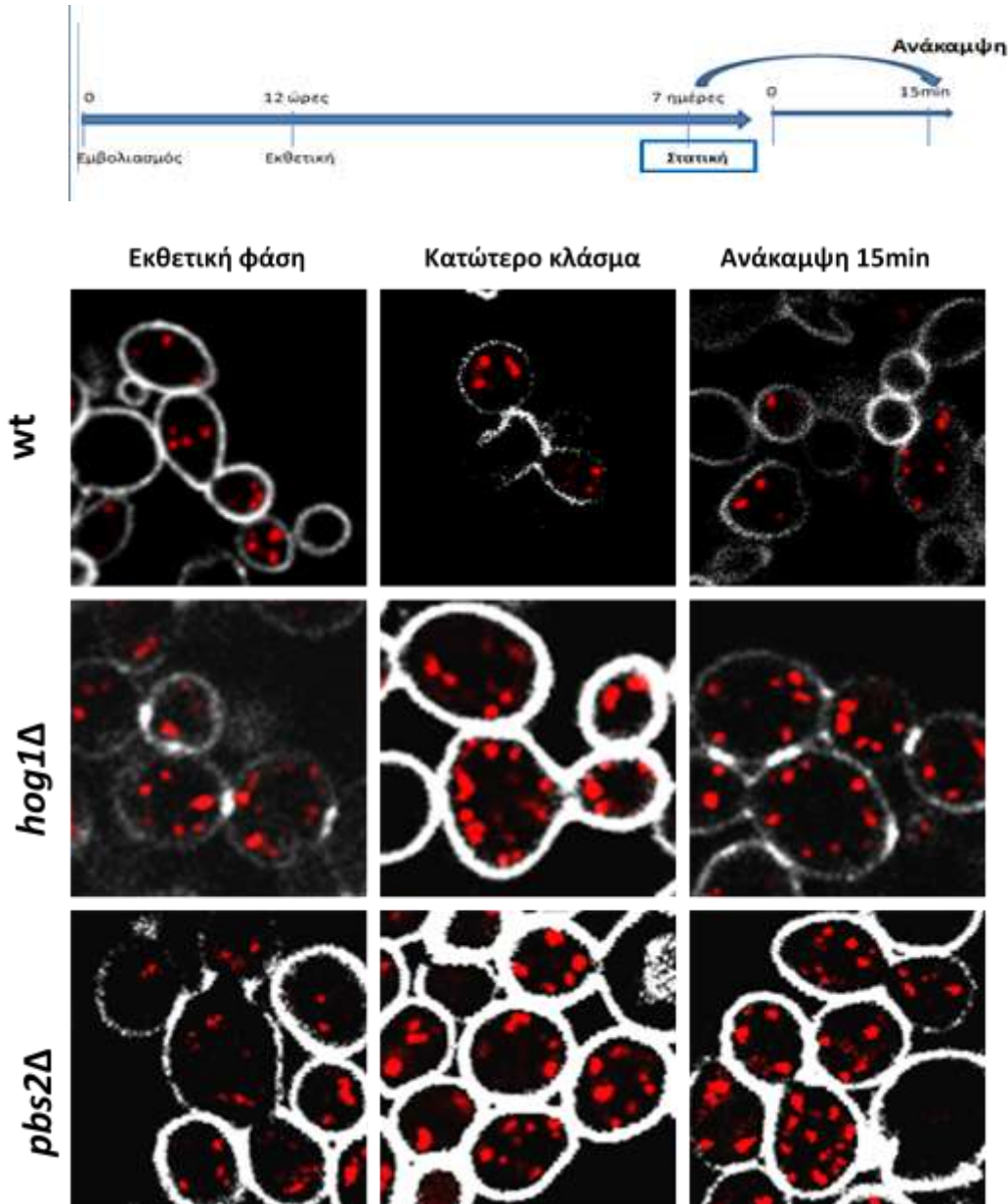
Τα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των *hog1Δ* και *pbs2Δ* στελεχών, έχουν ως αποτέλεσμα την διαφορετική κατανομή τους στο διάλυμα percoll. Τα κύτταρα αγρίου τύπου, όπως αναμένεται, μετά την κλασμάτωσή τους κατανέμονται σε δυο διακριτές φάσεις, το ανώτερο και το κατώτερο κλάσμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.26. Αντίθετα τα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*, παρόλο που κατανέμονται σε ανώτερο και κατώτερο κλάσμα, μεταξύ τους υπάρχει μια ενδιάμεση φάση στην οποία κατανέμονται κύτταρα ενδιάμεσου μεγέθους. Επιπλέον η σήμανση του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων των δυο κλασμάτων και των δυο στελεχών επιβεβαιώνει ότι το κατώτερο κλάσμα αποτελείται από κύτταρα που έχουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα (εικόνα 4.28).



Εικόνα 4.28: Η απεικόνιση των κλασμάτων του percoll στα *hog1Δ* (κέντρο), *pbs2Δ* (δεξιά) συγκριτικά με τα αγρίου τύπου (αριστερά) και η χρώση του κυτταρικού κλάσματος των κυττάρων που απομονώνονται από αυτά. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός: 100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη

4.10.4 Η οργάνωση της ακτίνης σε σωματίδια εξαρτάται από το μονοπάτι Hog1

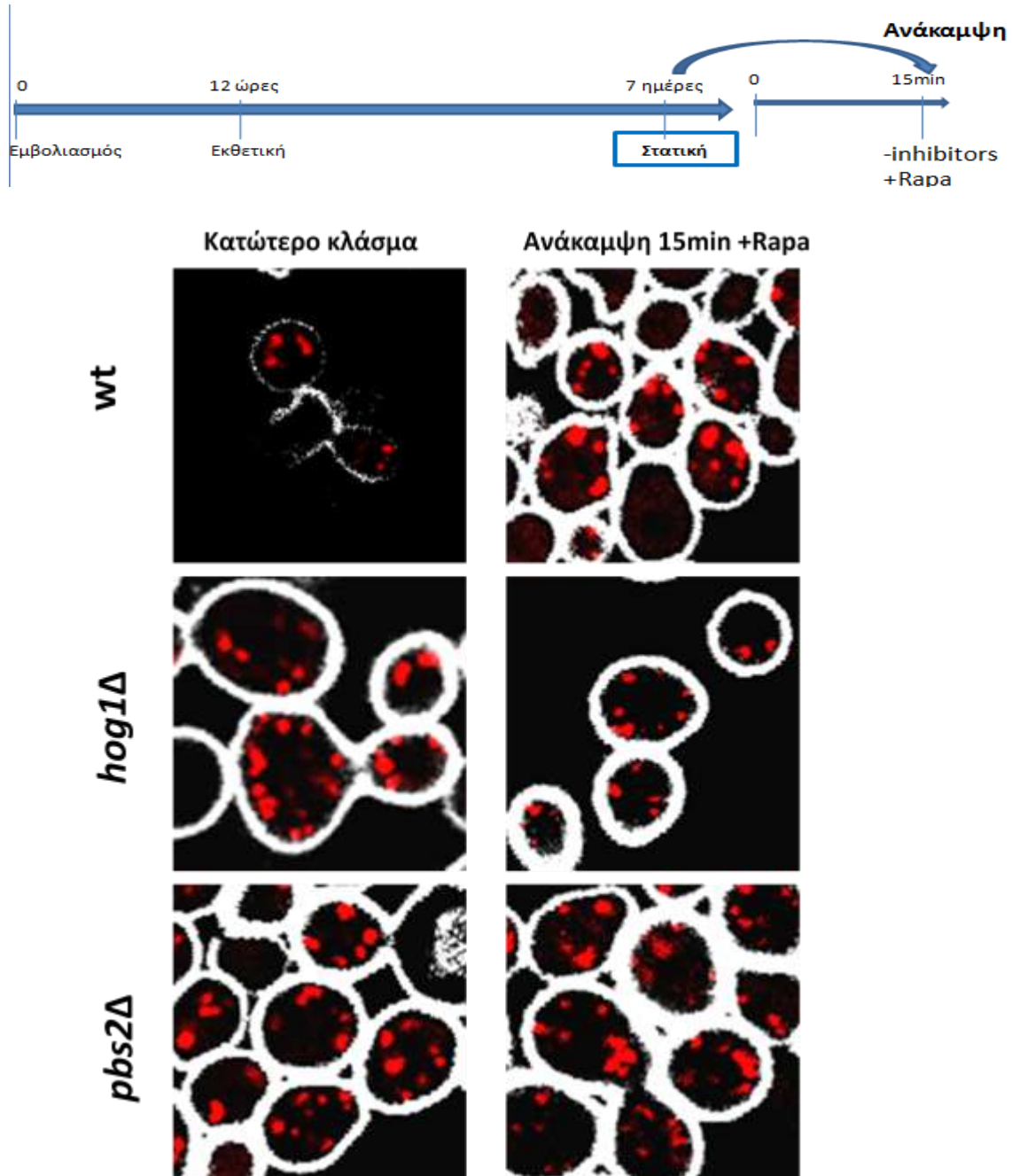
Όπως αναφέρθηκε σε αντίστοιχο κεφάλαιο της εισαγωγής (κεφάλαιο 1.4) και έπειτα από πειραματικές παρατηρήσεις η ακτίνη συμπυκνώνεται σε ειδικές δομές, τα σωματίδια ακτίνης, όταν εξαντλούνται τα θρεπτικά συστατικά. Η αλλαγή αυτή στην κατάσταση της ακτίνης δεν συμβαίνει και στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*. Η ακτίνη στα δύο αυτά στελέχη οργανώνεται σε κηλίδες ακτίνης τόσο στα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος, όσο και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά (εικόνα 4.29).



Εικόνα 4.29: Η οργάνωση της ακτίνης στην εκθετική φάση, το κατώτερο κλάσμα και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

4.10.5 Η απουσία του Hog1 και του TOR δεν επιτρέπει στην ακτίνη να αναδιοργανώνεται σε σωματίδια ακτίνης

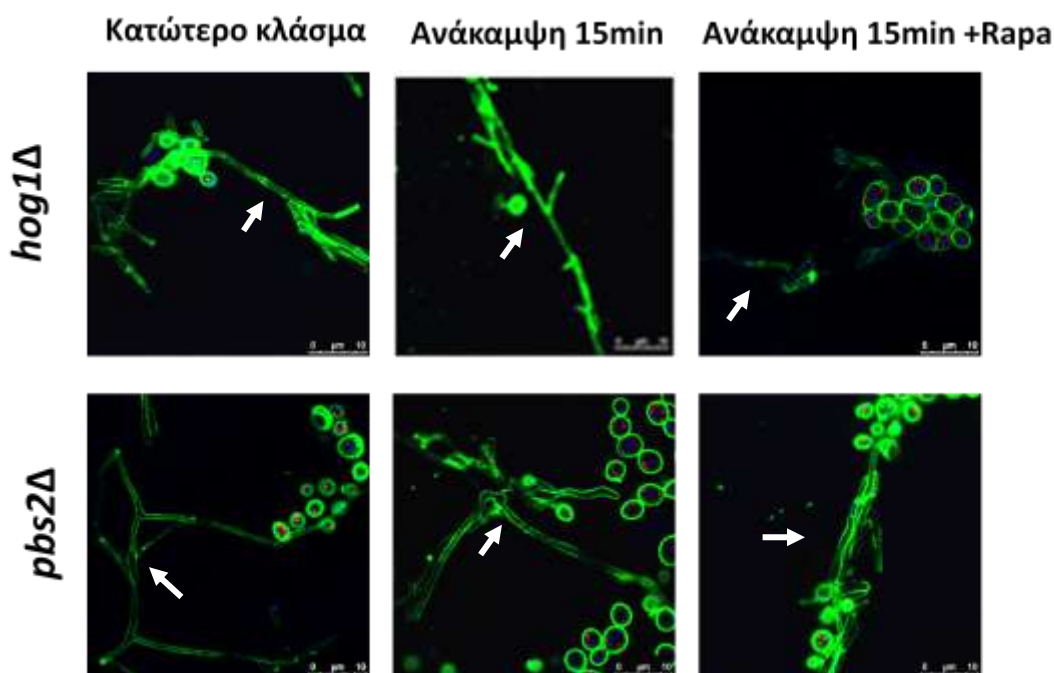
Η ανάκαμψη των *hog1Δ* και *rbs2Δ* κυττάρων για 15 λεπτά παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού TOR (ραπαμυκίνη) δεν επηρεάζει την οργάνωση της ακτίνης σε κηλίδες ακτίνης, όπως συμβαίνει στο αγρίου τύπου στέλεχος. Αυτό σημαίνει ότι η ταυτόχρονη αναστολή των μονοπατιών TOR και HOG1 δεν επηρεάζει την αναδιοργάνωση της ακτίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.30.



Εικόνα 4.30: Η οργάνωση της ακτίνης στο κατώτερο κλάσμα και κατά την ανάκαμψη για 15 λεπτά παρουσία ραπαμυκίνης στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 14,4$). **Κόκκινο:** ακτίνη, με άσπρο χρώμα φαίνονται τα όρια των κυττάρων

4.11 Η αναστολή του HOG1 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ψευδοϋφών

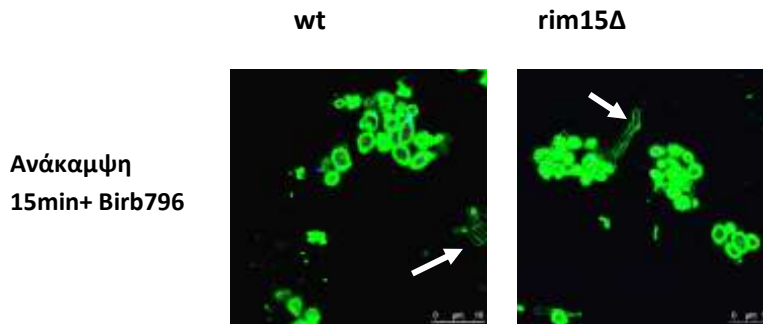
Η χρώση του κυτταρικού τοιχώματος των στελεχών *hog1Δ* και *hog4Δ* οδήγησε στην παρατήρηση ότι ανάμεσα στα κύτταρα που προέρχονται από το κατώτερο κλάσμα του percoll, σχηματίζονται επιμήκεις δομές. Αυτός ο διμορφισμός είναι ένα γνωστό φαινόμενο που συμβαίνει στα κύτταρα των μυκήτων. Το φαινόμενο αυτό είναι πολύπλοκο και πυροδοτείται από ποίκιλες αλλαγές που συμβαίνουν σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλάζονται το πρότυπο ανάπτυξης σε ελλειπτικές και νηματοειδείς μορφές κυττάρων. Οι μορφές αυτές είναι γνωστές, ως ψευδοϋφές (εικόνα 4.31) [Gancedo, 2001; Ceccato-Antonini *et al*, 2004].



Εικόνα 4.31: Απεικόνιση των ψευδοϋφών, που δημιουργούνται στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ* με την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και διατηρούνται και κατά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου, παρουσία και απουσία ραπαμυκίνης. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη, **μπλε:** πυρήνας

Η παρατήρηση της δημιουργίας των ψευδοϋφών συμβαίνει όταν αναστέλλεται το μονοπάτι HOG1, είτε μέσω της διαγραφής του γονιδίου *hog1* είτε μέσω της διαγραφής του γονιδίου *pbs2* κατά την ταυτόχρονη εξάντληση των θρεπτικών συστατικών

(κατώτερο κλάσμα). Η αλλαγή αυτή στην μορφολογία των κυττάρων παραμένει και κατά την ανάκαμψη των κυττάρων του κατώτερου κλάσματος, παρουσία και απουσία ραπαμυκίνης. Ακόμη, οι ψευδοϋφές σχηματίζονται σε μικρότερο βαθμό κατά την ανάκαμψη των *rim15Δ* και αγρίου τύπου κυττάρων, παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού HOG1 (εικόνα 4.32).

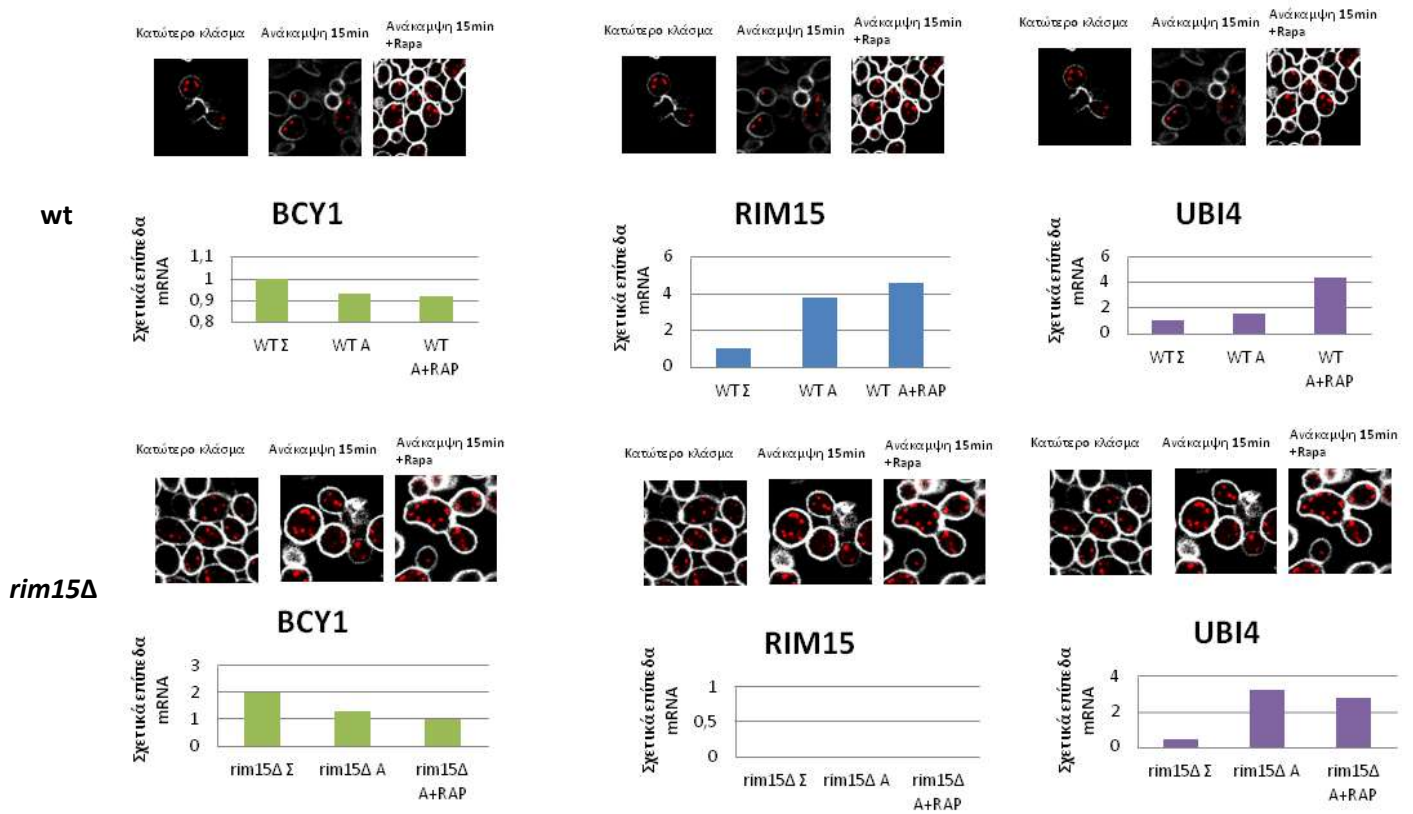


Εικόνα 4.32: Η δημιουργία των ψευδοϋφών συμβαίνει και κατά την ανάκαμψη των στελεχών *rim15* και του αγρίου τύπου, παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού HOG1. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο (φακός:100X, τεχνητή μεγέθυνση: $\times 3,2$). **Πράσινο:** κυτταρικό τοίχωμα, **κόκκινο:** ακτίνη, **μπλε:** πυρήνας

4.12 Η είσοδος στην στατική φάση έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων με διαφορετικό λειτουργικό ρόλο.

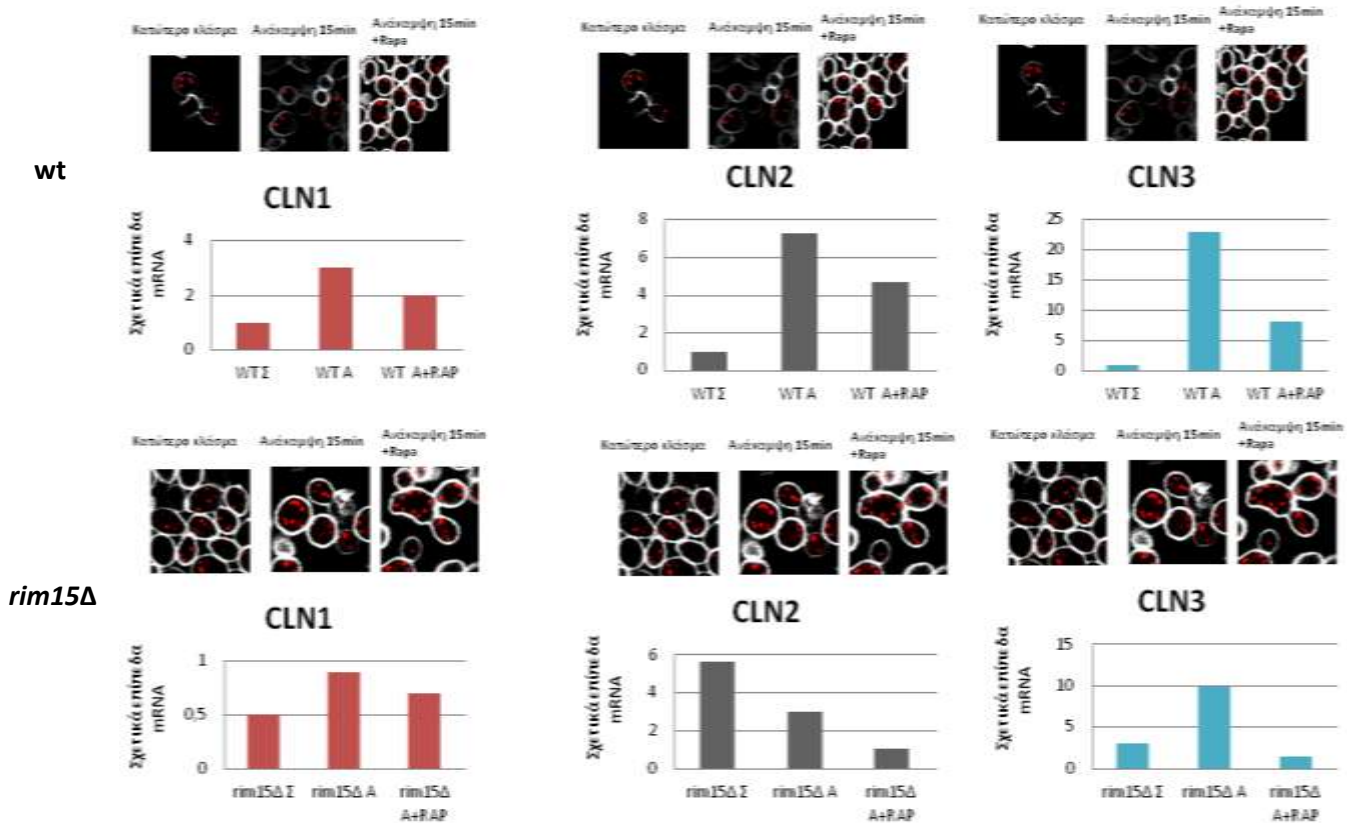
Για την καλύτερη κατανόηση των αλλαγών που συμβαίνουν κατά την είσοδο και την έξοδο από την στατική φάση, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των γονιδίων που βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι είναι απαραίτητα για την είσοδο στην στατική φάση. Ο έλεγχος έγινε στο αγρίου τύπου στέλεχος και στο στέλεχος *rim15Δ*. Η φυσιολογική είσοδος των κυττάρων στην στατική φάση έγινε με την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και την επακόλουθη κλασμάτωση πυκνότητας και για τα δύο στελέχη, και εν συνεχεία τον εμβολιασμό τους σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για 15 λεπτά, παρουσία και απουσία αναστολέων των μονοπατιών HOG1 και TOR. Έτσι σε αυτές τις συνθήκες ελέγχεται η έκφραση των γονιδίων της στατικής φάσης σε συνθήκες αναστολής και ενεργοποίησης των δυο μονοπατιών. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ελέγχονται με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-Time PCR).

Αρχικά ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *bcy1*, του οποίου η έκφραση αναμένεται να αυξάνεται. Το *bcy1* κωδικοποιεί την ρυθμιστική υπομονάδα της πρωτεΐνης PKA. Τα μεταγραφικά επίπεδα του *bcy1* παραμένουν σταθερά, εκτός από την περίπτωση των κυττάρων του κατώτερου κλάσματος στο στέλεχος *rim15Δ* (εικόνα 4.33).



Εικόνα 4.33: Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων *bey1*, *rim15* και *ubi4*.

Ένα ακόμη γονίδιο του οποίου τα μεταγραφικά επίπεδα ελέγχονται, είναι το *rim15*, το οποίο όπως ήταν αναμενόμενο παρουσιάζει μηδενική έκφραση στα *rim15Δ* κύτταρα. Ταυτόχρονα η έκφραση του γονιδίου αυτού αυξάνεται έντονα στις συνθήκες την ανάκαμψης παρουσία και απουσία αναστολέα, προτείνοντας τον πιθανό ρόλο του στην έξοδο από την στατική φάση (εικόνα 4.33). Αντίθετα το γονίδιο της ουβικιτίνης, το *ubi4* αυξάνεται έντονα κατά την ανάκαμψη παρουσία του αναστολέα ραπαμυκίνη καθώς και κατά την ανάκαμψη παρουσία και απουσία αναστολέα όταν λείπει το γονίδιο *rim15* (εικόνα 4.33). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού TOR, καθώς και η διαγραφή του γονιδίου *rim15* δημιουργούν στρες στο κύτταρο και επιστρατεύουν τον μηχανισμό της ουβικιτινίωσης για να αποικοδομήσει τις πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη από αυτές τις αλλαγές.



Εικόνα 4.34: Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων *cln1*, *cln2* και *cln3*

Στην συνέχεια ελέγχονται γονίδια, όπου η έκφραση του είναι ιδιαίτερα σημαντική για την πραγματοποίηση του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα ελέγχονται τα μεταγραφικά επίπεδα των κυκλινών της φάσης G1, *cln1*, *cln2*, *cln3*. Το γονίδιο της κυκλίνης *cln1* εκφράζεται έντονα κατά την ανάκαμψη, παρουσία και απουσία αναστολέα, αλλά η έκφραση αυτή μειώνεται απουσία του *rim15* (εικόνα 4.34).

Αντίθετα το γονίδιο της κυκλίνης *cln2* αυξάνεται στις συνθήκες ανάκαμψης αλλά εμφανίζει ιδιαίτερη αύξηση στα κύτταρα του κατώτερου κλάσματος των *rim15Δ*, αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι απουσία του *rim15*, τα κύτταρα αδυνατούν να εισέλθουν στην φάση G0 και σταματούν τον κυτταρικό τους κύκλο σε όψιμο στάδιο της G1 φάσης (εικόνα 4.34). Ταυτόχρονα η έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης *cln3* αυξάνεται έντονα κατά την ανάκαμψη των 15 λεπτών (εικόνα 4.34). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κυκλίνη *Cln3* είναι η πρώτη κυκλίνη που προσδένεται στην κινάση *cdc28* για να καταλυσει την έναρξη του κυτταρικού κύκλου. Η αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα της κυκλίνης αυτής κατά την ανάκαμψη, μαρτυρά την έναρξη διεργασιών που είναι απαραίτητες για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο. Το γονίδιο της *cln3* και κατά την ανάκαμψη απουσία *rim15*, που σημαίνει ότι και στις συγκεκριμένες συνθήκες το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο [Enserink, 2011].

5. Συζήτηση

Ένα βασικό ερώτημα που καλείται να απαντήσει σήμερα ο κλάδος της κυτταρικής βιολογίας είναι το πώς τα κύτταρα που αποκτούν αργό μεταβολικό ρυθμό, όπως είναι τα σπόρια στα βακτήρια και τα ανενεργά βλαστικά κύτταρα, εισέρχονται και πάλι στον κυτταρικό τους κύκλο. Ένας εύχρηστος οργανισμός μοντέλο στον οποίο έχει επίσης παρατηρηθεί το φαινόμενο αυτό είναι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*.

Ο ζυμομύκητας είναι ένας οργανισμός, του οποίου τα κύτταρα αναπαράγονται με εκβλάστηση. Το θυγατρικό κύτταρο εκφύεται από το μητρικό με μορφή εκβλαστήματος, μεγαλώνει σταδιακά ώσπου αποκόπτεται από αυτό έχοντας αποσπάσει τα κυτταρικά συστατικά που του είναι απαραίτητα. Η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών των κυττάρων αυτών οδηγεί στην είσοδο στην φάση G0. Τα κύτταρα της φάσης αυτής παρουσιάζουν αργό μεταβολικό ρυθμό.

Μια τυπική καλλιέργεια ζυμομύκητα διέρχεται από τα τυπικά στάδια ενός αναπτυσσόμενου πληθυσμού κυττάρων (λανθάνουσα φάση, εκθετική φάση, μεταδιεύξιμη φάση, στατική φάση) και περιλαμβάνει δύο κρίσιμα σημεία: την διαύξιμη μετατόπιση και το σημείο κορεσμού όπου τα κύτταρα λαμβάνουν σημαντικές αποφάσεις για το αν θα συνεχίσουν τον κυτταρικό τους κύκλο και εν τέλει θα οδηγηθούν σε απόπτωση ή αν θα εισέλθουν σε μια στατική φάση, την G0.

Η φάση G0, είναι μία αδρανής κατάσταση όπου τα κύτταρα παρουσιάζουν αργό μεταβολικό ρυθμό, ανικανότητα πολλαπλασιασμού, χαμηλά επίπεδα μεταγραφής και μετάφρασης, παχιά κυτταρικά τοιχώματα και η ακτίνη του κυτταροσκελετού τους συμπυκνώνεται σε ειδικές δομές, τα σωματίδια ακτίνης. Τα κύτταρα είναι ικανά να ανακάμπτουν μετά από ανανέωση του θρεπτικού μέσου και να εισέρχονται και πάλι στον κυτταρικό κύκλο.

Σημαντικό ρόλο στην είσοδο σε αυτή την φάση διαδραματίζουν τρία σηματοδοτικά μονοπάτια, το TOR, το PKA και το HOG1. Η απενεργοποίηση των TOR και PKA έχει συσχετιστεί με εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και ακολούθως με την είσοδο στην στατική φάση. Το μονοπάτι TOR αντιλαμβάνεται τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών, όντας ενεργό όταν είναι άφθονα και ανενεργό όταν εξαντλούνται. Η απενεργοποίηση του TOR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κίνησης Rim15, η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην είσοδο στην φάση G0. Ταυτόχρονα η εξάντληση της γλυκόζης φαίνεται να ενεργοποιεί το μονοπάτι HOG1, ως απόκριση στο στρες που δημιουργεί αυτή η αλλαγή.

Η παρούσα έρευνα είχε ως στόχο την αποσαφήνιση του ρόλου του μονοπατιού HOG1 στην είσοδο στην στατική φάση και την πιθανή αλληλεπίδρασή του με το

μονοπάτι TOR. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BY4742, το οποίο αναπτύχθηκε έως εξαντλήσεως των θρεπτικών συστατικών, κλασματώθηκε με ειδική μεθοδολογία, ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα που παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά της φάσης G0 και στην συνέχεια τα κύτταρα της βάσης αυτής εμβολιάστηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο παρουσία και απουσία αναστολέων των δύο μονοπατιών.

Για τον έλεγχο της επίδρασης των μορίων Rim15, Hog1 και Pbs2 στην είσοδο στην στατική φάση, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *rim15Δ*, *hog1Δ* και *pbs2Δ*, τα οποία αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες με το αγρίου τύπου στέλεχος (BY4742). Αρχικά πραγματοποιήθηκε μορφολογικός έλεγχος των 4 στελεχών, καθώς και η χρώση τους για τον έλεγχο του κυτταρικού τοιχώματος και της οργάνωσης της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Τέλος, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων της στατικής φάσης και του κυτταρικού κύκλου.

Είναι γεγονός ότι το κυτταρικό τοίχωμα προσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου για επιβίωση στις εκάστοτε συνθήκες ανάπτυξης. Η μείωση του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος κατά την ανάκαμψη του στελέχους αγρίου τύπου, δηλώνει την έξοδο από τη στατική φάση 15 λεπτά μετά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου. Ταυτόχρονα, η ακτίνη αναδιοργανώνεται με τρόπο εξαρτώμενο από το μονοπάτι TOR και ανεξάρτητο από το μονοπάτι HOG1.

Η απουσία του γονιδίου *rim15* έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά της φάσης G0 κατά την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών, έτσι τα *rim15Δ* κύτταρα αδυνατούν να εισέλθουν στην φάση G0. Επιπλέον, το μονοπάτι TOR πιθανότατα υπερενεργοποιείται απουσία του γονιδίου *rim15*, γεγονός που φαίνεται από την οργάνωση της ακτίνης σε σωματίδια, όταν αναστέλλεται το TOR. Ακόμη η αύξηση των επιπέδων του γονιδίου *rim15* κατά την ανάκαμψη δηλώνει ότι το γονίδιο *rim15* είναι απαραίτητο και για την έξοδο από την φάση G0.

Αναφορικά με τις αλλαγές στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων της στατικής φάσης, απουσία του *rim15* έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή υπερέκφραση του γονιδίου *bcy1* στην στατική φάση και το γονίδιο της *ubi4*, αυξάνεται όταν αναστέλλεται το TOR. Αντίθετα η έκφραση των γονιδίων των κυκλινών, μορίων σημαντικών για την έναρξη και πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, αυξάνεται κατά την ανάκαμψη, δηλώνοντας την έναρξη του κυτταρικού κύκλου.

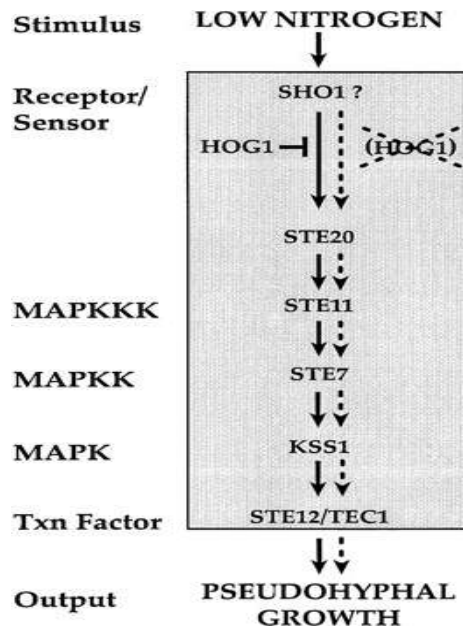
Η αναστολή του μονοπατιού HOG1 μέσω διαγραφής των γονιδίων *hog1* και *pbs2* έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ψευδοϋφών, κάτι που δεν αλλάζει με την ανανέωση του θρεπτικού μέσου. Η ανάπτυξη των ψευδοϋφών τόσο στα απλοειδή όσο και στα διπλοειδή στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* αντανakλά συντονισμένες αλλαγές σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως, το μοτίβο εκβλάστησης, την επιμήκυνση των

κυττάρων και την προσκόλληση τους. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται από περιβαλλοντικά σήματα και ελέγχονται από αρκετές οδούς, οι οποίες δρουν παράλληλα [Gancedo, 2001; Ceccato-Antonini *et al*, 2004].

Συγκεκριμένα, η εξάντληση του αζώτου και πιθανόν και άλλα είδη στρες, ενεργοποιούν ένα μονοπάτι MAP κινασών, το οποίο έχει ως τελικό στόχο τον μεταγραφικό παράγοντα Ste12. Επιπλέον, μια οδός εξαρτώμενη από το cAMP, στην οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η πρωτεϊνική κινάση Trk2, απαιτείται για την διακοπή των μορφογενετικών αλλαγών.

Τα μονοπάτια MAPK στις ζύμες είναι τρία: το μονοπάτι HOG1 (high osmolarity glycerol pathway), το μονοπάτι απόκρισης στις φερομόνες (pheromone response pathway) και το μονοπάτι ανάπτυξης ψευδοϋφών (pseudohyphal/invasive growth pathway). Τα τρία αυτά μονοπάτια χρησιμοποιούν πολλά κοινά σηματοδοτικά μόρια και πολλές φορές μπορεί να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα μεταλλάξεις στα γονίδια *hog1* και *rbs2* έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης των φερομονών, η οποία επάγεται λόγω υψηλής ωσμωμοτικότητας [O'Rourke *et al*, 1998;].

Επιπλέον, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1 η εξάντληση της πηγής αζώτου μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ψευδοϋφών, μια διαδικασία την οποία αναστέλλει η ενεργοποίηση της κινάσης HOG1. Η διαγραφή του γονιδίου *hog1* έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της ανάπτυξης των ψευδοϋφών.



Εικόνα 5.1: Το μονοπάτι ανάπτυξης των ψευδοϋφών στις ζύμες

Μελλοντικά πειράματα που θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν για την πρόοδο της παρούσας μελέτης είναι επαναληπτικός έλεγχος των γονιδίων που εμπλέκονται στην είσοδο στην στατική φάση και στον κυτταρικό κύκλο στα στελέχη *wt* και *rim15Δ*. Επιπλέον είναι απαραίτητος ο περαιτέρω έλεγχος των γονιδίων που εμπλέκονται στην είσοδο στην στατική φάση και στον κυτταρικό κύκλο στα στελέχη *hog1Δ* και *pbs2Δ*.

Τέλος, η ολική πρωτεομική ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε συνθήκες αναστολής και ενεργοποίησης των δυο μονοπατιών και η μελέτη των συνθηκών δημιουργίας των ψευδοϋφών και έλεγχος αναστρεψιμότητας του φαινομένου με την ενεργοποίηση του μονοπατιού Hog1 θα δώσουν σημαντικές πληροφορίες για τον ρόλο των δύο μονοπατιών στην είσοδο στην στατική φάση.

Βιβλιογραφία

Παπαγεωργίου Κυριακή. Εγκαθίδρυση των συνθηκών για την πρωτεομική ανάλυση κυττάρων ζύμης σε συνθήκες ενεργοποίησης ή αδρανοποίησης του μονοπατιού TOR. Μεταπτυχιακή διατριβή, Ιωάννινα 2012

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Δεύτερη Έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2006. Κεφ 1 (σελ.34). Κεφ. 17

Aragon A.D., Rodriguez A. L., Meirelles O., Roy S., Davidson G. S., Tapia Ph. H., Allen Ch., Joe R., Benn D. and Werner-Washburne M. Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 19, 1271-1280, March 2008

Ban N, et al. (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol* 24:165-9

Bartlett JMS, Stirling D, A short History of the Polymerase Chain Reaction, *Methods in Molecular Biology*, volume 226, 2003, pp3-6

Bernard A, et al. (2015) Rph1/KDM4 mediates nutrient-limitation signaling that leads to the transcriptional induction of autophagy. *Curr Biol*25(5):546-55

Bisschops MM, Zwartjens P, Keuter SG, Pronk JT, Daran-Lapujade P, To divide or not to divide: a key role of Rim15 in calorie-restricted yeast cultures, *Biochim Biophys Acta*. 2014 May;1843(5):1020-30

Boorstein WR, Craig EA, Transcriptional regulation of SSA3, an HSP70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol*. 1990 Jun;10(6):3262-7

Braun EL¹, Fuge EK, Padilla PA, Werner-Washburne M, A stationary-phase gene in *Saccharomyces cerevisiae* is a member of a novel, highly conserved gene family, *J Bacteriol*. 1996 Dec;178(23):6865-72

Brejning J., Jespersen L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 75(2002) 27-38

Ceccato-Antonini SR, Sudbery PE, Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*, Braz. J. Microbiol. vol.35 no.3 São Paulo July/Sept. 2004

Chien A, Edgar DB, Trela JM, Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, J Bacteriol. 1976 Sep; 127(3): 1550–1557

Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM, Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiol Rev. 2014 Mar;38(2):254-99

Constanzo M., Nishikawa J. L., Tang X., Millman J. S., Schub O., Breitzkreuz K., Dewar D., Rupes I., Andrews B. and Tyers M. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S Transcription in yeast. Cell, Vol. 117, 899-913, June 25, 2004

Duch A., Eulalia de Nadal, Posas F. The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses. FEBS Letters 586 (2012) 2925-2931

**Enserink JM. Cell cycle regulation of DNA Replication in *S. cerevisiae*.
www.intechopen.com**

Escote X., Miranda M., Rodriguez-Porrata B., Mas A., Cordero R., Posas F. and Vendrell J. The stress-activated protein kinase Hog1 develops a critical role after resting state. Molecular Microbiology (2011) 80 (2), 423-435

**Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A,
The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses, Cell. 1987 Mar 27;48(6):1035-46**

Galdieri L., Mehrotra S., Yu S. and Vancura A. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. OMICS A Journal of Integrative Biology. Volume 14, Number 6, 2010

Gancedo JM, Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiol Rev. 2001 Jan;25(1):107-23

Ghosh I, Kundu B, Gothwal R, Essential role of HSP26 in stress tolerance of yeast during ethanolic fermentation, Biological Forum-An International Journal, 2(2): 78-82(2010)

Gray J. V., Petsko G. A., Johnston G. C., Ringe D., Singer R. A. and Werner-Washburne M. “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004, 68 (2):187

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, Real time quantitative PCR, *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94

Herman P. K. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5:602-607

http://www.pha.jhu.edu/~ghzheng/old/webct/note7_3.htm

Huang X, et al. (2012) Down-regulating sphingolipid synthesis increases yeast lifespan. *PLoS Genet* 8(2):e1002493

Jiang B, et al. (1995) Regulation of cell wall beta-glucan assembly: PTC1 negatively affects PBS2 action in a pathway that includes modulation of EXG1 transcription. *Mol Gen Genet* 248(3):260-9

Klis FM, Boorsma A, De Groot PW, Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*. 2006 Feb;23(3):185-202

Klosinska M. M., Crutchfield Ch. A., Bradley P. H., Rabinowitz J. D. and Broach J. R. Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes & Development* 25:336-349, 2011

Koch Ch., Schleiffer A., Ammerer G. and Nasmyth K. Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes & Development*. 10:129-141.1996

Kwon-Chung KJ, Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives, *Clin Infect Dis*. 2012 Feb;54 Suppl 1:S8-S15

Laporte D., Lebaudy A., Sahin A., Pinson B., Ceschin J., Daignan-Fornier B. and Sagot I. Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *J. Cell. Biol.* 2011 March 14. Vol. 192. No 6. 946-957

Lawer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang Sh, Landre Ph, Abramson RD, Gelfand DH, High-level Expression, Purification and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity, *PCR Methods and Applications*, 2:275-287, 1993

Levin D E, Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005 Jun; 69(2): 262–291

Lewin Benjamin, *Genes VIII*. Ακαδημαϊκές εκδόσεις, 2004, τόμος II, κεφ 29

Lin M, et al. (2009) The Cdc42 effectors Ste20, Cla4, and Skm1 down-regulate the expression of genes involved in sterol uptake by a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Mol Biol Cell* 20(22):4826-37

Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock: Βιολογία των μικροοργανισμών. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2010, τόμοςI, κεφ. 14, σελ 562-563

Mira NP, et al. (2009) The RIM101 pathway has a role in *Saccharomyces cerevisiae* adaptive response and resistance to propionic acid and other weak acids. *FEMS Yeast Res* 9(2):202-16

Mizunuma M., Ogawa T., Koyama T., Shitamukai A., Tsubakiyama R., Komaruyama T., Yamaguchi T., Kume K. and Hirata D. Evidence of antagonistic regulation of restart from G1 delay in response to osmotic stress by the Hog1 and Whi3 in budding yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77 (10), 2002-2007, 2013

Muller B., Grossniklaus U. Model organisms- A historical perspective. *Journal of proteomics.* 73 (2010) 2054-2063

Nishizawa M, Komai T, Morohashi N, Shimizu M, Toh-e A, Transcriptional repression by the Pho4 transcription factor controls the timing of S NZ1 expression, *Eukaryot Cell.* 2008 Jun;7(6):949-57

O'Rourke SM, Herskowitz I, The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.* 1998 Sep 15;12(18):2874-86

Padilla PA¹, Fuge EK, Crawford ME, Errett A, Werner-Washburne M, The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation, *J Bacteriol.* 1998 Nov;180(21):5718-26

Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI, Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications, *Trends in Biotechnology*, volume 22, issue 5, p 253-260, 1 May 2004

Pedruzzi I, Dubouloz F, Cameroni E, Wanke V, Roosen J, Winderickx J, De Virgilio C, TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0, *Mol Cell.* 2003 Dec;12(6):1607-13

Planta RJ and Mager WH (1998) The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(5):471-7

Prick T, et al. (2006) Deletion of HOG1 leads to Osmosensitivity in starvation-induced, but not rapamycin-dependent Atg8 degradation and proteolysis: further evidence for different regulatory mechanisms in yeast autophagy. *Autophagy* 2(3):241-3

Rai R., Tate J. J., Nelson D. R. and Cooper T. G. Gln3 mutations dissociate responses to nitrogen limitation (nitrogen catabolite repression) and rapamycin inhibition of TORC1. *The Journal of Biological Chemistry*. January 25, 2013. Volume 288. No 4, pp. 2789-2804

Reinders A, Bürckert N, Boller T, Wiemken A, De Virgilio C, *Saccharomyces cerevisiae* cAMPdependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase, *Genes Dev*. 1998 Sep 15;12(18):2943-55

Rodríguez-Navarro S¹, Llorente B, Rodríguez-Manzanque MT, Ramne A, Uber G, Marchesan D, Dujon B, Herrero E, Sunnerhagen P, Pérez-Ortín JE, *Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6, *Yeast*. 2002 Oct;19(14):1261-76*

Ronit Weisman. *Fission Yeast TOR and Rapamycin*. In Mike Hall and Fuyuhiko Tamanoi: *The Enzymes*, Vol. 27, Burlington: Academic Press, 2010, pp.251-269

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE, *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucleic Acids Research*, volume 18, issue 21, pp 6409-6412, 1990*

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, vol.239, no. 4839, pp. 487-491, 29 January 1988*

Sagot I., Pinson B., Salin B. and Daignan-Fornier B. *Actin Bodies in Yeast Quiescent Cells: An Immediately Available Actin Reserve?* *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 17, 4645–4655, November 2006

Simon JR, Treger JM, McEntee K, *Multiple independent regulatory pathways control UBI4 expression after heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Microbiol*. 1999 Feb;31(3):823-32*

Schmelzle T. and Hall M. N. *TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, Vol. 103, 253-262, October 13, 2000*

Schmidt M, et al. (2012) Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 158(Pt 10):2667-78

Stotheim J. M., Di Talia S., Siggia E. D. and Cross F. R. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* 2008, July 17, 454 (7202): 291-296

Swinnen E, Wanke V, Roosen J, Smets B, Dubouloz F, Pedruzzi I, Cameroni E, De Virgilio C, Winderickx J, Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Div.* 2006 Apr 3;1:3

Tkacz L.S., Barbara Cybulska E. and Lampen J. O. Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. *Journal of Bacteriology*. January 1971. Vol. 105. No.1. p. 1-5

Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R, Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):663-74

Vallejo MC, Mayinger P, Delayed Turnover of Unphosphorylated Ssk1 during Carbon Stress Activates the Yeast Hog1 Map Kinase Pathway, *PlosOne*, September 4, 2015

Varela JC, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ, Mager WH, The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A, *Mol Cell Biol*. 1995 Nov;15(11):6232-45

Wagner M. V., Smolka M. B., de Bruin R. A. M., Zhou H., Wittenberg C., Dowdy St. F. Whi5 regulation by site specific CDK phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*. January 28, 2009

Watson, J D; Baker, T A; Bell, S P; Gann, A; Levine, M; Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.

Weinberger M, et al. (2007) DNA replication stress is a determinant of chronological lifespan in budding yeast. *PLoS One* 2(8):e748

Winsor B, Schiebel E, Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton, *Yeast*. 1997 Apr;13(5):399-434

