

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Λειτουργική ανάλυση της μικρής πρωτεΐνης θερμικής καταπληξίας Hsp26: μικροσκοπική ανάλυση του υβριδίου Hsp26-GFP σε συνθήκες ακραίας θερμοπληξίας και αλληλεπίδραση με P-bodies στον *S.cerevisiae*.»



*S.cerevisiae*. Photo published in *Microbiol. Rev.* 54: 381-431, 1990

ΑΛΑΓΑΝΤΑΚΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

A.M. 1585

Υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Τζαμαρία

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η λειτουργική ανάλυση της μικρής πρωτεΐνης θερμικής καταπληξίας Hsp26 στον σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*.

Το πρώτο σκέλος της εργασίας αποτελείται από τη μικροσκοπική παρατήρηση του υβριδίου Hsp26-GFP σε συνθήκες ακραίας θερμοπληξίας (46 ° C). Παρατηρήθηκε πως το συγκεκριμένο υβρίδιο ενώ εμφανίζεται ως κηλίδα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου του σακχαρομύκητα κατά την στατική φάση, έπειτα από ακραίο θερμικό σοκ διαχέεται σε όλο το κυτταρόπλασμα. Η συμπεριφορά αυτή φαίνεται να συμφωνεί με την ήδη γνωστή παρατηρούμενη *in vitro* συμπεριφορά της Hsp26.

Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας στόχος ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Hsp26 με τα processing bodies (P-bodies), τα οποία αποτελούν συσσωματώματα RNA- πρωτεϊνών με κύριο ρόλο στην καταστολή της μετάφρασης των mRNAs και στην αποικοδόμησή τους. Μικροσκοπική παρατήρηση του υβριδίου της πρωτεΐνης Dhh1 των P-bodies με GFP έδειξε πως εμφανίζει την ίδια συμπεριφορά παρουσία και απουσία της Hsp26 σε όλες τις παρατηρούμενες συνθήκες.

## ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

### **ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>: Η μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp26**

#### ***1.1. Απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες***

Η ικανότητα των διαφόρων οργανισμών να αποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους είναι καθοριστική για την επιβίωσή τους. Τα κύτταρα όλων των οργανισμών έχουν αποκτήσει την ικανότητα να αισθάνονται και να προσαρμόζονται γρήγορα στις διάφορες στρεσογόνες συνθήκες του περιβάλλοντός τους, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν αλλαγές στην θερμοκρασία και στο pH, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, στέρηση θρεπτικών συστατικών, παρουσία χημικών τοξινών ή ιόντων βαρέων μετάλλων κ.α. [1]

Τα κύτταρα τα οποία υφίστανται κάποιο τέτοιο στρες μπορούν να αποκριθούν σε αυτό και να προσαρμοστούν μεταβάλλοντας τις μεταβολικές τους διεργασίες, παύοντας την ανάπτυξή τους και εκφράζοντας ειδικές πρωτεΐνες απόκρισης προς την εκάστοτε στρεσογόνο συνθήκη.

#### ***1.2. Πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (Heat Shock Proteins)***

Μία από τις πιο συχνές στρεσογόνες συνθήκες για τα κύτταρα ενός οργανισμού είναι η αύξηση της θερμοκρασίας. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αποκρίνονται αυξάνοντας την έκφραση ειδικών πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας, γνωστών και ως heat shock proteins (HSPs).

Οι heat shock proteins είναι μοριακοί συνοδοί (σαπερόνες), απαραίτητες για τη διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών, καθώς εμποδίζουν τη λανθασμένη αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων και βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Είναι οι πιο συντηρημένες φυλογενετικά πρωτεΐνες και είναι παρούσες σε όλους τους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι περισσότερες HSPs εκφράζονται συστατικά, σε χαμηλότερα επίπεδα, αλλά τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας.[2-4]

Διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, για παράδειγμα το κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, έχουν εξειδικευμένες HSPs, κατάλληλες για να αποκρίνονται στις ανάγκες του καθενός. Παρόλα αυτά, και παρά τα διαφορετικά μοριακά τους βάρη, οι HSPs έχουν κάποιες κοινές λειτουργικές επικράτειες: μια επικράτεια πρόσδεσης νουκλεοτιδίου αδενίνης, που προσδένει και υδρολύει ATP, και μία επικράτεια πρόσδεσης πεπτιδίου, που προσδένει εκτεθειμένα υδροφοβικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών- υποστρωμάτων.[2-4] Η πρόσδεση ATP προκαλεί μια καίριας σημασίας αλλαγή στη στεροδιάταξη, που οδηγεί στην απελευθέρωση της προσδεμένης πρωτεΐνης. [2, 3, 5, 6]

Λόγω του ότι η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με μία ή περισσότερες σαπερόνες, οι θέσεις πρόσδεσης πεπτιδίων

των HSPs παρουσιάζουν -κατ' ανάγκη- ευρεία εξειδίκευση και η πρόσδεση υποβοηθείται από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Έτσι, οι HSPs αναμένεται να προσδέουν και άλλα μη-πρωτεϊνικά μόρια με εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα. [2, 3, 7]

### 1.3. Απόκριση στο θερμικό σοκ στον *S.cerevisiae*

Ο σακχαρομύκητας *S.cerevisiae* (yeast) αναπτύσσεται βέλτιστα σε θερμοκρασία 30°C. Όταν η θερμοκρασία υπερβεί τους 30°C, τότε τα κύτταρα επάγουν απόκριση προς το θερμικό σοκ (heat shock response). Η απόκριση προς το θερμικό σοκ στο yeast διαμεσολαβείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Hsf1 και Msn2/Msn4 και περιλαμβάνει αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. [8]

Η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων πρωτεϊνών θερμικού σοκ ρυθμίζεται από έναν μόνο εκ των δύο προαναφερθέντων μεταγραφικών παραγόντων, ενώ η μεταγραφή κάποιων άλλων γονιδίων πρωτεϊνών θερμικού σοκ (π.χ. HSP26 και HSP 104) ρυθμίζεται και από τους δύο αυτούς παράγοντες. Ο παράγοντας Hsf1 συμμετέχει τόσο στην απόκριση προς το θερμικό σοκ, όσο και στην απόκριση προς το οξειδωτικό στρες και την στέρηση γλυκόζης. [9, 10] Οι παράγοντες Msn2/Msn4 παίζουν ρόλο σε μια μεγάλη ποικιλία αποκρίσεων προς κυτταρικές και περιβαλλοντικές στρεσογόνες συνθήκες, πέραν της απόκρισης προς το θερμικό σοκ.[11]

Έχει δειχθεί πως κατά την απόκριση στο θερμικό σοκ οι παράγοντες αυτοί έχουν διαφορετικούς ρόλους: ο Hsf1 είναι απαραίτητος για την ανάκαμψη του σακχαρομύκητα μετά από σύντομη έκθεση σε ακραία θερμοκρασία, ενώ οι Msn2/Msn4 είναι απαραίτητοι για μακροπρόθεσμη επιβίωση σε υψηλές θερμοκρασίες.[12]

Και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται, οι θερμοευαίσθητες πρωτεΐνες του σακχαρομύκητα τείνουν να ξεδιπλώνονται και να δημιουργούν συσσωματώματα, με καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο. Ο ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, λοιπόν, είναι να προστατεύουν τις ξεδιπλωμένες αυτές πρωτεΐνες από το να αναδιπλωθούν λανθασμένα και να σχηματίσουν συσσωματώματα. Έτσι, οι HSPs αναγνωρίζουν και προσδέουν τα υδρόφοβα κατάλοιπα που εκτίθενται όταν οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται, επιτρέποντάς τους να αναδιπλωθούν και πάλι σωστά.

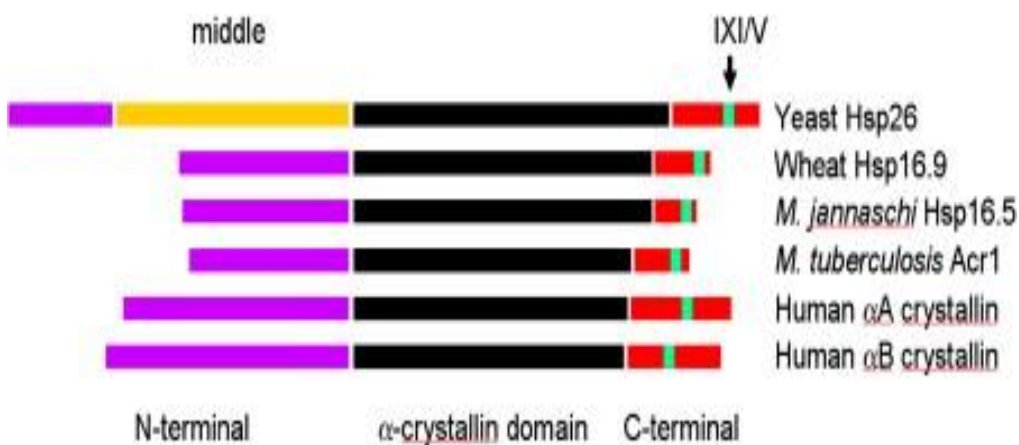
Οι κυριότερες HSPs στον *S.cerevisiae* είναι οι Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp30 και Hsp26. [13-16]

Στην συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθούμε στη μελέτη μίας εξ αυτών των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, της Hsp26.

#### 1.4 Η μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp26

Η πρωτεΐνη Hsp26 ανήκει στην οικογένεια των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (small heat shock proteins, sHsps), οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα από ποικίλες στρεσογόνες συνθήκες, όπως το θερμικό και το οξειδωτικό στρες, εμποδίζοντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων [17-19].

Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες σχηματίζουν δυναμικές ολιγομερείς δομές, αποτελούμενες από 9-50 υπομονάδες. Οι sHsps περιέχουν μία συντηρημένη επικράτεια  $\alpha$ -crystallin -αποτελούμενη από 80-100 αμινοξέα- στο καρβοξυτελικό τους άκρο και μία μεταβλητή ως προς το μήκος και την αλληλουχία αμινοτελική περιοχή [20, 21] (Εικόνα 1). Η αλληλουχία της επικράτειας  $\alpha$ -crystallin εμφανίζει υψηλή ομολογία προς την οικογένεια των  $\alpha$ -crystallins, οι οποίες αποτελούν ένα μεγάλο μέρος του φακού των ματιών των σπονδυλωτών.



**Εικόνα 1:** Σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών διαφόρων sHsps. Η επικράτεια  $\alpha$ -crystallin είναι πολύ συντηρημένη, ενώ η αμινοτελική περιοχή είναι αρκετά μεταβλητή.

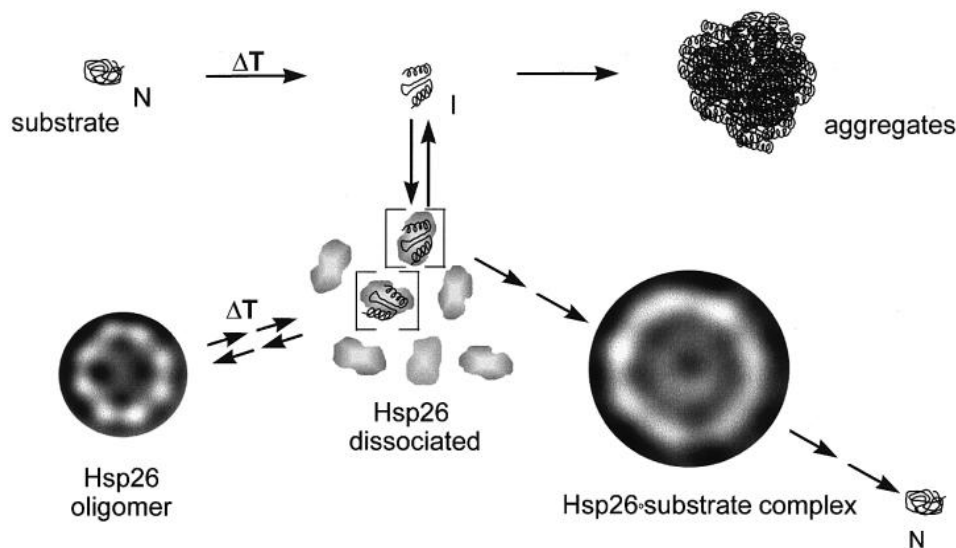
Στο yeast, υπάρχουν δύο sHsps, η Hsp26 και η Hsp42. Και οι δύο εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα όταν τα κύτταρα προετοιμάζονται για να μουν στην στατική φάση (stationary phase), καθώς και όταν υφίστανται θερμικό σοκ.[22]

Η Hsp26, όπως και άλλες μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ, σχηματίζει μεγάλα ολιγομερή σύμπλοκα, αποτελούμενα από 24 υπομονάδες. Όμως, σε συνθήκες θερμικού σοκ τα σύμπλοκα αυτά διαχωρίζονται σε διμερή, τα οποία και προσδένουν τις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, εμποδίζοντας τη συσσωμάτωσή τους.

Σύμφωνα με τη δημοσίευση των Haslbeck *et.al* [23] προτάθηκε το εξής μοντέλο για τη λειτουργία της Hsp26 (Εικόνα 2):

- Υπό φυσιολογικές συνθήκες η Hsp26 σχηματίζει μεγάλα ολιγομερή σύμπλοκα τα οποία είναι ανενεργά.
- Ύστερα από την αύξηση της θερμοκρασίας και το επακόλουθο ξεδίπλωμα των θερμοευαίσθητων πρωτεϊνών, τα 24μερή σύμπλοκα της Hsp26 διασπώνται σε διμερή.

- Το κάθε ένα από αυτά τα διμερή αναγνωρίζει ειδικά και προσδένει μία ξεδιπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα
- Τα σύμπλοκα διμερών-πολυπεπτιδίων συναρμολογούνται σε μεγάλα σύμπλοκα Hsp26-πολυπεπτιδίων με συνεργατικό τρόπο
- Η ξεδιπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα διαχωρίζεται από το σύμπλοκο είτε αυθόρμητα, ή με τη βοήθεια άλλων σαπερονών και αναδιπλώνεται στη φυσική της κατάσταση (βλ. ενότητα 1.5.)
- Όταν η θερμοκρασία επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα η Hsp26 σχηματίζει ξανά μεγάλα 24μερή σύμπλοκα



**Εικόνα 2:** Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της Hsp26. [23]

Η Hsp26 μπορεί να προσδένει και να προστατεύει από λανθασμένη αναδίπλωση αρκετά διαφορετικά πρωτεϊνικά υποστρώματα. Κάποια από αυτά έχει δείχθει πως είναι η συνθάση του κιτρικού, η β-αλυσίδα της ινσουλίνης, καθώς και η α-γαλακτοσιδάση. Η Hsp26 είναι ικανή να εμποδίσει τη δημιουργία συσσωματωμάτων αυτών των πρωτεϊνών ακόμα και σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 40°C. [23]

Αρχικά, είχε προταθεί πως ο διαχωρισμός των 24μερών της Hsp26 σε διμερή ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της δραστηριότητας σαπερόνης της Hsp26 [23]. Αργότερα όμως δείχθηκε πως ακόμα και όταν ο διαχωρισμός σε διμερή εμποδίζεται, η Hsp26 εξακολουθεί να διατηρεί την ενεργότητα σαπερόνης της. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως η ενεργοποίηση του μηχανισμού της Hsp26 δεν απαιτεί διαχωρισμό της ολιγομερούς δομής. [24]

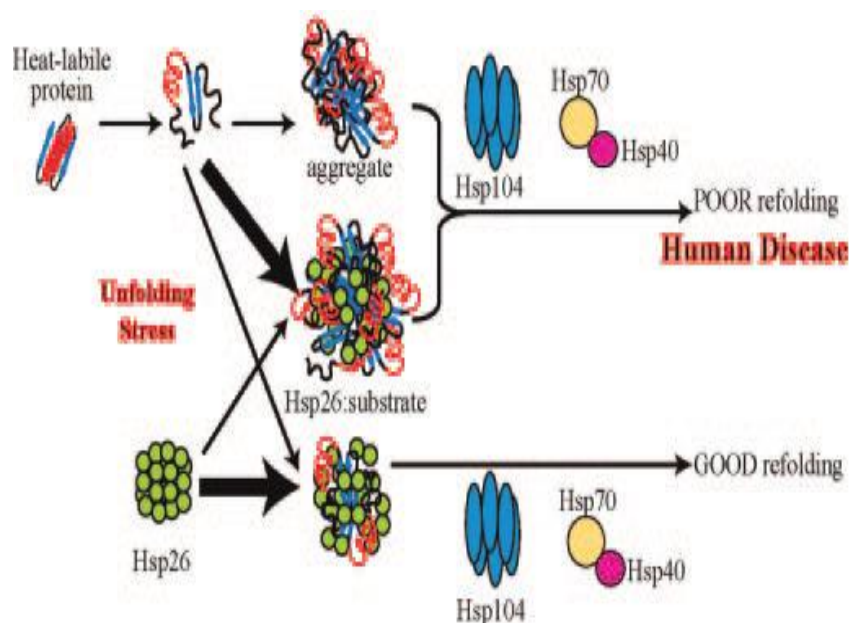
Αξιοσημείωτη επίσης είναι η παρατήρηση πως μεταλλαγμένα στελέχη σακχαρομύκητα που δεν εκφράζουν Hsp26, δεν εμφανίζουν θερμοευαίσθητο φαινότυπο. Αντιθέτως, ο ρυθμός ανάπτυξης και επιβίωσης των μεταλλαγμάτων αυτών σε αυξημένες θερμοκρασίες παρέμεινε ανεπηρέαστος, υπό διάφορες συνθήκες. [25] Αυτό υποδεικνύει πως στο yeast ενδεχομένως υπάρχουν και άλλες sHsps που μπορούν να αντισταθμίσουν την απουσία της Hsp26 (π.χ. Hsp42) [22].

### 1.5 Ο ρόλος της Hsp26 στον καταρράκτη πρωτεϊνών θερμικού σοκ στο yeast

Η προστασία των πρωτεϊνών από τη δημιουργία συσσωματωμάτων και τη λανθασμένη αναδίπλωση απαιτεί τη συνδυασμένη δράση περισσότερων από μίας πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Αρχικά, όπως προαναφέρθηκε, μόλις αυξηθεί η θερμοκρασία, η Hsp26 προσδένει τις ξεδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και σχηματίζει σύμπλοκα με αυτές. Τα σύμπλοκα αυτά στη συνέχεια αναγνωρίζονται από μία άλλη πρωτεΐνη θερμικού σοκ, την Hsp104, η οποία απελευθερώνει την Hsp26 από το σύμπλοκο και ταυτόχρονα οδηγεί τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο σύστημα σαπερονών Hsp70/Hsp40. Το σύστημα αυτό οδηγεί στη σωστή αναδίπλωση των ξεδιπλωμένων πρωτεϊνών. Άρα η Hsp26 αποτελεί το πρώτο βήμα αυτού του μονοπατιού, που θα οδηγήσει τελικά στην σωστή αναδίπλωση των θερμοευαίσθητων πρωτεϊνών. [26]

Η φύση των συμπλόκων Hsp26-πολυπεπτιδίων, που θα σχηματιστούν μόλις αυξηθεί η θερμοκρασία, εξαρτάται από το λόγο Hsp26 προς την πρωτεΐνη-υπόστρωμα. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Hsp26, σχηματίζονται μεγαλύτερα και ενδεχομένως πιο στενά συνδεδεμένα σύμπλοκα με τις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, τα οποία εμποδίζουν την αποτελεσματική επαν-αναδίπλωση των πρωτεϊνών αυτών από το σύστημα σαπερονών Hsp104/ Hsp70/Hsp40. Αντιθέτως, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Hsp26, σχηματίζονται μικρότερα και ίσως πιο «χαλαρά» σύμπλοκα, τα οποία επιτρέπουν στο σύστημα Hsp104/ Hsp70/Hsp40 να επαν-αναδιπλώσει σωστά τις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες. [26] (Εικόνα 3)



Εικόνα 3 : Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη πρωτεϊνών θερμικού σοκ [26]

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως αρκετές ανθρώπινες ασθένειες οφείλονται σε λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών ή στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Το yeast μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη τέτοιων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, που περιλαμβάνουν συσσωμάτωση πρωτεϊνών, όπως π.χ. η νόσος Huntington και η νόσος Parkinson.[27-29]

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>: Processing bodies (P-bodies)

### *2.1. Τι είναι τα P-bodies?*

Τα P-bodies αποτελούν διακριτά σωμάτια στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, τα οποία αφομοιώνουν μεταφραστικά κατεσταλμένα mRNAs και έτσι λειτουργούν ως θέσεις αποθήκευσης, καταστολής της μετάφρασης ή αποικοδόμησης του mRNA.[30]

Η ακριβής πρωτεϊνική σύσταση των P-bodies δεν είναι ακόμα γνωστή. Οι μέχρι στιγμής όμως αναγνωρισμένες πρωτεΐνες τους μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες:

#### 1) Πρωτεΐνες του συντηρημένου πυρήνα των P-bodies:

Βρίσκονται στα P-bodies σχεδόν όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών, από τον σακχαρομύκητα μέχρι και τον άνθρωπο, και αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες της μηχανής αφαίρεσης του 5'-καλύμματος (decapping machinery). Περιλαμβάνουν τα ένζυμα αφαίρεσης του 5'-καλύμματος Dcp1/Dcp2, τους ενεργοποιητές της αφαίρεσης του 5'-καλύμματος Dhh1/RCK/p54, Pat1, Scd6/RAP55 και Edc3, το σύμπλοκο Lsm1-7p και την 5'-3' εξωνουκλεάση Xpm1. Το σύμπλοκο απαδενυλίωσης CCR4/POP2/NOT επίσης συμμετέχει σε P-bodies κυττάρων θηλαστικών, καθώς και σε μεταλλαγμένα στελέχη σακχαρομύκητα που σχηματίζουν μεγάλα P-bodies. [31-33]

#### 2) Πρωτεΐνες που περιορίζονται σε συγκεκριμένους μόνο οργανισμούς ή που επηρεάζουν συγκεκριμένες υποκατηγορίες των mRNAs (π.χ. miRNA) [31]

#### 3) Πρωτεΐνες που παρατηρούνται μόνο σε P-bodies συγκεκριμένων μεταλλαγμάτων, κυτταρικών τύπων και στρεσογόνων συνθηκών.[31]

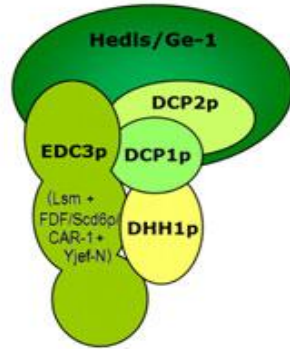
Στον άνθρωπο, τα P-bodies περιέχουν επίσης και άλλους μεταφραστικούς καταστολείς (π.χ. CPEB), καθώς και παράγοντες επιμήκυνσης της μετάφρασης (π.χ. eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, eIF2 και 4E-T).

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται συνοπτικά οι κύριες πρωτεΐνες του συντηρημένου πυρήνα των P-bodies: [30]



COMPONENTS INVOLVED IN P-BODY'S CORE AND DECAPPING PROCESS

A



**Decapping enzyme subunits:**

DCP1p  
DCP2p  
Hedls/Ge-1

**Decapping activators and translation repressors:**

DHH1p (DEAD box helicase)  
EDC3p (Lsm + FDF/Scd6p/CAR-1 + Yjef-N)

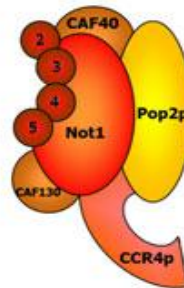
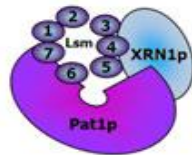
**Proteins involved in decapping:**

Lsm1-7p  
XRN1p (5'-3' exonuclease: Fas-activated serine/threonine phosphoprotein)  
Pat1p

**Cytoplasmic deadenylase complex:**

CCR4p  
Pop2p  
Not1-5p  
CAF40/130

B Major cytoplasmic deadenylase



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση των κύριων συστατικών του συντηρημένου πυρήνα των P-bodies. (Σημειώνεται πως η πρωτεΐνη Hedls/Ge-1 του συμπλόκου αφαίρεσης 5'καλύμματος που παρουσιάζεται στο συγκεκριμένο σχήμα εμφανίζεται μόνο στον άνθρωπο και απουσιάζει από τον σακχαρομύκητα).[30]

Τα P-bodies περιέχουν επίσης mRNAs. Μάλιστα, έχειδειχθεί πως τα mRNAs είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό των P-bodies, ενώ το μέγεθος και ο αριθμός των P-bodies που σχηματίζονται είναι ανάλογα του πλήθους των μη-μεταφραζόμενων mRNAs που αλληλεπιδρούν με τα P-bodies. Για παράδειγμα, υπερέκφραση ενός μη-μεταφραζόμενου τμήματος mRNA στο yeast θα οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των P-bodies.[34]

Υπάρχουν επίσης και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό των P-bodies στο yeast. Πιο συγκεκριμένα, το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων, το οσμωτικό στρες, η στέρηση γλυκόζης, καθώς και η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία είναι παράγοντες που αυξάνουν τον αριθμό και το μέγεθος των P-bodies. [34]

## 2.2. Αποικοδόμηση των mRNAs

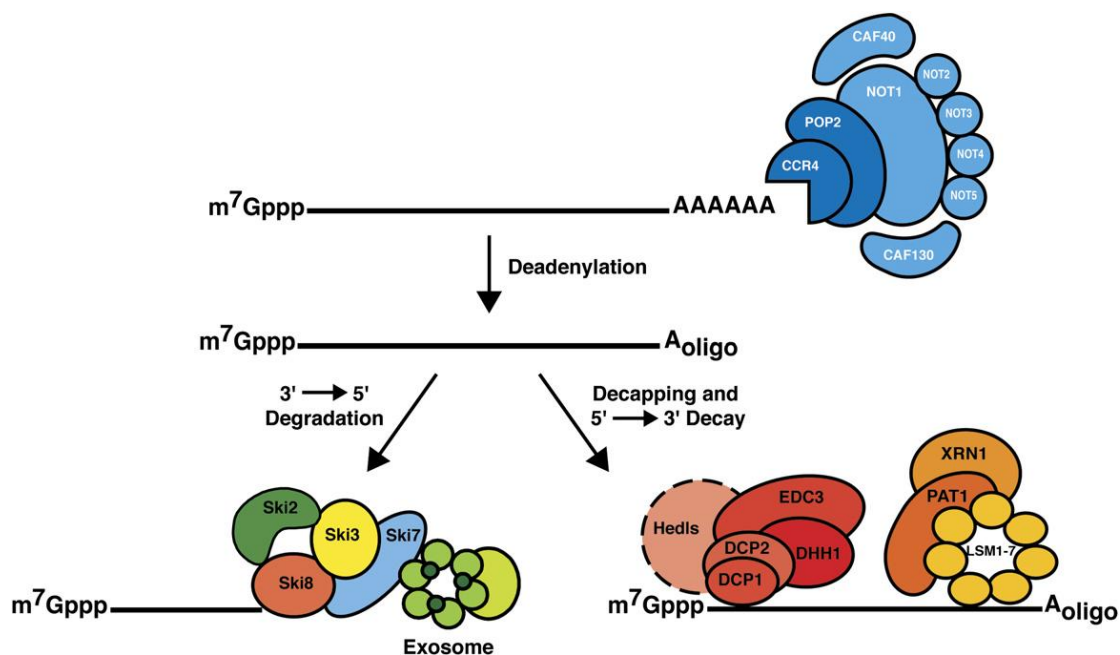
Ο έλεγχος της μετάφρασης των mRNAs και της αποικοδόμησής τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA στους ευκαρυώτες (Εικόνα 5). Και τα δύο ξεκινούν με απαδενυλίωση της 3'-poly(A) ουράς του mRNA. Αρχικά, η απαδενυλίωση γίνεται μέσω του συμπλόκου Ccr4/Pop2, ενώ στη συνέχεια μπορούν να συμμετάσχουν και άλλες απαδενυλάσες. Μετά την απαδενυλίωση υπάρχουν δύο ενδεχόμενα:

1) το εκτεθειμένο 3'-άκρο να αποικοδομηθεί περαιτέρω από ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (εξώσωμα) προς την κατεύθυνση 3'-5' ή

2) τα ένζυμα Dcp1/Dcp2 να αφαιρέσουν το 5'-κάλυμμα του mRNA και η εξωνουκλεάση Xrn1 να αποικοδομήσει το mRNA προς την κατεύθυνση 5'-3'.

Η αποτελεσματική αφαίρεση του 5'-καλύμματος οδηγεί σε σχηματισμό μη-μεταφραζόμενου mRNA, το οποίο αλληλεπιδρά με τη μηχανή αποικοδόμησης mRNA και αφομοιώνεται στα P-bodies.[31]



**Εικόνα 5:** Τα κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. [31]

### **2.3. Ποιά η τύχη των mRNAs που αφομοιώνονται στα P-bodies?**

Μία προφανής κατάληξη των mRNAs που θα αφομοιωθούν στα P-bodies είναι να αποικοδομηθούν κατά την κατεύθυνση 5'-3', αφού πρώτα αφαιρεθεί το 5'-κάλυμμα τους.

Παρόλα αυτά, τα μη-μεταφραζόμενα mRNAs που σχετίζονται με P-bodies μπορεί να έχουν και μια διαφορετική τύχη: να αποθηκευτούν στα P-bodies προσωρινά και έπειτα να επιστρέψουν στη μετάφραση. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί στο yeast πως mRNAs που αφομοιώνονται στα P-bodies υπό συνθήκες στρες ή κατά την στατική φάση, μπορούν να εξέλθουν από τα P-bodies και να ξανα-εισέλθουν στην μεταφραστική μηχανή όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές. [35]

### **2.4. Καταστολή της μετάφρασης από συστατικά των P-bodies**

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, ορισμένες από τις πρωτεΐνες των P-bodies, μπορούν να δρουν άμεσα στην καταστολή της μετάφρασης. Για παράδειγμα, ορθόλογα της Dhh1 δρουν άμεσα στην καταστολή της μετάφρασης μητρικών mRNAs σε βατράχους, νηματοειδείς και μύγες [36-39]. Επιπλέον, στελέχη yeast από τα οποία απουσιάζουν ένα ή περισσότερα συστατικά των P-bodies δεν μπορούν να καταστείλουν αποτελεσματικά την μετάφραση, όπως απαιτείται σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης ή αμινοξέων.[40]

Ο ρόλος ορισμένων πρωτεϊνών των P-bodies στην καταστολή της μετάφρασης υποδεικνύει πως η μεταφραστική κατάσταση ενός mRNA αντικατοπτρίζει ένα διαρκή ανταγωνισμό μεταξύ του σχηματισμού της μεταφραστικής μηχανής και του σχηματισμού της μηχανής καταστολής/αποικοδόμησης του mRNA.

Τέλος, η συμμετοχή πρωτεϊνών των P-bodies στην καταστολή της μετάφρασης μπορεί να επηρεάσει την τύχη του κατεσταλμένου μεταφραστικά mRNA. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη 4E-T των P-bodies κυττάρων θηλαστικών μπορεί να καταστείλει την μετάφραση, προσδένοντας τον παράγοντα eIF4E (ο οποίος προσδένεται στο 5'cap του mRNA) και εμποδίζοντας την πρόσδεση επιπλέον μεταφραστικών παραγόντων σε αυτόν. Το mRNA αυτό, το οποίο έχει προσδεμένο στο 5'cap του τις πρωτεΐνες eIF4E και 4E-T, προστατεύεται από αφαίρεση του καλύμματός του και άρα είναι πολύ πιο πιθανό να αποθηκευτεί στα P-bodies, παρά να αποικοδομηθεί.[31]

### **2.5. Πιθανή σχέση των P-bodies με την Hsp26**

Όπως προαναφέρθηκε, τα P-bodies αφομοιώνουν μεταφραστικά κατεσταλμένα mRNAs και μπορεί να οδηγήσουν στην αποικοδόμηση ή στην αποθήκευσή τους. Μεταφραστικά κατεσταλμένα mRNAs μπορούν να προκύψουν ύστερα από συνθήκες στρες, όπως για παράδειγμα η ακραία θερμική καταπληξία, ή κατά την στατική φάση (εφόσον σε αυτές τις συνθήκες η μετάφραση καταστέλλεται). Επίσης, όπως προαναφέραμε, στις συνθήκες αυτές αυξάνεται κατά ένα μεγάλο βαθμό η έκφραση της Hsp26, προκειμένου να προστατεύσει τις πρωτεΐνες από τη λανθασμένη αναδίπλωση και τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας, λοιπόν, κάναμε την υπόθεση πως η Hsp26 μπορεί να παίζει ρόλο στην

προστασία των πρωτεϊνών των P-bodies στις συνθήκες αυτές, ώστε να επιτρέπεται ο σωστός σχηματισμός των P-bodies και να επιτυγχάνεται η απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις αποικοδόμηση ή αποθήκευση του mRNA.

## ΣΤΟΧΟΙ

Οι στόχοι της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν οι εξής:

- Να εξεταστεί το αν η Hsp26 εμφανίζει και *in vivo* την ίδια συμπεριφορά που έχει δειχθεί πως εμφανίζει *in vitro* (24μερής δομή στην ανενεργό κατάσταση και διαχωρισμός σε διμερή ύστερα από αύξηση της θερμοκρασίας) σε συνθήκες στατικής φάσης (stationary phase) και ακραίας θερμοπληξίας (46°C). Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση του υβριδίου Hsp26-GFP στις συνθήκες αυτές.
- Να εξεταστεί η πιθανή αλληλεπίδραση της Hsp26 με τα P-bodies, προκειμένου να διαπιστωθεί αν παίζει κάποιο ρόλο στη σωστή αναδίπλωσή τους κατά την στατική φάση και κατά την ακραία θερμοπληξία. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε λόγω του παρατηρούμενου μικροσκοπικά συνεντοπισμού της Hsp26 με την πρωτεΐνη Edc3 των P-bodies, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (μη- δημοσιευμένα δεδομένα). Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση του υβριδίου μιας άλλης πρωτεΐνης των P-bodies, της Dhh1, με GFP σε στελέχη που εκφράζουν Hsp26 και σε στελέχη που δεν εκφράζουν Hsp26.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

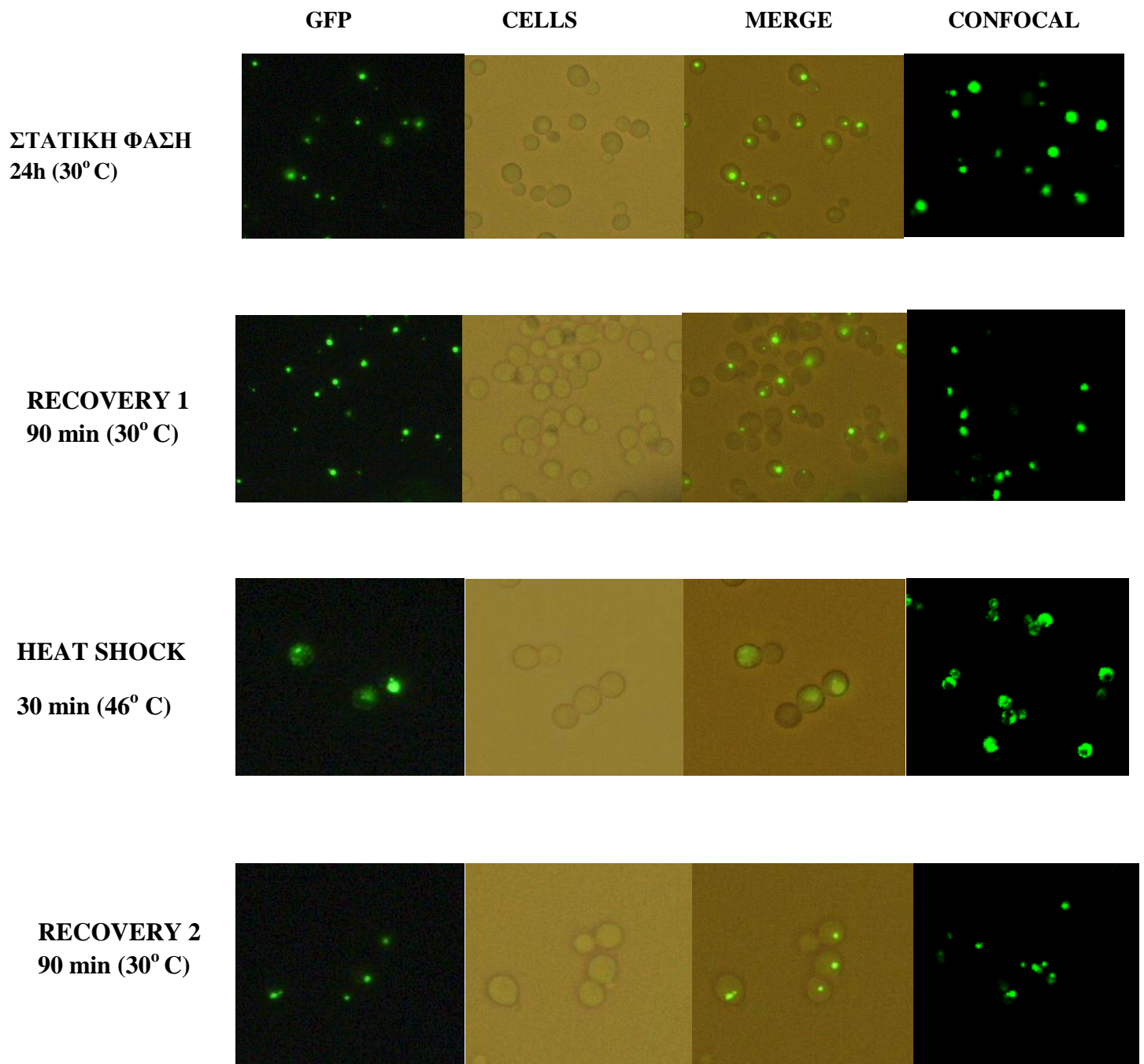
### 1. Μικροσκοπική παρατήρηση του υβριδίου Hsp26-GFP σε συνθήκες ακραίας θερμοπληξίας

Προκειμένου να παρατηρηθεί μικροσκοπικά η πρωτεΐνη Hsp26 χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ζυμομύκητα στα οποία η εν λόγω πρωτεΐνη έχει σημειωθεί με GFP (GFP-tagging). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, στέλεχος στο οποίο δεν εκφράζεται η Hsp26, αλλά αντιθέτως εκφράζεται GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της Hsp26.

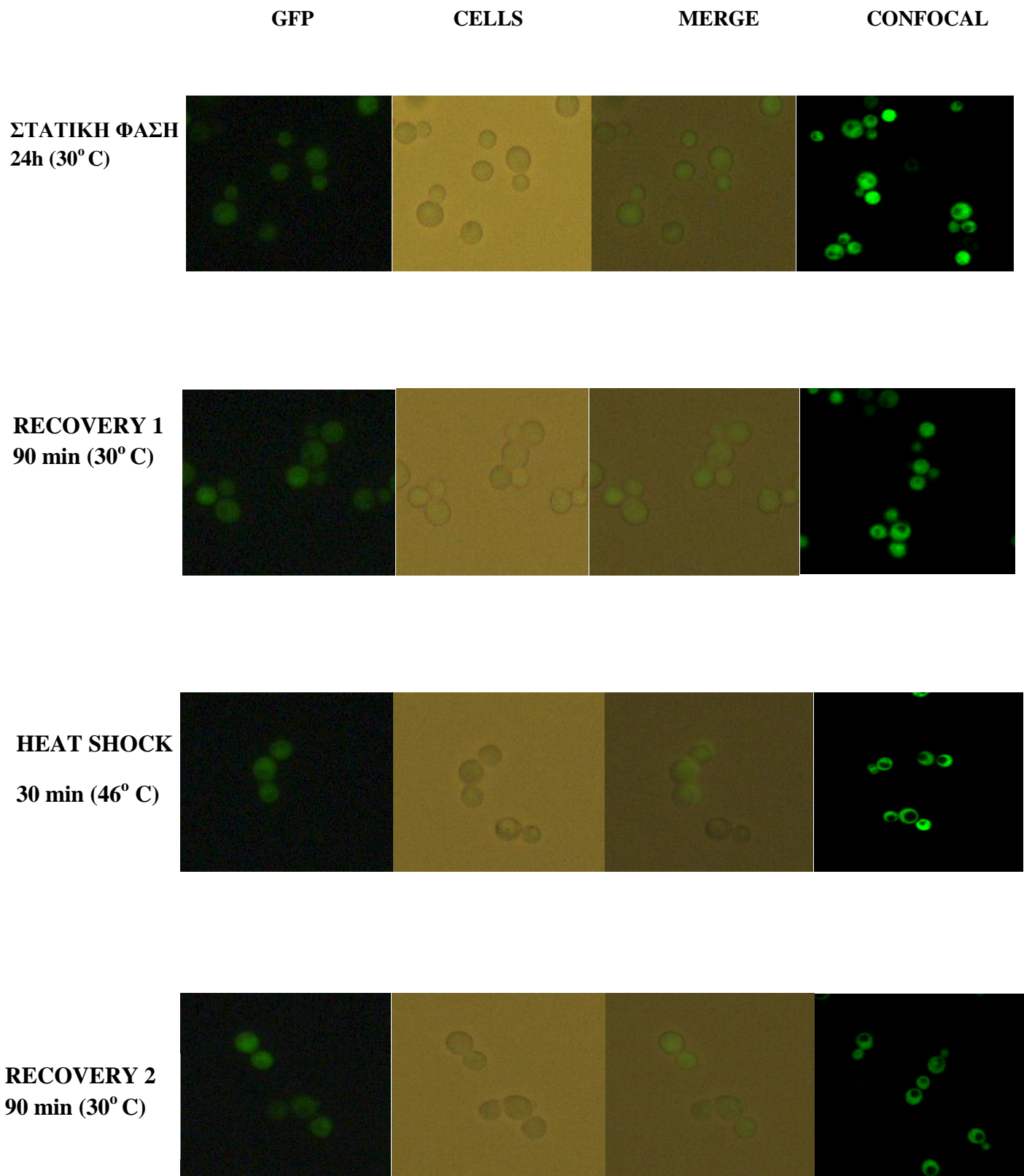
Τα δύο αυτά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο υγρό θρεπτικό μέσο YPD για 24 ώρες, στους 30° C, υπό ανάδευση, ώστε τα κύτταρα να μπου σε στατική φάση (Stationary Phase). Έπειτα μέρος της καλλιέργειας αραιώθηκε 1:5 σε φρέσκο πλούσιο υγρό θρεπτικό μέσο και επώαστηκε υπό ανάδευση για 90 λεπτά, προκειμένου τα κύτταρα να ανακάμψουν από την στατική φάση (Recovery 1). Μετά το πέρας των 90 λεπτών, μέρος των κυττάρων αυτών υπέστη θερμική καταπληξία στην ακραία θερμοκρασία των 46° C, σε υδατόλουτρο (Heat Shock). Τέλος, μετά το θερμικό σοκ τα κύτταρα αφέθηκαν να ανακάμψουν, στους 30° C, υπό ανάδευση.

Σε κάθε ένα από τα 4 αυτά στάδια συλλέχθηκε δείγμα κυττάρων, το οποίο παρατηρήθηκε μικροσκοπικά, σε μικροσκόπιο φθορισμού, καθώς και σε συνεντοπιστικό μικροσκόπιο για μεγαλύτερη ανάλυση. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

**Εικόνα 6:** Hsp26-GFP. Οι τρεις πρώτες εικόνες κάθε γραμμής είναι από μικροσκόπιο φθορισμού, ενώ η τέταρτη εικόνα κάθε γραμμής παρουσιάζει το υβρίδιο Hsp26-GFP από συνεστιακό μικροσκόπιο, για μεγαλύτερη ευκρίνεια.



**Εικόνα 7:** Hsp26Promoter-GFP. Οι τρεις πρώτες εικόνες κάθε γραμμής είναι από μικροσκόπιο φθορισμού, ενώ η τέταρτη εικόνα κάθε γραμμής παρουσιάζει την GFP από συνεστιακό μικροσκόπιο, για μεγαλύτερη ευκρίνεια.



Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες το υβρίδιο Hsp26-GFP εμφανίζει μία ιδιαίτερη συμπεριφορά σε συνθήκες στατικής φάσης, ανάκαμψης από τη στατική φάση, ακραίας θερμοπληξίας και ανάκαμψης από την ακραία θερμοπληξία:

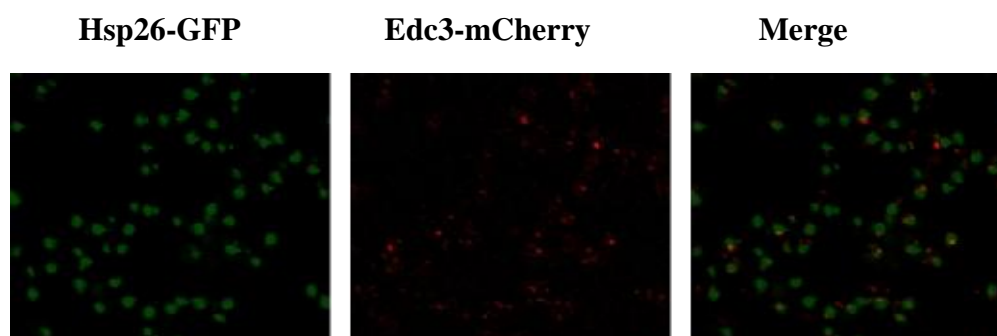
- Κατά την στατική φάση το συγκεκριμένο υβρίδιο εμφανίζεται ως έντονη κηλίδα (spot) στο κυτταρόπλασμα.
- Την ίδια εμφάνιση παρουσιάζει και κατά την ανάκαμψη από τη στατική φάση.
- Κατά την ακραία θερμοπληξία όμως η κηλίδα αυτή φαίνεται πως σπάει σε πολλές μικρότερες κηλίδες, οι οποίες και διαχέονται σε όλο το κυτταρόπλασμα.
- Τέλος, κατά την ανάκαμψη από την ακραία θερμοπληξία, οι κηλίδες αυτές φαίνεται πως ξανασυγκεντρώνονται σε μία μεγάλη.

Πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό πως αμέσως μετά το θερμικό σοκ, καθώς και κατά την ανάκαμψη από αυτό, υπάρχει ένα ποσοστό των κυττάρων που φαίνεται να μην εκφράζουν καθόλου το υβρίδιο Hsp26-GFP. Αυτό συμβαίνει διότι μετά από μία τόσο ακραία αύξηση της θερμοκρασίας, ορισμένα κύτταρα όπως είναι αναμενόμενο πεθαίνουν. Για αυτό και στις συγκεκριμένες εικόνες εμφανίζονται κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν καθόλου GFP.

Προκειμένου να διαπιστωθεί το αν η εικόνα αυτή που παρατηρούμε αντικατοπτρίζει την συμπεριφορά της Hsp26 και δεν είναι αποτέλεσμα της GFP, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Hsp26PROMOTER-GFP, στο οποίο δεν εκφράζεται καθόλου Hsp26, ενώ από τον υποκινητή του γονιδίου της Hsp26 εκφράζεται GFP. Όπως παρατηρούμε στο στέλεχος αυτό, η GFP δεν εμφανίζει την ίδια συμπεριφορά με το υβρίδιο Hsp26-GFP, αλλά αντιθέτως, σε όλες τις παρατηρούμενες συνθήκες εμφανίζεται διάχυτη σε όλο το κυτταρόπλασμα, χωρίς ποτέ να σχηματίζει κηλίδες. Έτσι, μπορούμε να διαπιστώσουμε πως η συμπεριφορά του υβριδίου Hsp26-GFP αντιπροσωπεύει την συμπεριφορά της ίδιας της Hsp26, χωρίς να επηρεάζεται από την GFP.

## 2.Μικροσκοπική παρατήρηση του υβριδίου *Dhh1-GFP* παρουσία και απουσία *Hsp26*:

Ο επόμενος στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν το να ελεγχθεί αν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση της *Hsp26* με τα P-bodies. Από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου είχε διαπιστωθεί πως υπάρχει συνεντοπισμός της *Hsp26* με την πρωτεΐνη *Edc3* των P-bodies:



**Εικόνα 8:** Στέλεχος *Hsp26-GFP /Edc3-mCherry*. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο

Όπως παρατηρούμε, σε ένα ποσοστό των κυττάρων αυτών εμφανίζεται συνεντοπισμός του υβριδίου *Hsp26-GFP* με το υβρίδιο *Edc3-mCherry*.

Αυτό που θελήσαμε, λοιπόν, να ελέγξουμε είναι το αν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση της *Hsp26* με τα P-bodies. Λόγω της προηγούμενης παρατηρούμενης συμπεριφοράς της *Hsp26* σε συνθήκες στατικής φάσης, ανάκαμψης από τη στατική φάση, ακραίας θερμοπληξίας και ανάκαμψης από την ακραία θερμοπληξία, αποφασίσαμε να παρατηρήσουμε την αντίστοιχη συμπεριφορά των P-bodies στις συνθήκες αυτές, παρουσία και απουσία της *Hsp26*. Με αυτό τον τρόπο θα διαπιστωθεί το αν ο σχηματισμός ή η μορφολογία των P-bodies στις συνθήκες αυτές εξαρτάται από την *Hsp26*.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας των P-bodies η πρωτεΐνη *Dhh1*, η οποία όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μία από τις κύριες πρωτεΐνες των P-bodies. Παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο δύο διαφορετικά στελέχη:

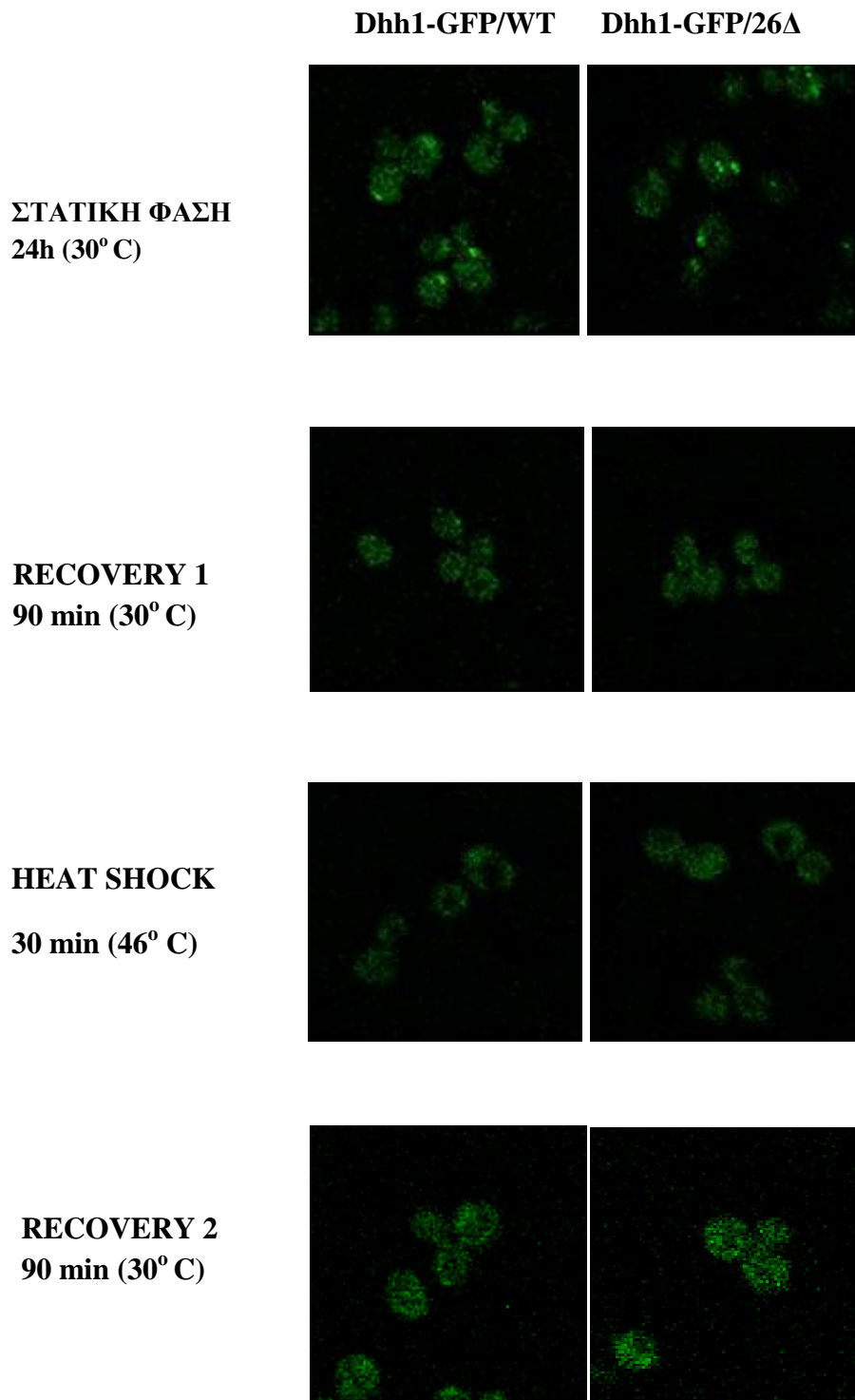
Το πρώτο εκφράζει κανονικά *Hsp26* και επίσης εκφράζει το υβρίδιο *Dhh1-GFP* (στέλεχος *Dhh1-GFP/WT*), ενώ το δεύτερο εκφράζει το υβρίδιο *Dhh1-GFP*, αλλά δεν εκφράζει *Hsp26* (στέλεχος *Dhh1-GFP/26Δ*).

Τα 2 αυτά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο υγρό θρεπτικό μέσο YPD για 24 ώρες, στους 30° C, υπό ανάδευση, ώστε τα κύτταρα να μουν σε στατική φάση (Stationary Phase). Έπειτα μέρος της καλλιέργειας αραιώθηκε 1:5 σε φρέσκο πλούσιο υγρό θρεπτικό μέσο και επώαστηκε υπό ανάδευση για 90 λεπτά, προκειμένου τα κύτταρα να ανακάμψουν από την στατική φάση (Recovery 1). Μετά το πέρας των 90 λεπτών, μέρος των κυττάρων αυτών υπέστη θερμική καταπληξία στην ακραία θερμοκρασία των 46° C, σε υδατόλουτρο (Heat Shock). Τέλος, μετά το θερμικό σοκ τα κύτταρα αφήθηκαν να ανακάμψουν, στους 30° C, υπό ανάδευση.

Σε κάθε ένα από τα 4 αυτά στάδια συλλέχθηκε δείγμα κυττάρων, το οποίο παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:



**Εικόνα 9:** Στελέχη Dhh1-GFP/WT (εκφράζει το υβρίδιο Dhh1-GFP και επίσης εκφράζει την Hsp26) και Dhh1-GFP/26Δ (εκφράζει το υβρίδιο Dhh1-GFP ,αλλά δεν εκφράζει Hsp26). Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο.



Παρατηρούμε πως και τα δύο στελέχη παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά παρουσία και απουσία της Hsp26.

- Κατά την στατική φάση, φαίνεται πως σχηματίζονται μεγάλα και διακριτά P-bodies στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και στα δύο στελέχη.
- Κατά την ανάκαμψη από την στατική φάση το μέγεθος των P-bodies φαίνεται να έχει μειωθεί σημαντικά, καθώς δεν σχηματίζονται πλέον διακριτά σωματίδια. Αντιθέτως, τα ευκρινή P-bodies της στατικής φάσης φαίνονται να έχουν σπάσει σε πολλά μικρότερα.
- Κατά το ακραίο θερμικό σοκ, τα P-bodies φαίνεται πως έχουν την ίδια εμφάνιση με αυτά της ανάκαμψης από την στατική φάση
- Τέλος, κατά την ανάκαμψη από το θερμικό σοκ, τα P-bodies εξακολουθούν να είναι μικρά σε μέγεθος, αλλά παρόλα αυτά φαίνεται πως σε μερικά σημεία στο κυτταρόπλασμα έχουν αρχίσει να ξανασυγκεντρώνονται σε μεγαλύτερα σωματίδια. Δεν έχουν αποκτήσει όμως σε καμία περίπτωση το μέγεθος των διακριτών P-bodies της στατικής φάσης.

Και στα δύο στελέχη, τα P-bodies έχουν ακριβώς την ίδια εμφάνιση σε όλες τις παρατηρούμενες συνθήκες.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πρώτο σκέλος αυτής της πτυχιακής εργασίας παρατηρήθηκε μικροσκοπικά το υβρίδιο Hsp26-GFP σε συνθήκες στατικής φάσης, ανάκαμψης από την στατική φάση, ακραίας θερμοπληξίας και ανάκαμψης από την ακραία θερμοπληξία.

Μέχρι στιγμής ήταν γνωστή μόνο η *in vitro* συμπεριφορά της Hsp26. Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη αυτή σε φυσιολογικές συνθήκες σχηματίζει *in vitro* 24μερή σύμπλοκα, τα οποία είναι ανενεργά, όταν όμως αυξηθεί η θερμοκρασία, διασπάται σε διμερή τα οποία και προσδένουν τις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, ώστε να τις προστατεύσουν από τη δημιουργία συσσωματωμάτων.

Αυτό που θέλαμε να παρατηρήσουμε στα πλαίσια αυτής της εργασίας, λοιπόν, ήταν η *in vivo* συμπεριφορά της εν λόγω πρωτεΐνης. Ύστερα από μικροσκοπική παρατήρηση, προέκυψε πως η Hsp26 εμφανίζεται κατά την στατική φάση, καθώς και κατά την ανάκαμψη από την στατική φάση, ως μία μεγάλη κηλίδα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, ενώ ύστερα από ακραία θερμοπληξία η κηλίδα αυτή φαίνεται πως διασπάται σε πολλές μικρότερες, δίνοντας την εικόνα μιας διάχυτης στο κυτταρόπλασμα Hsp26. Κατά την ανάκαμψη από την ακραία θερμοπληξία, η Hsp26 φαίνεται πως ξανασυγκεντρώνεται σε μία μεγάλη κηλίδα.

Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται να συμφωνούν με την *in vitro* παρατηρούμενη συμπεριφορά της Hsp26. Υποθέτουμε, λοιπόν, πως κατά την στατική φάση, καθώς και κατά την ανάκαμψη από αυτήν, η κηλίδα που παρατηρούμε στο κυτταρόπλασμα, αποτελείται από συγκεντρωμένα ανενεργά 24μερή σύμπλοκα της Hsp26. Αντιθέτως, κατά την ακραία θερμοπληξία, τα σύμπλοκα αυτά φαίνεται πως διασπώνται σε πολλά ενεργά διμερή της Hsp26 και για αυτό στο μικροσκόπιο δίνεται η εικόνα της διάχυτης στο κυτταρόπλασμα πρωτεΐνης. Τέλος, κατά την ανάκαμψη από την ακραία θερμοπληξία, παρατηρούμε πως η Hsp26 ξανασυγκεντρώνεται σε μία μεγάλη κηλίδα και υποθέτουμε πως αυτό συμβαίνει καθώς τα διμερή της Hsp26 ξανασυναρμολογούνται σε μεγάλα 24μερή σύμπλοκα, που συγκεντρώνονται σε ένα σημείο στο κυτταρόπλασμα.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η παρατήρηση ότι η Hsp26 εκφράζεται πάρα πολύ έντονα σε στατική φάση. Ο ρόλος της σε αυτή τη συνθήκη δεν είναι ακόμη προσδιορισμένος. Μπορούμε όμως να υποθέσουμε ότι ενδεχομένως η πρωτεΐνη αυτή έχει κάποια διαφορετική λειτουργία κατά την στατική φάση και μάλιστα για την λειτουργία αυτή απαιτείται η συναρμολόγησή της σε 24μερή σύμπλοκα. Περαιτέρω μελέτες θα χρειαστούν για την αποσαφήνιση του ενδεχόμενου ρόλου της Hsp26 σε αυτές τις συνθήκες.

Όσο αφορά το δεύτερο σκέλος της εργασίας αυτής, δηλαδή την πιθανή αλληλεπίδραση της Hsp26 με τα P-bodies, τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως τόσο παρουσία όσο και απουσία της Hsp26, ο σχηματισμός και η μορφολογία των P-bodies δεν επηρεάζονται. Η συμπεριφορά που παρουσιάζουν και στα 2 στελέχη είναι η εξής:

Κατά την στατική φάση, σχηματίζονται μεγάλα διακριτά P-bodies στο κυτταρόπλασμα, γεγονός το οποίο είναι λογικό εφόσον, όπως προαναφέρθηκε, το μέγεθος των P-bodies αυξάνεται αναλογικά με το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων. Άρα, εφόσον κατά την στατική φάση η καλλιέργεια έχει μία πολύ μεγάλη OD, είναι αναμενόμενος ο σχηματισμός μεγάλων P-bodies.

Αντιστοίχως, κατά την ανάκαμψη από την στατική φάση, το μέγεθος των P-bodies μειώνεται σημαντικά, εφόσον η καλλιέργεια έχει αραιωθεί και άρα η OD της έχει μειωθεί.

Το αξιοσημείωτο όμως είναι πως κατά την ακραία θερμοπληξία το μέγεθος των P-bodies παραμένει ιδιαίτερα μικρό, ενώ το αναμενόμενο θα ήταν να αυξάνεται, εφόσον η μετάφραση σε αυτές τις συνθήκες σταματά και άρα τα μη-μεταφραζόμενα mRNAs που θα αφομοιωθούν σε P-bodies πληθαίνουν. Η αιτία του συγκεκριμένου φαινομένου δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί.

Τέλος, κατά την ανάκαμψη από την ακραία θερμοπληξία, τα P-bodies εξακολουθούν να είναι πολύ μικρά σε μέγεθος, όμως φαίνεται πως αρχίζουν να ξανασυγκεντρώνονται σε πιο έντονα σωμάτια σε μερικά σημεία στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που δικαιολογείται από την σταδιακή αύξηση της OD της καλλιέργειας, η οποία μετά την ακραία θερμοπληξία αρχίζει να ξαναπολλαπλασιάζεται.

Το γεγονός ότι η συμπεριφορά αυτή των P-bodies είναι η ίδια τόσο παρουσία όσο και απουσία Hsp26 δεν συνεπάγεται απαραίτητα πως η Hsp26 δεν παίζει κανένα ρόλο στην αναδίπλωσή τους. Δεδομένου του προηγούμενου παρατηρούμενου συνεντοπισμού της Hsp26 με την πρωτεΐνη Edc3 των P-bodies, υποθέτουμε πως η Hsp26 μπορεί πράγματι να παίζει ρόλο στη σωστή αναδίπλωσή τους, όμως ενδεχομένως η απουσία της να αντισταθμίζεται από τη δράση άλλων πρωτεϊνών θερμικού σοκ, όπως για παράδειγμα από την Hsp42. Το φαινόμενο αυτό εξάλλου δεν είναι πρωτοφανές, εφόσον έχει ήδη παρατηρηθεί πως η απουσία Hsp26 δεν επηρεάζει την θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων του σακχαρομύκητα, καθώς η απουσία της μπορεί να αντισταθμίζεται από άλλες πρωτεΐνες με αντίστοιχη δράση.[22]

Προτείνουμε, λοιπόν, ως μελλοντικές κατευθύνσεις τις εξής:

- Αρχικά, την μικροσκοπική παρατήρηση διαφορετικών πρωτεϊνών των P-bodies, πέραν της Dhh1, παρουσία και απουσία Hsp26.
- Την κατασκευή double-mutant στελεχών που να μην εκφράζει ούτε Hsp26 ούτε Hsp42, και να εκφράζει υβριδική πρωτεΐνη των P-bodies με GFP (π.χ. Dhh1-GFP), ώστε να παρατηρήσουμε αν η Hsp42 αντισταθμίζει την απουσία της Hsp26 σε ότι αφορά τον σχηματισμό και την μορφολογία των P-bodies.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **ΥΛΙΚΑ:**

**Χημικά:** Χρησιμοποιήθηκαν χημικά των εταιριών SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Merck και FMC Bioproducts.

**Ένζυμα:** Χρησιμοποιήθηκαν θερμοανθεκτικά ένζυμα για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμερισμού (PCR) από τις εταιρίες MINOTECH (Taq Polymerase) και Takara Holdings (PrimeSTAR® HS DNA Polymerase).

**Αντισώματα:** Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της GFP από το εργαστήριο του κ. Οικονόμου. Το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit συζευγμένο με HRP προήλθε από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology

**Μεμβράνες:** Η μεταφορά των πρωτεϊνών για ανοσοαποτύπωση κατά Western, πραγματοποιήθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Protran (Schleicher and Schuell).

**Ολιγονουκλεοτίδια:** Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ (IMBB-FORTH) και από την εταιρία Metabion International AG

**Χρωστικές:** Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική χρώσης του DNA με Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr), σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται από τους Sambrook και Russell στο εργαστηριακό εγχειρίδιο (Sambrook 2001).

**Θρεπτικά μέσα:** Χρησιμοποιήθηκε είτε πλούσιο θρεπτικό υλικό YPD [το οποίο περιέχει 2% w/v γλυκόζη (glucose), 1% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 2% w/v πεπτόνης (bacto peptone), ενώ για τις στερεές καλλιέργειες προστίθεται 1% άγαρ] ή σε περίπτωση που τα στελέχη φέρουν αυξοτροφίες ελάχιστο θρεπτικό μέσο (min) [2% w/v γλυκόζης και 6,7g/L πηγής αζώτου χωρίς αμινοξέα (yeast nitrogen base without amino acids), ενώ για στερεές καλλιέργειες προστίθεται 1% άγαρ] συμπληρωμένο με τα απαιτούμενα αμινοξέα. Τέλος, τα κύτταρα ζύμης που προετοιμάζονταν για μετασχηματισμό με PCR product καλλιεργούνταν σε YP- 4% γλυκόζη που περιέχει 4% w/v γλυκόζη (glucose), 1% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 2% w/v πεπτόνης (bacto- peptone).

**Μικροσκοπία:** Για τη μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού της εταιρίας Nikon (Nikon Fluorescence Microscope), ενώ για τη συνεστιακή μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο της εταιρίας Leica (Leica Confocal Microscope)

### **ΣΤΕΛΕΧΗ:**

Τα στελέχη σακχαρομύκητα που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

<b>ΣΤΕΛΕΧΟΣ</b>	<b>ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ</b>	<b>ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ</b>
<b>FT5</b>	MATα, ura3-52, trp 1-Δ63, his3-Δ200, leu2::PET56	Wild Type
<b>BY4742</b>	MATα his3-1 leu2-0 lys2-0 ura3-0	Wild Type
<b>Hsp26Δ/BY4742</b>	BY4742/ Hsp26Δ:KanMX	Δεν εκφράζει Hsp26. Προέρχεται από library.
<b>HSP26-GFP/ FT5</b>	FT5/hsp26:GFP:KanMX2	Προέρχεται από το στέλεχος FT5, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PKT127
<b>HSP26PR-GFP/FT5</b>	FT5/ HSP26pr:GFP:KanMX2	Στο στέλεχος αυτό εκφράζεται GFP από τον υποκινητή του γονιδίου HSP26
<b>Dhh1-GFP/BY4742</b>	BY4742/ Dhh1:GFP:HIS5	Προέρχεται από το στέλεχος BY4742, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PKT128
<b>Dhh1-GFP/Hsp26Δ</b>	Hsp26Δ/BY4742: Dhh1:GFP:HIS5	Προέρχεται από το στέλεχος Hsp26Δ/BY4742, ύστερα από μετασχηματισμό με το πλασμίδιο PKT128

### **ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ :**

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

pKT127: Optimized cassette for fluorescent protein- GFP tagging. Φέρει το γονίδιο KanMX4 που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 (Geneticin)

pKT128: Optimized cassette for fluorescent protein tagging- GFP tagging. Φέρει το γονίδιο βιοσύνθεσης ιστιδίνης His5.

## **ΜΕΘΟΔΟΙ:**

### **1. Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης:**

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Σκοπός του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού μορίων DNA είναι η ποσοτική εκτίμηση ή η εκτίμηση του μεγέθους της/των αναλυμένων ζωνών. Όπου ήταν απαραίτητος ο ακριβέστερος ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 260nm (OD260) με τη χρήση NanoDrop. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγεθών DNA (DNA marker) το προϊόν της πέψης του γενωμικού DNA του φάγου λ με το περιοριστικό ένζυμο PSTI.

### **2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR):**

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού ήταν 5-50 ng όταν το DNA ήταν πλασμιδιακό, ενώ 50-100ng όταν επρόκειτο για γενωμικό DNA.

Οι αντιδράσεις με PrimeSTAR® HS DNA Polymerase ως επί το πλείστον γίνονταν στα 50 μl και αποτελούνταν από 10μl 5x Reaction Buffer PrimeSTAR® Takara, 4μl dNTPS mix 2,5mM each, 1-3 μl DNA template, 2μl primer mix (1μl each), 0,5 μl PrimeSTAR® HS DNA Polymerase και αντίστοιχη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 50 μl. Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού που εφαρμόστηκε σε όλες τις περιπτώσεις, καθώς τα T<sub>m</sub> των ανιχνευτών και τα μεγέθη των προϊόντων ήταν παραπλήσια, είναι το ακόλουθο:

- 98°C για 1 λεπτό για αρχική αποδιάταξη
  - 98°C για 10 δευτερόλεπτα για αποδιάταξη
  - 46°C για 30 δευτερόλεπτα για υβριδοποίηση των εκκινητών
  - 72°C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα για επιμήκυνση της αλυσίδας
  - 72°C για 10 δευτερόλεπτα
  - 15°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα.
- } X 35 ΚΥΚΛΟΥΣ

### **3. SDS-PAGE electrophoresis και Western blot analysis**

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σύμφωνα με το μέγεθός τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Sambrook 2001). Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά αυτών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά και η διαδικασία εφαρμογής των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων έγιναν όπως αναφέρονται στο CPMB (Ausubel F.M and K. 1999), ενώ για τις ιδανικές αραιώσεις των αντισωμάτων ελήφθησαν υπόψη οι οδηγίες των κατασκευαστών. Ο ανοσοεντοπισμός γίνεται ενζυματικά με τη δράση της υπεροξειδάσης (HRP), η οποία ήταν συζευγμένη με το δευτερογενές αντίσωμα, σε κατάλληλα υποστρώματα. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγεθών ο Prestained Protein Molecular Weight Marker της Fermentas.

#### *4. Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης:*

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα ζύμης εφαρμόστηκε η μέθοδος δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων ζύμης με οξικό λίθιο (LiAc TRAF0). Πρόκειται για μια μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας, η οποία βασίζεται στη δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης λόγω αλκαλικών κατιόντων (Gietz 1995).

#### *5. Σήμανση ενδογενών γονιδίων της ζύμης με GFP (GFP tagging):*

Με σκοπό την ανίχνευση πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης, σημαίνουμε την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει με GFP, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί μικροσκοπικά σε μικροσκόπιο φθορισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με εισαγωγή του γονιδίου της GFP στο ενδογενές γονίδιο που θέλουμε να μελετήσουμε. Η μέθοδος βασίζεται στην δυνατότητα ομόλογου ανασυνδυασμού στη ζύμη και εφαρμόζεται όπως ακριβώς περιγράφηκε από τους (Knop, Siegers et al. 1999). Χρησιμοποιούμε ως μήτρα πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο της GFP και επίσης κάποιο δείκτη επιλογής (π.χ. γονίδιο βιοσύνθεσης ιστιδίνης ή γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό G418) και με εκκινήτες που περιέχουν τόσο αλληλουχία του πλασμιδίου, όσο και του ενδογενούς γονιδίου που θέλουμε να μελετήσουμε, παίρνουμε με PCR το τμήμα του DNA με το οποίο θα μετασχηματίσουμε το στέλεχος του σακχαρομύκητα.

Το στέλεχος του σακχαρομύκητα, που πρόκειται να μετασχηματιστεί, μεγαλώνει σε 5 ml πλούσιου θρεπτικού (YPD) στους 30°C κατά τη διάρκεια της νύχτας (starting culture) και την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται σε 20 ml YPD και επωάζεται με ανάδευση στους 30°C μέχρι η οπτική απορρόφηση των κυττάρων να είναι OD<sub>550</sub>=0,5. Ακολουθεί πεντάλεπτη φυγοκέντρηση στις 3000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με ίσο όγκο αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O. Κατόπιν η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O και LiAc (1/10 του όγκου) σε τελικό όγκο 1ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου. Στο κυτταρικό ίζημα προστίθεται το διάλυμα μετασχηματισμού, το οποίο αποτελείται από 240 μl PEG 3500 50%w/v, 36 μl 1M LiAc, 50 μl μονόκλωνου DNA ως carrier (2mg/ml), 34 μl DNA για GFP- tagging (1-2μg) και αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Σημειώνεται ότι τα συστατικά του διαλύματος μετασχηματισμού προστίθενται με τη σειρά που αναγράφονται. Το μίγμα των κυττάρων αναδεύεται έντονα με τη χρήση vortex και κατόπιν επωάζεται στους 30°C χωρίς ανάδευση για 30 λεπτά. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται για 20-25 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 42°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 15 sec και στη συνέχεια αφαιρείται το μείγμα μετασχηματισμού. Στην πελέτα των κυττάρων είτε προστίθενται 100-200 μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O και κατόπιν απλώνεται σε κατάλληλο πιάτο επιλογής ή στην περίπτωση κατά την οποία γίνεται επιλογή με αντιβιοτικό, προστίθεται 1ml YPD και τα κύτταρα επωάζονται στους 30°C για τουλάχιστον 1 ώρα (recovery), προτού απλωθούν στο πιάτο που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τέλος τα πιάτα επωάζονται στους 30°C για 2-3 μέρες.



#### **6. Έλεγχος μετασχηματισμένων στελεχών ζύμης με τη μέθοδο της PCR (Single Colony PCR):**

Αποικία του υπό έλεγχο στελέχους του *S. cerevisiae* λύεται σε 20 μl 20 mM NaOH (καυστικού Νατρίου). Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 98°C και κατόπιν φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm. 1μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για αντίδραση PCR με κατάλληλους υποκινητές.

#### **7. Μικροσκοπική παρατήρηση των σημασμένων με GFP πρωτεϊνών**

Δείγματα από αποικίες σακχαρομύκητα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σε μικροσκόπιο φθορισμού, καθώς και σε συνεστιακό μικροσκόπιο, χωρίς μονιμοποίηση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Smith, K.T. and J.L. Workman, *Chromatin Proteins: Key Responders to Stress*. PLoS Biol, 2012. **10**(7): p. e1001371.
2. Fink, A.L., *Chaperone-mediated protein folding*. Physiological Reviews, 1999. **79**(2): p. 425-449.
3. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
4. Jaattela, M., *Heat shock proteins as cellular lifeguards*. Ann Med, 1999. **31**(4): p. 261-71.
5. McCarty, J.S., et al., *The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system*. J Mol Biol, 1995. **249**(1): p. 126-37.
6. Palleros, D.R., et al., *hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13107-14.
7. Gragerov, A. and M.E. Gottesman, *Different peptide binding specificities of hsp70 family members*. J Mol Biol, 1994. **241**(2): p. 133-5.
8. Castells-Roca, L., et al., *Heat Shock Response in Yeast Involves Changes in Both Transcription Rates and mRNA Stabilities*. PLoS ONE, 2011. **6**(2): p. e17272.
9. Hahn, J.S. and D.J. Thiele, *Activation of the Saccharomyces cerevisiae heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5169-76.
10. Yamamoto, A., et al., *Role of Heat Shock Transcription Factor in Saccharomyces cerevisiae Oxidative Stress Response*. Eukaryotic Cell, 2007. **6**(8): p. 1373-1379.
11. Estruch, F., *Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast*. FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(4): p. 469-86.
12. Yamamoto, N., et al., *Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(5): p. 783-90.
13. Parsell, D.A., et al., *Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites*. Nature, 1991. **353**(6341): p. 270-3.
14. Craig, E.A., B.D. Gambill, and R.J. Nelson, *Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis*. Microbiol Rev, 1993. **57**(2): p. 402-14.
15. Craig, E., et al., *Complex multigene family of functionally distinct Hsp70s of yeast*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1995. **60**: p. 441-9.
16. Nathan, D.F., M.H. Vos, and S. Lindquist, *In vivo functions of the Saccharomyces cerevisiae Hsp90 chaperone*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(24): p. 12949-12956.
17. Jakob, U., et al., *Small heat shock proteins are molecular chaperones*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1517-20.
18. Welsh, M.J. and M. Gaestel, *Small heat-shock protein family: function in health and disease*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **851**: p. 28-35.
19. Narberhaus, F.,  *$\alpha$ -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002. **66**(1): p. 64-93.

20. Haslbeck, M., *sHsps and their role in the chaperone network*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002. **59**(10): p. 1649-1657.
21. Haslbeck, M., et al., *A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization*. J Mol Biol, 2004. **343**(2): p. 445-55.
22. Haslbeck, M., et al., *Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 2004. **23**(3): p. 638-49.
23. Haslbeck, M., et al., *Hsp26: a temperature-regulated chaperone*. EMBO J, 1999. **18**(23): p. 6744-51.
24. Franzmann, T.M., et al., *The activation mechanism of Hsp26 does not require dissociation of the oligomer*. J Mol Biol, 2005. **350**(5): p. 1083-93.
25. Petko, L. and S. Lindquist, *Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination*. Cell, 1986. **45**(6): p. 885-94.
26. Cashikar, A.G., M. Duennwald, and S.L. Lindquist, *A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23869-75.
27. Krobitsch, S. and S. Lindquist, *Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(4): p. 1589-1594.
28. Meriin, A.B., et al., *Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1*. J Cell Biol, 2002. **157**(6): p. 997-1004.
29. Willingham, S., et al., *Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1769-72.
30. Olszewska, M., J.J. Bujarski, and M. Kurpisz, *P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review*. Cell Biochem Funct, 2012. **30**(3): p. 177-82.
31. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
32. Muhrad, D. and R. Parker, *The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p*. EMBO J, 2005. **24**(5): p. 1033-1045.
33. Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin, *Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 31-40.
34. Teixeira, D., et al., *Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs*. RNA, 2005. **11**(4): p. 371-82.
35. Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker, *Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies*. Science, 2005. **310**(5747): p. 486-489.
36. Lodomery, M., E. Wade, and J. Sommerville, *Xp54, the Xenopus Homologue of Human RNA Helicase p54, is an Integral Component of Stored mRNP Particles in Oocytes*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(5): p. 965-973.
37. Navarro, R.E., et al., *cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in C. elegans*. Development, 2001. **128**(17): p. 3221-32.
38. Nakamura, A., et al., *Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during Drosophila oogenesis*. Development, 2001. **128**(17): p. 3233-42.

39. Minshall, N., G. Thom, and N. Standart, *A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking*. RNA, 2001. **7**(12): p. 1728-42.
40. Collier, J. and R. Parker, *General translational repression by activators of mRNA decapping*. Cell, 2005. **122**(6): p. 875-86.