

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΩΝ HSP90 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ**  
**ΒΛΑΣΤΟΥ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΤΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ**  
**ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όλοι οι οργανισμοί κατά την διάρκεια της ζωής τους υφίστανται διαφόρων ειδών περιβαλλοντικές “πιέσεις”, τις οποίες καταφέρνουν να αντιμετωπίζουν μέσω επαγωγής διαφόρων μηχανισμών όπως η θερμοεπαγόμενη απόκριση δηλαδή αύξηση των επιπέδων των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, (HSPs). Μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών είναι η οικογένεια των HSP90.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η μελέτη της εμπλοκής των HSP90 στην ανάπτυξη του βλαστού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν RNAi σειρές φυτών *Arabidopsis* για τις οποίες έγινε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε μια σειρά, η RacRNAi 10H η οποία εμφάνιζε τον πιο ακραίο φαινότυπο και χαρακτηρίστηκε τόσο φαινοτυπικά όσο και μοριακά.

Οι RNAi σειρές φέρουν T-DNA κατασκευή η οποία περιέχει την περιοχή που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων σε φορά νοήματος-αντινοήματος υπό την καθοδήγηση του προαγωγέα *Rac2/Rop7*. Το γονίδιο *Rac2/Rop7* ανήκει στην Rho οικογένεια μικρών GTPασών και εκφράζεται στο πρωτογενές ξύλωμα των ριζών, κοτυληδόνων, βλαστών και υποκοτυλίου. Η εισαγωγή της T-DNA κατασκευής στον οργανισμό'ό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού γονιδιακής αποσιώπησης και κατ'επέκταση τα μειωμένα επίπεδα των κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων.

Τα μέχρι τώρα πειραματικά μας δεδομένα, συνηγορούν υπέρ της εμπλοκής των HSP90 τόσο σε μονοπάτια που διέπουν τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του *Arabidopsis* (εμβρυογένεση) όσο και σε δίκτυα που σχετίζονται με τα πρότυπα ανάπτυξης διαφορετικών οστών που απαρτίζουν το σώμα του ώριμου φυτού.

## ABSTRACT

The HSP90 protein is a member of the super-family of Heat Shock Proteins and is highly conserved among all organisms from human and plants to bacteria. Apart from the basic function as molecular chaperon, the HSP90 participates in many biological procedures of the cell such as signal transduction, cellular homeostasis and control of the cell cycle. In order to investigate the function of the cytoplasmic HSP90 during shoot development in *Arabidopsis thaliana*, the mechanism of RNA silencing (or RNA interference) was used. Plants were transformed by a silencing construct targeting the cytoplasmic HSP90, driven by the tissue-specific promoter RAC2/ROP7. The produced transgenic lines presented pleiotropic phenotype with severe shoot morphological alterations.

The hitherto experimentally data favor the involvement of HSP90 in both pathways governing early development of Arabidopsis (embryogenesis) and networks associated with development models of different bones that make up the body of the mature plant.

Key words: development, HSP90, RAC2/ROP7, shoot

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες.....	5
1.2 Μοριακοί Συνοδοί (molecular chaperons).....	6
1.3 Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ως μοριακοί συνοδοί.....	9
1.4 Κατηγορίες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Heat Shock Proteins, HSPs).....	10
1.4.1 Οικογένεια των HSP10-30 (sHSPs, small HSPs).....	10
1.4.2 Οικογένεια των Hsp60/chaperonines (τσαπερονίνες).....	11
1.4.3 Οικογένεια των Hsp70 πρωτεϊνών (DnaK).....	12
1.4.4 Οικογένεια των Hsp100 πρωτεϊνών/Clp.....	13
1.4.5 Οικογένεια των Hsp90 πρωτεϊνών .....	14
1.4.5.α Δομή των HSP90.....	15
1.4.5.β Ρόλος των Hsp90.....	17
1.4.5.γ Hsp90 και φαινότυπος.....	20
1.5 Παράγοντες και στοιχεία θερμικής καταπόνησης.....	23
1.6 Μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης (RNA silencing).....	24
1.7 Η οικογένεια RAC/RoOP small GTPases .....	27
1.8 Ο Αγγειακός Ιστός.....	30

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού.....	36
2.1.1 Ιστοκαλλιέργεια.....	36
2.2 Απομόνωση Γονιδιωματικού DNA από φυτά Arabidopsis με την μέθοδο CTAB... ..	37
2.3 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	39
2.3.1 Καθαρισμός και ποσοτικοποίηση RNA.....	39
2.3.1α Καθαρισμός RNA από υπολείμματα DNA με το ένζυμο RQ1 Dnase.....	39
2.3.1β Υπολογισμός συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων.....	40
2.4 Βακτηριακά στελέχη.....	41
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	41
2.4.1α Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό.....	41
2.4.1β Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	42
2.4.2 Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασχηματισμού (Transform efficiency).....	42
2.4.3 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα.....	43
2.5 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA.....	43
2.5.1 Αλκαλική λύση.....	43
2.5.2 Μέθοδος λύσης δια του βρασμού .....	44
2.5.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN.....	44
2.6 Πέψη Νουκλεϊνικών Οξέων με Ενδονουκλεάσες Περιορισμού.....	45
2.7 Ανάλυση Νουκλεϊνικών Οξέων σε Πηκτή Αγαρόζης.....	46

2.8 Απομόνωση και Καθαρισμός Κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	47
2.9 Ενωποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα.....	47
2.9.1 Διαδικασία A-tailing.....	47
2.9.2 Αντίδραση Ενωποίησης .....	48
2.10 Μεταφορά Νουκλεϊνικών Οξέων .....	49
2.10.1 Μεταφορά DNA κατά Southern από πηκτή αγαρόζης σε πλαστική μεμβράνη .....	49
2.11 Υβριδισμός.....	50
2.11.1 Προϋβριδισμός.....	50
2.11.2 Υβριδισμός.....	51
2.11.3 Ξεπλ;ύματα.....	51
2.12 Αν;ίχνευση (δετεψτιον σταρτερ Κιτ II, Ψατ. No. 1 585 614) .....	52
2.13 Αλυσιδωτ;ή Αντ;ίδραsh Πολυμεράσης (PCR).....	53
2.13.1 genomic PCR.....	53
2.13.2 Tail PCR (Therma asymmetric interlaced PCR).....	56
2.13.3 RT-PCR (Reverse Transcription PCR).....	60
2.14 Διαλύματα και Θρεπτικά Μέσα.....	63
2.15 Πλασμιδιακοί Φορείς .....	65

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηρισμός των αποσιωπημένων σειρών RacRNAi/Hsp90RNAi.....	67
3.2 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός της σειράς RacRNAi 10H.....	71
3.3 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi στο γένωμα του Arabidopsis.....	75
3.4 Προσδιορισμός της θέσης των αντιγράφων της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi στο γένωμα του Arabidopsis.....	77
3.4.1 Αντίδραση TAIL-PCR.....	77
3.4.2 Προσδιορισμός της θέσης των ενθέσεων με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης.....	81
3.5 Μοριακός χαρακτηρισμός της σειράς RacRNAi 10H.....	82
3.6 Ημιοσοστικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των Hsp90 γονιδίων αλλά και γονιδίων που σχετίζονται με την διαφοροποίηση και εγκαθίδρυση του ξύλου.....	86

### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Γενικά.....	89
4.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων του υβριδισμού κατά Southern και της Tail PCR.....	90
4.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των φυτών της RacRNAi 10H σειράς.....	91
4.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων του ημιοσοστικού PCR.....	93

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

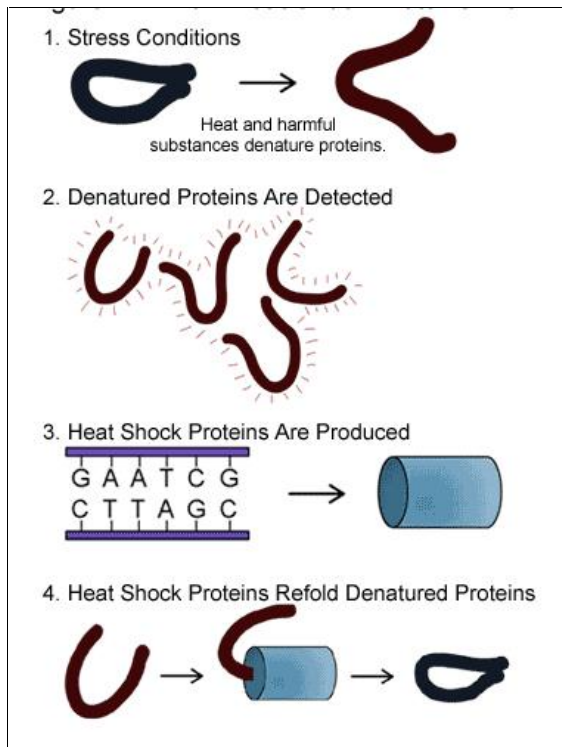
## **1.1 ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Όλοι οι οργανισμοί, είτε ευκαρυωτικοί είτε προκαρυωτικοί όταν βρίσκονται υπό συνθήκες πίεσεως αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής. Οι πιέσεις αυτές αφορούν τόσο αβιοτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η αύξηση της θερμοκρασίας, η υψηλή αλατότητα, η έλλειψη ύδατος και η παρουσία βαρέων μετάλλων όσο και βιοτικούς όπως μολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς. Από αυτούς οι πιο σημαντικοί είναι οι αβιοτικοί παράγοντες διότι έχουν ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της δομής και την δυσλειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών. ( Wang et al., 2004).

Ένας ιδιαίτερα μελετημένος μηχανισμός προσαρμογής είναι αυτός που επάγεται από τη θερμική καταπόνηση (heat shock). Όλοι οι οργανισμοί όταν βρεθούν σε περιβάλλον όπου τα επίπεδα της θερμοκρασίας δεν είναι τα επιτρεπτά για την επιβίωσή τους αναπτύσσουν μηχανισμούς θερμοανθεκτικότητας. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η συσσώρευση μιας ομάδας πρωτεϊνών που ονομάζονται **θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες θερμικού σοκ** (Heat Shock Proteins, HSPs). (Lindquist et al., 1988). Οι HSPs είναι συντηρημένες πρωτεΐνες και απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο. (Schlesinger, 1990).

Η υψηλή συγκέντρωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, ως αποτέλεσμα της αύξησης της θερμοκρασίας, φαίνεται να αποτελεί το μήνυμα για την έναρξη της παραγωγής των HSPs (Εικόνα 2). Οι HSPs συμβάλλουν με δυο τρόπους στην αντιμετώπιση της καταπόνησης. Πρώτον, μερικές από αυτές είτε διαθέτουν πρωτεολυτική ικανότητα είτε εμπλέκονται στη διαδικασία της πρωτεόλυσης, προάγοντας τοιουτοτρόπως την αποικοδόμηση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι πολλές από αυτές έχουν την ικανότητα να ‘επιδιορθώνουν’ μετουσιωμένες πρωτεΐνες μετά από την εφαρμογή κάποιας μορφής καταπόνησης. Δεύτερον, οι HSPs λειτουργούν και ως “μοριακοί συνοδοί” προάγοντας τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και παρεμποδίζοντας την κατακρήμνιση πρωτεϊνών. (Parsell and Lindquist, 1993).





**Εικόνα 2. Πώς λειτουργούν οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ.** Η θερμοκρασία αλλά και οι βλαβερές ουσίες οδηγούν στην μετουσίωση πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την λανθασμένη αναδίπλωση αυτών. Από την στιγμή που οι πρωτεΐνες χάσουν την τριτοταγή τους δομή, χάνουν και την λειτουργικότητά τους. Όταν οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες ανιχνευθούν από το κύτταρο, ξεκινά η παραγωγή των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν ως μοριακοί συνοδοί και βοηθούν στην σωστή αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών ώστε να είναι και πάλι λειτουργικές.

Η σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών έχει ως συνέπεια οι οργανισμοί να αποκτούν αντοχή και να επάγουν την δημιουργία ενός φαινομένου γνωστό ως θερμοανθεκτικότητα ή ανθεκτικότητα στο θερμικό σοκ (Parsell and Lindquist, 1994). Με αυτό τον τρόπο οι οργανισμοί προστατεύονται από τις απαγορευτικές για την ανάπτυξή τους θερμοκρασίες εξισορροπώντας την ομοιόσταση των κυττάρων. Ωστόσο, οι HSPs δεν εκφράζονται μόνο όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε θερμικό σοκ αλλά και σε κύτταρα τα οποία δεν βρίσκονται υπό την επίδραση κάποιας περιβαλλοντικής πίεσεως. (Hendrick and Hartl, 1993).

Έτσι λοιπόν, το σήμα που επάγει την έκφραση των HSP πρωτεϊνών μπορεί να είναι: α) αλλαγές του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του περιβάλλοντος του κυττάρου, β) αλλαγές του επιπέδου συγκέντρωσης ορισμένων ιόντων, γ) παρουσία μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, δ) αναπτυξιακά σινιάλα (πολλές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες εκφράζονται στα πλαίσια της κανονικής αναπτυξιακής διαδικασίας).

## 1.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ (Molecular chaperons)

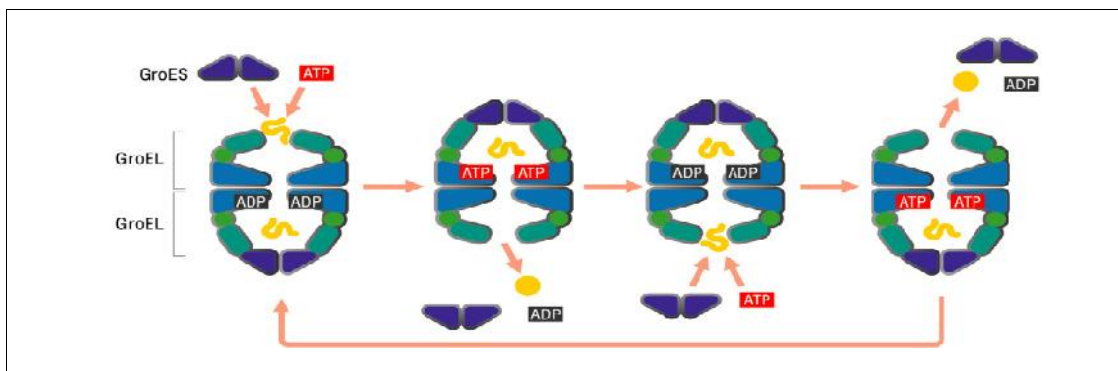
Όλες οι βιολογικές διαδικασίες και λειτουργίες διαμεσολαβούνται από πρωτεΐνες και πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες θα πρέπει να αποκτούν ορθή

τριτοταγή διαμόρφωση ώστε να καθίστανται βιολογικά λειτουργικές. Η ορθή αναδίπλωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία αρκετές φορές δεν οδηγεί σε πρωτεΐνες με την επιθυμητή στερεοδιαμόρφωση. Η αποτροπή της δημιουργίας λανθασμένων τριτοταγών πολυπεπτιδικών δομών απαιτεί την παρουσία ειδικών πρωτεϊνικών συμπλόκων, που ονομάζονται τσαπερόνια ή μοριακοί συνοδοί. (Zhang, 2002). Ως **μοριακός συνοδός** χαρακτηρίζεται μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται και σταθεροποιεί μια πρωτεΐνη που διαφορετικά θα ήταν ασταθής, μέσω ελεγχόμενης δέσμευσης και αποδέσμευσης, της πρωτεΐνης υποστρώματος. (Liang & MacRae, 1997).

Οι μοριακοί συνοδοί είναι σημαντικά συστατικά τα οποία συνεισφέρουν στην ομοίωση των κυττάρων, είτε υπό κανονικές είτε υπό αντίξοες για την ανάπτυξη τους συνθήκες. Οι μοριακοί συνοδοί αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες-στόχους τους και συμβάλλουν α) στη σωστή αναδίπλωση αρτιγενών πρωτεϊνών προκειμένου να αποκτήσουν την τριτοταγή διαμόρφωση που τις καθιστά λειτουργικές (Boston et al, 1996), β) στη μεταφορά πρωτεϊνών δια μέσω μεμβρανών σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου (Boston et al, 1996), γ) στην αποικοδόμηση ορισμένων πρωτεϊνών και δ) στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών που έχουν μετουσιωθεί λόγω συνθηκών πίεσεως π.χ. θερμικό σοκ (Lindquist and Graig, 1988).

Οι δύο τύποι μοριακών συνοδών που έχουν εκτενώς μελετηθεί είναι: α) οι HSP70 μοριακοί συνοδοί που εμπλέκονται σε μια ποικιλία διαδικασιών του κυττάρου όπως η ορθή αναδίπλωση και συναρμολόγηση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, ο έλεγχος πρωτεϊνών που φέρουν λάθος στην αναδίπλωση αλλά και πολυπεπτιδίων που έχουν δημιουργήσει συσσωματώματα και η μετακίνηση πρωτεϊνών δια μέσω μεμβρανών (Mayer et al., 2004). Η δράση των HSP70 βασίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με υδρόφοβες πρωτεϊνικές περιοχές και απαιτείται η παρουσία/υδρόλυση του ATP. β) το σύστημα των HSP60 ή τσαπερονίνες. οι τσαπερονίνες είναι μια ομάδα μοριακών συνοδών οι οποίοι απαντώνται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και στα μιτοχόνδρια και πλαστίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών. (Boston, et al., 1996; Hartl, 1996). Διακρίνονται δύο τύποι συστημάτων τσαπερονινών: το GroEL/GroES, (Boston et al., 1996) και οι CCT/TCP-1 τσαπερονίνες. Ρόλος και των δυο συστημάτων είναι να κατορθώσουν οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν στην λειτουργική τους δομή, κάτι που επιτυγχάνεται με την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP. (Miernyk, 1997). Η διαφορά μεταξύ των δυο συστημάτων είναι ότι το σύστημα GroEL απαιτεί την παρουσία ενός βοηθού-μοριακού συνοδού, το GroES (Cpn10), μεγέθους 10kDa, το οποίο αλλάζει την διαμόρφωση του τσαπερονίου ώστε να επέλθει η

αναδίπλωση της πρωτεΐνης υποστρώματος όπως φαίνεται στην εικόνα 3. (Bukau, B. and Horwich, A., 1998). Όσον αφορά το δεύτερο σύστημα έχειδειχθεί ότι οι CCT/TCP-1 τσαπερονίνες βοηθούν στην αναδίπλωση της τουμπουλίνης και της ακτίνης. (Gutsche, I. et al., 1999).



**Εικόνα 3. Δράση των HSP60 μοριακών συνοδών.** Καθεμιά από τις δύο υπομονάδες(GroEL) με την παρουσία/υδρόλυση του ATP αλλά και την αναγκαία παρουσία του GroES βοηθούν στην αρχική αναδίπλωση πρωτεϊνών ώστε αυτές να αποκτήσουν την λειτουργική τους διαμόρφωση.( [www.new-science-press.com/.../illustrations/ud](http://www.new-science-press.com/.../illustrations/ud)).

Επίπροσθέτως, οι HSP90 αποτελούν ένα ακόμη σημαντικό σύστημα μοριακού συνοδού. Χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες, όπως είναι οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών και οι πρωτεϊνικές κινάσες. Η προτίμηση αυτή σε υπόστρωμα είναι και ο παράγοντας που τις διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες ομάδες μοριακών συνοδών. Ο βασικός ρόλος των HSP90 είναι η συμμετοχή τους στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών και σε συστήματα μεταγωγής σημάτων καθώς και ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου. Για την δράση τους είναι αναγκαία η παρουσία/υδρόλυση του ATP. Επίσης οι HSP90 δρούν συνεργιστικά με άλλες ομάδες μοριακών συνοδών , όπως είναι οι HSP70 καθώς και με πλήθος συν-τσαπερονίων όπως είναι οι Hsp40, Hip, Hop και p23 (Wang et al., 2004).

### **1.3 ΟΙ ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΛΟΙ**

Οι HSP πρωτεΐνες διαδραματίζουν το ρόλο των μοριακών συνοδών υποβοηθώντας άλλες πρωτεΐνες ή να αναδιπλωθούν ορθά ή να διατηρήσουν τη φυσική τους διαμόρφωση σταθεροποιώντας τις μερικά μετουσιωμένες μορφές αυτών. Κοινό χαρακτηριστικό των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με την υδροφοβική περιοχή πολυπεπτιδίων, είτε κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και αναδίπλωσης των πρωτεϊνικών αλυσίδων από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης είτε μετά από αποδιάταξη της ώριμης πρωτεΐνης λόγω περιβαλλοντικών πιέσεων. Η σύνδεση/αλληλεπίδραση αυτή είναι αναστρέψιμη και εξυπηρετεί τη μείωση της πιθανότητας αυτές οι εκτεθειμένες περιοχές να δημιουργήσουν συσσωματώματα πρωτεϊνών ή να επιφέρουν πρόωμη πρωτεολυτική αποικοδόμηση. (Ellis, 1999). Οι διάφορες οικογένειες των HSP τσαπερονίων μπορεί να δρουν ή κάθε μια ξεχωριστά ή να έχουν συνεργιστική δράση. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο μηχανισμοί δράσης. Σύμφωνα με τον πρώτο έχειδειχθεί ότι οι sHSPs συνδέονται με μετουσιωμένες πρωτεΐνες και εμποδίζουν την συσώρευσή τους, με αποτέλεσμα να προετοιμάζουν τα υποστρώματα για την σύνδεσή τους με πρωτεΐνες των οικογενειών HSP70 και HSP100 τσαπερονίων με σκοπό την ορθή επαναδίπλωσή τους. Ενώ ένας δεύτερος μηχανισμός προτείνει ότι συσσωματώματα πρωτεϊνών μπορούν να διαλυτοποιηθούν αποτελεσματικά με την βοήθεια των HSP100/Clp τσαπερονίων και στη συνέχεια να αναδιπλωθούν από την αρχή κάτω από τον έλεγχο του συστήματος των HSP70. Η οριστική αναδίπλωση των πρωτεϊνών στην αρχική τους τριτοταγή δομή μπορεί να ολοκληρώνεται από μέλη της οικογένειας των Hsp60 τσαπερονίων.

Όσον αφορά την κυτταρική τοποθέτηση των HSP τσαπερονίων, φαίνεται ότι τοποθετούνται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου όπως στο πυρήνα, το μιτοχόνδριο, το χλωροπλάστη και το ενδοπλασματικό δίκτυο. (Wang et al., 2004). Ο πίνακας 1 δείχνει αναλυτικά που βρίσκεται κάθε HSP οικογένεια και ποιές διεργασίες επιτελεί.

**Πίνακας 1.** Οι οικογένειες των HSPs τσαπερονίων και η ανάμειξή τους στην ανθεκτικότητα των φυτών σε συνθήκες πίεσεως.

οικογένεια	Κυτταρική τοποθέτηση	Κύριες λειτουργίες
Hsp70 (Hsp70, Hsc70, Bip)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα	Αποτρέπουν την συσσωμάτωση, βοηθούν στην αναδίπλωση, μετακίνηση πρωτεϊνών
Hsp60/τσαπερονίνες (Cnp60, CCT)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο και κυτταρόπλασμα	Βοηθούν στην αρχική αναδίπλωση και στην διόρθωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών
Hsp90	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα	Διευκολύνει την ωρίμανση μορίων σινάλιων
Hsp100/Clp	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο και κυτταρόπλασμα	Αποτρέπει τη συσσώρευση πρωτεϊνών και την λανθασμένη αναδίπλωση
smallHsp	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο, και κυτταρόπλασμα	Αποτρέπει την συσσώρευση και σταθεροποιεί τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες

## **1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (HSPs)**

### **1.4.1 Οικογένεια των HSP10-30 (sHSPs, small HSPs)**

Πρόκειται για την λιγότερη συντηρημένη και την πιο ασαφή λειτουργικά οικογένεια θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Vierling, 1991). Χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό

ομολογίας μεταξύ τους που κυμαίνεται περίπου στο 30% σε αμινοξικό επίπεδο. Το μοριακό βάρος των μελών αυτής της οικογένειας κυμαίνεται από 12 έως 40kDa και απαντούν τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. (Boston et al., 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν κυρίως ως συν-τσαπερόνια αφού δεν είναι ικανές να επάγουν την αναδίπλωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, παρα μόνο τη βοήθεια κάποιου ATP-εξαρτώμενου συστήματος τσαπερονίων, όπως το DnaK (Hsp70) σύστημα. ( Ehrnsperger, et al., 1997). Έχει δειχθεί in vitro οι sHSPs διευκολύνουν την επανενεργοποίηση των χημικά αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών και παρεμποδίζουν την συσσώρευσή τους μετά από θερμική καταπόνηση. ( Boston et al., 1996).

Στα ανώτερα φυτά, έχουν περιγραφεί έξι οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτές τις πρωτεΐνες. Έχει δειχθεί ότι τα γονίδια αυτά εκφράζονται όχι μόνο σε συνθήκες καταπόνησης αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες σε αναπαραγωγικά όργανα του φυτού στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. (Waters et al., 1996).

#### **1.4.2 Οικογένεια των Hsp60/chaperonines (τσαπερονίνες)**

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες HSP60 με μοριακό βάρος περί τα 60 kDa εντοπίζονται α) στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στη μήτρα των μιτοχονδρίων (μιτοχονδριακή Cnp60) και στο στρώμα των χλωροπλαστών (πλαστιδιακή Cnp60) και β) στο κυτταρόπλασμα του *E.coli* (GroEL) ( Parsell and Lindquist, 1993).

Η GroEL είναι από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες στα βακτήριακά κύτταρα από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Απαραίτητα πρωτεΐνη για την ενεργότητα της GroEL είναι η GroES (HSP10 στους ευκαρύωτες) που παίζει το ρόλο της συν-τσαπερονίνης καθώς και η παρουσία ATP.

Η HSP60 (GroEL) σχηματίζει μια δομή που αποτελείται από 14 υπομονάδες διατεταγμένες σε δύο ανεστραμμένους επταμερείς δακτυλίους, τον άπω και τον εγγύς. Η HSP10 (GroES) σχηματίζει θόλο που καλύπτει το ένα άκρο του διπλού δακτυλίου. Οι αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα στη πρόσδεση και αναδίπλωση ενός υποστρώματος είναι οι εξής: α)το υπόστρωμα και το ATP δεσμεύονται στον ίδιο δακτύλιο της HSP60 (GroEL) και η HSP10 (GroES) καλύπτει αυτόν το δακτύλιο, β)η αλλαγή του περιβάλλοντος του δακτυλίου μετά την πρόσδεση του GroES αναγκάζει το υπόστρωμα να αλλάξει τη στερεοδιαμόρφωσή του και γ) λαμβάνει χώρα υδρόλυση του

ATP που πυροδοτεί την αποσύνδεση του υποστρώματος και της GroES από τον εγγύς δακτύλιο, ο οποίος επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση.

### **1.4.3 Οικογένεια των HSP70 πρωτεϊνών (DnaK)**

Οι HSP70 απαντώνται τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Πρόκειται για μία από τις συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 68 έως 110kDa (Vierling, 1991; Boston et al., 1996; Miernyk, 1997). Το ποσοστό ομολογίας μεταξύ των προκαρυωτικών μελών είναι της τάξης του 50% και των ευκαρυωτικών αναλόγων κυμαίνεται μεταξύ 50-98% (Craig et al., 1993). Σε αμινοξικό επίπεδο υπάρχει 72% ομοιότητα ανάμεσα στα κυτταροπλασματικά μέλη της ντομάτας και του *Saccharomyces cerevisiae* (Craig et al, 1994), ενώ μεταξύ ανθρώπου και ντομάτας υπάρχει 76% ομοιότητα.

Τα μέλη της οικογένειας αυτής εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και γι' αυτό η οικογένεια διαιρείται σε τρεις ομάδες: α) Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μέλη που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και επιπρόσθετα, στα φυτά, στους χλωροπλάστες, β) Η δεύτερη, μέλη που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και διαχωρίζονται σε δύο ομάδες. Τις HSP70 πρωτεΐνες που η έκφρασή τους επάγεται κάτω από διάφορες μορφές πίεσης όπως θερμικό σοκ, βαρέα μέταλλα, έκθεση στο κρύο, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων και τις HSC70 που εκφράζονται συνέχεια σε φυσιολογικές συνθήκες (Parsell and Lindquist, 1993) και γ) Μέλη που εδράζουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπως οι GRP78: πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από τη γλυκόζη ή οι BiP: πρωτεΐνες που ρυθμίζουν άλλες πρωτεΐνες (Anderson et al, 1994).

Η δομή τους συνίσταται από μια αμινο-τελική περιοχή, μεγέθους 45 kDa, η οποία αποτελεί περιοχή δράσης της ATP-άσης και από μια άνθρακο-τελική περιοχή, μεγέθους 25kDa, η οποία αποτελεί περιοχή σύνδεσης της πρωτεΐνης υποστρώματος. Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην δέσμευση και αποδέσμευση του ATP. Ο κύκλος αυτός συντελείται σε δύο στάδια: α) το ATP στάδιο, με μικρή συγγένεια και γρήγορο ρυθμό δέσμευσης και αποδέσμευσης του υποστρώματος και β) το ADP στάδιο με μεγάλη συγγένεια και χαμηλό ρυθμό δέσμευσης και αποδέσμευσης υποστρώματος. Πειραματικά δεδομένα ωστόσο υποδεικνύουν ότι το σύστημα για να λειτουργήσει με γρήγορους ρυθμούς έχει ανάγκη την δράση βοηθών-τσαπερονίων όπως οι πρωτεΐνες DnaJ και GrpE (Mayer and Bukau, 2004).

#### 1.4.4 Οικογένεια των HSP100 πρωτεϊνών/Clp

Μέλη αυτής της οικογένειας έχουν απομονωθεί από ευβακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 84 έως 104kDa. Συμμετέχουν σε ποικίλες διαδικασίες όπως η αναδίπλωση, η αποικοδόμηση πρωτεϊνών, η αντιγραφή του DNA, η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, η μεταφορά πρωτεϊνών δια μέσω μεμβρανών.

Στο *E.coli* τα μέλη της οικογένειας που έχουν ταυτοποιηθεί διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: α) οι ClpA, ClpB, ClpC, ClpD που έχουν στο μόριό τους δύο υπομονάδες σύνδεσης νουκλεοτιδίων (Schirmer et al., 1996) και β) οι ClpM, ClpN, ClpX και ClpY που είναι μικρότερου μεγέθους και έχουν μια υπομονάδα σύνδεσης νουκλεοτιδίων (Nieto-Sotelo et al., 1999). Οι πρωτεΐνες της πρώτης κατηγορίας διαθέτουν δευτεροταγή δομή έλικας-ελικοειδούς (coil-coiled) η οποία διαχωρίζει τις δύο θέσεις σύνδεσης (Nieto-Sotelo et al., 1999).

Στους φυτικούς οργανισμούς, οι HSP100 εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια (όπως πλαστίδια και μιτοχόνδρια). Η έκφρασή τους φαίνεται ότι ακολουθεί κάποια αναπτυξιακά και ιστοειδικά πρότυπα αλλά και ότι επάγεται από διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως αλατότητα, θερμότητα, ψύχος και επιδράσεις βαρέων μετάλλων (Schirmer et al., 1994). Έχει δειχθεί ότι στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, οι HSP100 αποτελούν βασικό συστατικό του μηχανισμού θερμοανθεκτικότητας (Queitsch et al., 2000).



#### 1.4.5 Οικογένεια των Hsp90 πρωτεϊνών

Οι HSP90 πρωτεΐνες είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ φυλλογενετικά απομακρυσμένων οργανισμών όπως τα θηλαστικά, οι ζύμες, η *Drosophila*, τα βακτήρια και τα φυτά. Σ'επίπεδο αμινοξέων το ποσοστό ομοιότητας είναι της τάξης του 70% μεταξύ των ευκαρυωτικών μελών και της τάξης του 40% μεταξύ του προκαρυωτικού μέλους και των αντίστοιχων ευκαρυωτικών. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 82 έως 96kDa. Απαντώνται σε αφθονία τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και υπο φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης αντιστοιχούν περίπου στο 1-2% της συνολικής πρωτεΐνης των κυττάρων. ( Buchner, 1999; Frydman, 2001).

Γονίδια των Hsp90 έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά όπως η τομάτα, το καλαμπόκι, η ελαιοκράμβη, η σίκαλη, το *Catharanthus* και η *Arabidopsis*. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η πολυγονιδιακή οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά μέλη. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει: α) Τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη (Hsp90.1, Hsp90.2, Hsp90.3 και Hsp90.4) τα οποία παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας της τάξης του 85% σε αμινοξικό επίπεδο, β) ένα χλωροπλαστικό (Hsp90-5), γ) ένα μιτοχondριακό (Hsp90-6) και δ) ένα που απαντάνται ενδοπλασματικό δίκτυο (Hsp90-7). Έχει δειχθεί ότι τα οργανιδιακά μέλη της οικογένειας σε επίπεδο αμινοξέων παρουσιάζουν ποσοστά ομολογίας της τάξης του 45%. (πίνακας 2).

	AtHsp90-1	AtHsp90-2	AtHsp90-3	AtHsp90-4	AtHsp90-5	AtHsp90-6	AtHsp90-7
AtHsp90-1	100	88	85	87	49	48	53
AtHsp90-2		100	96	97	48	46	52
AtHsp90-3			100	44	47	45	51
AtHsp90-4				100	48	46	52
AtHsp90-5					100	68	48
AtHsp90-6						100	49
AtHsp90-7							100

**Πίνακας 2. Ποσοστό % ομολογίας σε αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των μελών της οικογένειας των Hsp90 γονιδίων.**

Μελέτη του πρότυπου έκφρασης των Hsp90 γονιδίων στην *Arabidopsis* υπέδειξε επαγωγή της έκφρασης από θερμική καταπόνηση ή εφαρμογή αρσενικού. (Milionis and Hatzopoulos, 1997). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η έκφραση των Hsp90 μπορεί να

ρυθμιστεί και αναπτυξιακά. Έκφραση των HSP90 γονιδίων μπορεί να ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Marrs et al., 1993), κατά τη φύτευση σπόρου (Reddy et al., 1998), στις μεριστωματικές ζώνες βλαστού και ρίζας (Koning et al., 1992), στα άνθη (Krishna et al., 1995) και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της γύρης (Haralampidis et al., 2002).

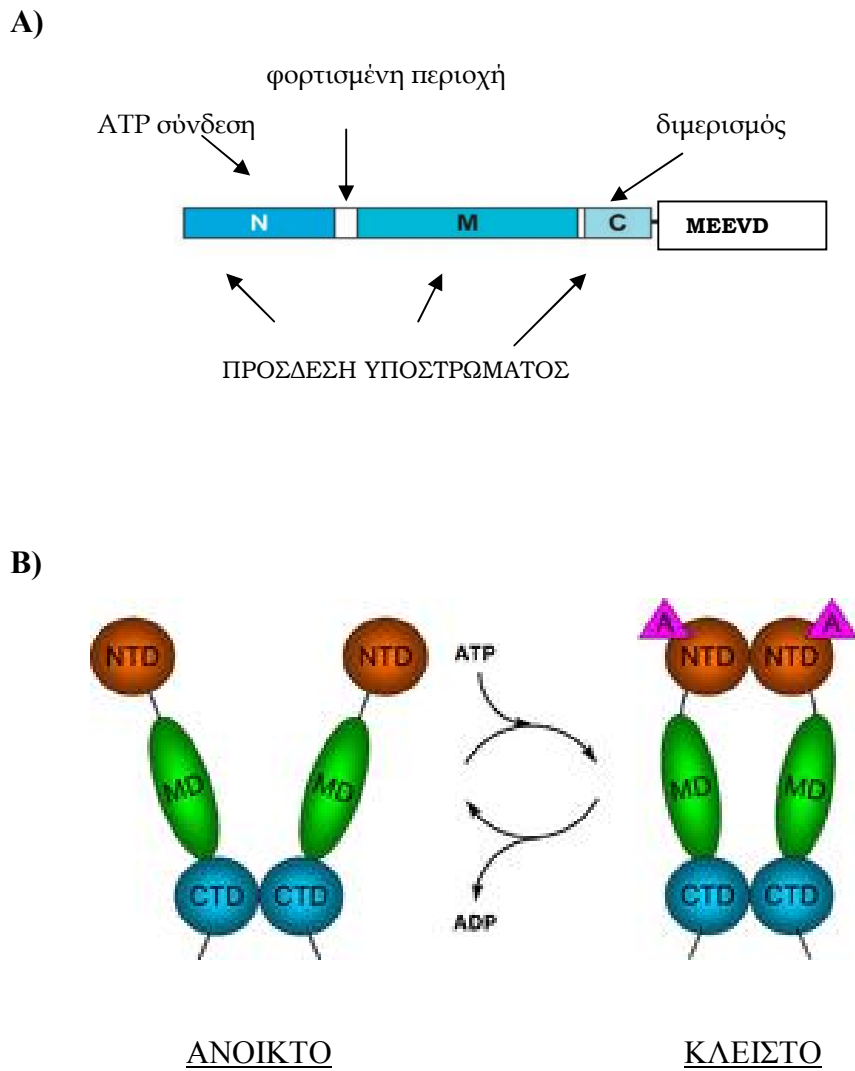
Στο βακτήριο *E.coli* η HSP90 κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, το htpG, του οποίου η έλλειψη δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του βακτηρίου υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στη ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, η αντίστοιχη πρωτεΐνη κωδικοποιείται από δύο γονίδια, το hsc82 που εκφράζεται συνεχώς και το hsp82 που υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει χαμηλή έκφραση ενώ μετά από θερμική καταπόνηση η έκφρασή του αυξάνεται αισθητά. Στη *Drosophila melanogaster*, υπάρχει μόνο ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για αυτήν την πρωτεΐνη, η έκφραση του οποίου επάγεται μετά από θερμικό σοκ αλλά υφίσταται και αναπτυξιακή ρύθμιση. (Chen et al., 2006).

#### **1.4.5.α Δομή των HSP90**

Δομικά οι HSP90 αποτελούνται από δυο πολύ καλά συντηρημένες περιοχές, την άμινο-περιοχή και την καρβόξυ-περιοχή. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία στο άμινο-τελικό άκρο μιας ιδιαίτερα φορτισμένης περιοχής, η οποία αποτελεί θέση πρόσδεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Έχει δειχθεί ότι η περιοχή αυτή έχει διαφορετικό μέγεθος στην HSP90α στον άνθρωπο από την HSP90ρ στη ζύμη, ενώ απουσιάζει ολοκληρωτικά στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, π.χ. HtpG (*Escherichia coli*) αλλά και σε κάποια ευκαρυωτικά μέλη, όπως στην ανθρώπινη TRAP1. επίσης χαρακτηριστική είναι η παρουσία στο καρβόξυ-τελικό άκρο των κυτταροπλασματικών μελών, του πενταπεπτιδίου MEEVD. Η ίδια ακολουθία απαντάται και στις ευκαρυωτικές HSP70. (Lindquist and Craig, 1988).

Η ώριμη λειτουργική HSP90 πρωτεΐνη είναι ένα διμερές, το οποίο δημιουργείται από την σύνδεση των καρβόξυ-τελικών άκρων των δυο HSP90 πολυπεπτιδίων σχηματίζοντας έτσι ένα επίμηκες μόριο. Τα άμινο-τελικά άκρα βρίσκονται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Εικάζεται ότι η θερμική καταπόνηση προκαλεί την προσέγγιση των άμινο-τελικών άκρων με αποτέλεσμα την δημιουργία τριγωνικών δομών. ( Buchner. J, 1999). Η άμινο-τελική περιοχή αποτελείται από 8 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές περιοχές και 9 α-έλικες

που μαζί συνιστούν την  $\alpha/\beta$  δομή. Η σύνδεση του ATP γίνεται στην περιοχή  $15\text{\AA}$ , στην πραγματικότητα είναι μια θήκη που σχηματίζεται από την διαμόρφωση των  $\beta$ -πτυχωτών περιοχών με τις  $\alpha$ -έλικες. Εικόνα 2.



**Εικόνα 4. Α. Δομική διάθρωση της HSP90 και το ATP-καθοδηγούμενο μοριακό κλείσιμο.** Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης Hsp90α. Η HSP90 αποτελείται από τρεις περιοχές: την αμινο-τελική ATP-σύνδεσης περιοχή (N), μία μεσαία περιοχή σύνδεσης της πρωτεΐνης-υποστρώματος (M), και μία ανθρακο-τελική περιοχή διμερισμού (C) με το πενταπεπτίδιο MEEVD. Μία φορτισμένη περιοχή βρίσκεται μεταξύ της N και M περιοχής. Και οι τρεις περιοχές έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-υποστρώματα, **B. ATPase κύκλος της HSP90.** Η HSP90 χωρίς δεσμευμένη ATP βρίσκεται σε μία ανοιχτή κατάσταση με τα καρβοξυ-τελικά άκρα της συνεχώς σε διμερή μορφή. Μετά τη πρόσδεση ATP στην αμινο-τελική περιοχή επάγονται αλλαγές της

διαμόρφωσης έχοντας ως αποτέλεσμα την κλειστή κατάσταση της HSP90. (πηγή: [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)).

#### **1.4.5.β Ρόλος των HSP90**

Ο βασικός ρόλος των HSP90 υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι να υποβοηθούν στην ορθή αναδίπλωση πολυπεπτιδίων ( Frydman, 2001; Buchner, 1999) αλλά επίσης εικάζεται ότι εμπλέκονται στη μεταφορά σήματος, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την αποδόμηση πρωτεϊνών. ( Young et al., 2001; Richter and Buchner, 2001; Pratt et al., 2001). Επίσης, οι οικογένεια των Hsp90 πρωτεϊνών πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στον έλεγχο της μορφολογικής εξέλιξης και την προσαρμογή στα διάφορα είδη σοκ στη *Drosophila* και το *Arabidopsis*. (Rutherford and Lindquist, 1998).

Αντίθετα με τ' άλλα τσαπερόνια, χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό εξειδίκευσης ως προς τις πρωτεΐνες-στόχους. Μέχρι τώρα έχει βρεθεί ότι αποτελούν υπόστρωμα οι υποδοχείς προγεστερόνης, γλυκοκορτικοειδών, οιστρογόνων, ανδρογόνων και μεταλλοκορτικοειδών. Όσον αφορά τις κινάσες-υποστρώματα αυτές είναι η V-SRC, η Wee1, ο elf-2a, η Casein kinase 2, η RAF-1, η Gcn2 και η Calcineurin. Επίσης υπόστρωμα αποτελούν διάφορες πρωτεΐνες όπως παράγοντες θερμικής καταπόνησης, η συνθετάση του οξειδίου του αζώτου, η p53, η ανάστροφη μεταγραφάση των ιών, η τελομεράση (Holt et al., 1999), ο TNF (Tumor Necrosis Factor) και η σωληνίνη (tubulin). (Buchner, J. 1999).

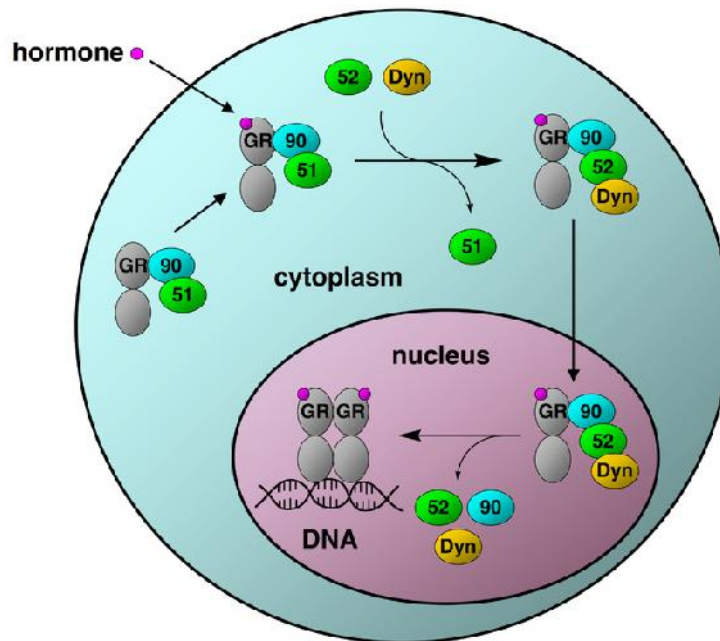
Το καλύτερα μελετημένο υπόστρωμα είναι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών (Steroid Hormone Receptors, SHRs). Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες υποδοχείς, οι SHRs αποτελούν ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες κινούνται παλινδρομικά μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα. Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελούνται από μια περιοχή δέσμευσης της ορμόνης, μια περιοχή δέσμευσης του DNA και μια περιοχή που ευθύνεται για την ενεργοποίηση των γονιδίων που ελέγχονται από το ορμονικό σύστημα. Οι HSP90 συνδέονται εξειδικευμένα με τα SHRs, απουσία της ορμόνης, και τα διατηρούν σε μια διαμόρφωση με μεγάλη συγγένεια για την τελευταία. Η παρουσία των ορμονών προκαλεί την αποσύνδεση του συστήματος HSP90-SHR, τον διμερισμό του υποδοχέα επιτρέποντας έτσι την σύνδεσή του με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA αλλά και την ρύθμιση της μεταγραφής. Οι Hsp90 καθιστούν τους

υποδοχείς ανενεργούς, δεν είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή, γι' αυτό το λόγο πιστεύεται ότι λειτουργούν ως καταστολείς, σε αυτή την περίπτωση. (Buchner, J., 1999). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, σχηματική αποικόνιση του συστήματος δίνεται στην εικόνα 4.

Έχει δειχθεί ότι οι HSP90 αποτελούν μέρος ενός μηχανισμού πολυ-τσαπερονίων μαζί με τις HSP70 και την συνεργασία βοηθών-τσαπερονίων. Οι βοηθοί-τσαπερόνια ή αλλιώς πρωτεΐνες-συνέταιροι (Hsp90 partner proteins) περιλαμβάνουν τις εξής πρωτεΐνες: Hip (Hsp70 πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης), Hop (Hsp70/Hsp90 πρωτεΐνη οργάνωσης), p23 και Hsp40 (ομόλογα της DnaJ), ανοσοφιλική FKBP51 και FKBP52 και η p50(Cdc37) η οποία έχει ανιχθευθεί μόνο σε συστήματα με υποστρώμα κινάσες. (Miernyk, A. J., 1999; Zhang, Z et al., 2003). Η συνεργασία αυτή οδηγεί στην δημιουργία ενός συστήματος, το CCH (Cytoplasmic Chaperone Heterocomplex). Το σύστημα αυτό έχει μελετηθεί περισσότερο στα θηλαστικά, όπου παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς στεροειδών ορμονών και κινάσες. (Buchner, J. 1999). Η Hsp90 μαζί με τουλάχιστον έξι πρωτεΐνες-συνέταιρους συνδέονται στον υποδοχέα ορμονών. Η αλλαγή στη διαμόρφωση που υφίσταται το σύστημα είναι αναγκαία για την μετέπειτα σύνδεση της ορμόνης στον υποδοχέα. Μετά την σύνδεση του υποκαταστάτη και την αποσύνδεση του συστήματος CCH, το ενεργοποιημένο πλέον σύστημα ορμόνη-υποδοχέας λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Σε περίπτωση απουσίας του υποκαταστάτη, οι υποδοχείς συνδέονται με την HSP70 και ξεκινούν έναν καινούριο κύκλο. Δυο σημαντικοί παράγοντες οδήγησαν στον χαρακτηρισμό του συστήματος CCH: α) το σύστημα μπορεί να συγκροτηθεί *in vitro* μετά από απομόνωση των συστατικών και β) αυτή η κατασκευή μπορεί να παρεμποδισθεί από την τζελνταναμυκίνη, αναστολέα της δράσης της Hsp90. (Buchner, J. 1999).

Ο ρόλος των HSP90 πρωτεϊνών στην επιβίωση των κυττάρων σε ακραίες θερμοκρασίες δεν είναι ξεκάθαρος. Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι στην ζύμη η παρουσία της HSP90p είναι απαραίτητη σε υψηλές συγκεντρώσεις για την επιβίωση και ομαλή ανάπτυξη σε συνθήκες περιοριστικών θερμοκρασιών. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι η βακτηριακή HSP90 (HtpG) σε αντίθεση με τις αντίστοιχες HSP90 πρωτεΐνες πολυκύτταρων οργανισμών, δεν μπορούν να διασώσουν στελέχη ζύμης τα οποία έχουν έλλειψη της πρωτεΐνης (Hsp90p). Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η βακτηριακή HSP90 στερείται της φορτισμένης περιοχής αλλά και του πενταπεπτιδίου MEEVD που εμφανίζεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα (εικόνα 3). Φαίνεται πως οι δυο αυτές περιοχές είναι πολύ σημαντικές τόσο για τη λειτουργία της Hsp90p όσο και για την βιωσιμότητα

της ζύμης. Επιπρόσθετα, σε κυτταρική σειρά από ωοθήκη χάμστερ, που είναι ιδιαίτερα θερμοανθεκτική, η HSP90 είναι η μοναδική πρωτεΐνη της οποίας η συγκέντρωση αυξάνεται αξιοσημείωτα.



**Εικόνα 5.** Σχηματική απεικόνιση της μεταφοράς του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με την βοήθεια της HSP90. Στο κυτταρόπλασμα, ο GR βρίσκεται σε σύστημα με την HSP90 και την ανοσοφιλική FKBP51 (πρωτεΐνη-συνέταιρος). Η σύνδεση της ορμόνης στο GR προκαλεί μορφολογική αλλαγή στο σύστημα με αποτέλεσμα την εναλλαγή της FKBP51 από την FKBP52. Η FKBP52 με τη σειρά της συνδέεται με την δυνεΐνη (dyn, κινητική πρωτεΐνη) και αυτή με τον κυτταροσκελετό και μεταφέρουν το σύστημα GR-Hsp90-FKBP52-dyn στον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα το σύστημα διαχωρίζεται στα συστατικά του. Ο GR διμερίζεται και συνδέεται στο DNA του οποίου ρυθμίζει την μεταγραφή. (πηγή: en.wikipedia.org).

#### 1.4.5γ Hsp90 και φαινότυπος

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, η ποικιλομορφία σε επίπεδο μορφολογίας και λειτουργίας αποτυπώνεται σε γενετική διαφορά μεταξύ ατόμων και πληθυσμών. Οι φαινότυποι των ειδών πρέπει γενικά να είναι ελαστικοί στη γενετική ποικιλότητα και την περιβαλλοντική αλλαγή και γι' αυτό απαιτούν ρυθμιστικά συστήματα για την εξασφάλιση κανονικής ανάπτυξης (Queitsch et al, 2002). Τα συστήματα αυτά επηρεάζονται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις που λαμβάνουν χώρα με αποτέλεσμα να αποκαλύπτουν γενετικές ποικιλομορφίες. Πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν ότι το HSP90 τσαπερόνιο λειτουργεί ως ρυθμιστής της γενετικής ποικιλομορφίας στη *Drosophila melanogaster*. Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών ελέγχει σε μεγάλο βαθμό φαινοτυπικές μεταβολές για ένα μεγάλο εύρος μορφολογικών χαρακτηριστικών πολλών οργανισμών. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, οι μεταβολές αυτές στο φαινότυπο υποδεικνύουν το ρόλο των HSP90 στην ομαλή ανάπτυξη του φυτού μέσω της διαφοροποιούσας επιλογής ('canalization') (Rutherford and Lindquist, 1998) όσο και στην αντοχή του οργανισμού έναντι ασθενειών (Sangster and Queitsch, 2005).

Ο όρος 'canalization' χρησιμοποιήθηκε από τον Waddington το 1953 για να περιγράψει το φαινόμενο της κυριαρχίας συγκεκριμένων φαινοτύπων έναντι άλλων στο οργανισμό αγρίου τύπου. Σύμφωνα με τον Waddington, 'η σταθερότητα του φαινοτύπου του αγρίου τύπου πρέπει να ληφθεί ως απόδειξη της ρύθμισης του γενότυπου έναντι μικρών διακυμάνσεων όχι μόνο στο περιβάλλον ανάπτυξης των ζώων αλλά και της γενετικής τους φύσης'. Ωστόσο η ικανότητα σταθεροποίησης των οργανισμών μπορεί να διαταραχθεί από διάφορους περιβαλλοντικούς, γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες δημιουργώντας ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων το οποίο παρεκκλίνει του 'κανονικού'. (Waddington, 1953, 1956; McLaren, 1999). Σήμερα είναι γνωστό ότι φαινότυποι οι οποίοι εμφανίζονται μετά από κάποια περιβαλλοντική αλλαγή μπορούν να διατηρηθούν μέσω της φυσικής επιλογής και να κληρονομηθούν. Έτσι, οι οργανισμοί αυτοί που φέρουν τα διαφορετικά χαρακτηριστικά επιβιώνουν στις νέες συνθήκες, τα μεταφέρουν στην επόμενη γενεά και τα καθιστούν μόνιμα χαρακτηριστικά του πληθυσμού ('γενετική αφομοίωση'). (Waddington, 1953, 1956).

Σύμφωνα με την έρευνα των Rutherford και Lindquist το τσαπερόνιο των HSP90 φαίνεται να αποτελεί πιθανό μοριακό μηχανισμό για το φαινόμενο του 'canalization' αλλά και της γενετικής αφομοίωσης καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως ρυθμίζει

περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές/αποκλίσεις. Αυτό συμβαίνει διότι όπως έχει ήδη αναφερθεί οι HSP90 εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια στην ανάπτυξη των οργανισμών, αφού συμμετέχουν στην ωρίμανση και την σταθεροποίηση πολλών ασταθών πρωτεϊνών, όπως κινάσες και ρυθμιστικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν πολλά και διάφορα βιολογικά συστήματα (Picard 2002). Είναι λογικό, λοιπόν, η μείωση των επιπέδων των HSP90 πρωτεϊνών να δημιουργεί ποικίλους φαινοτύπους ως αποτέλεσμα της μείωσης της αναπτυξιακής σταθερότητας επαναλαμβανόμενων χαρακτήρων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των HSP90 στην φαινοτυπική πλαστικότητα, ένα φαινόμενο που εμφανίζεται στους οργανισμούς μετά από περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Ως πλαστικότητα ορίζεται η φαινοτυπική ποικιλομορφία που προδίδει ένας δεδομένος γενότυπος εξαρτώμενος/ επηρεαζόμενος από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. (Salathia and Queitsch 2007).

Μεταλλάγματα των κυτταροπλασματικών Hsp90 (AtHsp90.1-4) του φυτού *Arabidopsis thaliana* έδωσαν ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης από το σπόρο μέχρι το ώριμο φυτό. Οι φαινότυποι περιελάμβαναν μορφολογικές διαταραχές των σπόρων όπως, σπέρματα ρυτιδιασμένα και διαφορετικών σχημάτων αλλά και σπέρματα όπου το έμβρυο ή το ενδοσπέρμιο απουσίαζαν, διαταραχές στο έμβρυο όπως, ελαττωματική ρίζα (π.χ. διαχωρισμός του κεντρικού κυλίνδρου), αδυναμία οργάνωσης του ηθμού και του ξύλου των κοτυληδόνων. Στο ώριμο φυτό οι διαταραχές στο φαινότυπο αφορούσαν κυρίως τη δομή του κορμού του φυτού εμπλέκοντας τις HSP90 σε αναπτυξιακά μονοπάτια που επηρεάζουν την μορφογένεση στα διαφορετικά της στάδια (Samakovli, D. et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά στήριξαν τον ισχυρισμό ότι οι HSP90 συμμετέχουν στην αναπτυξιακή πλαστικότητα των φυτών.

Όμως, ο πολυμορφισμός που χαρακτηρίζει τα μεταλλάγματα έδωσε και άλλες πληροφορίες εκτός από την ανάμιξη των HSP90 στην αναπτυξιακή πλαστικότητα. Η τυχαία απόκλιση των φαινοτύπων που παρουσιάζονται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων υποδεικνύουν μια συσχέτιση μεταξύ των HSP90 και των στοχαστικών μηχανισμών της ανάπτυξης. Οι στοχαστικοί μηχανισμοί είναι ικανοί να επιφέρουν αλλαγές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με σινιάλα και μονοπάτια των διαδικασιών ανάπτυξης. Οι HSP90 στην περίπτωση αυτή θέτουν τα όρια μεταξύ των οποίων κυμαίνεται ο φαινότυπος. Όταν επέλθει μείωση των επιπέδων των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, τότε τα όρια καταργούνται/ελαστικοποιούνται και ενεργοποιούνται οι στοχαστικοί μηχανισμοί δημιουργώντας την φαινοτυπική



ποικιλομορφία. Εάν το επίπεδο των HSP90 συνεχίσει να ελαττώνεται έχοντας ως αποτέλεσμα το “άνοιγμα” των ορίων όλο και περισσότερο τότε το φυτό μπορεί να οδηγηθεί στο θάνατο.

Συμπερασματικά, η τυχειότητα των φαινοτύπων δηλώνει ότι το σύστημα των HSP90 στην πραγματικότητα περιορίζει την ένταση των διαταραχών στην ανάπτυξη, αποτελεί προϋπόθεση του πολυμορφισμού στη μορφογένεση των πολυκύτταρων οργανισμών και τέλος, ρυθμίζει τη κανονική ανάπτυξη (‘canalization’).

Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η φαινοτυπική πλαστικότητα μπορεί να επαχθεί ως αμυντικός μηχανισμός έναντι διαφόρων παθογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της λειτουργίας του HSP90 πρωτεϊνών ως αμυντικό μηχανισμό αποτελεί η ανοσία των φυτών. Η ανοσία επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση των R (resistance) πρωτεϊνών οι οποίες επιτρέπουν την αναγνώριση συγκεκριμένων μορίων των παθογόνων. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αντοχής συνήθως επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) η οποία περιλαμβάνει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στο σημείο της μόλυνσης (Belkhadir et al 2004; Schulze – Lefert, 2004). Έρευνες έδειξαν ότι η μόλυνση φυτών από το *Pseudomonas syringae* προκαλεί υπερέκφραση των θερμοεπαγόμενων γονιδίων HSP90.1 και HSP90.2 τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια που περιλαμβάνουν συγκεκριμένα γονίδια αντοχής, R (RPM1 και RPS2). (Takahashi et al., 2003).

Ωστόσο η αλληλεπίδραση των HSP90 και των R πρωτεϊνών αφορά και μια άλλη λειτουργική πλευρά των HSP90. Οι R πρωτεΐνες, διατηρούν ένα υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού πιθανότατα εξαιτίας του συνεχούς ανταγωνισμού μεταξύ των παθογόνων και των φυτών. Αν η ρυθμιστική ικανότητα των HSP90 διαφοροποιηθεί εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών, μεταλλάξεων ή φαρμακολογικών/χημικών παρεμβάσεων, τέτοιοι πολυμορφισμοί μπορεί να παρατηρηθούν φαινοτυπικά πιστοποιώντας την υπόθεση ότι η οικογένεια των HSP90 μπορεί να επηρεάσει την εξελικτική διαδικασία. Συμπερασματικά, το σύστημα των HSP90 μοριακών συνοδών έχει έμφυτη την ευλυγισία ώστε να γεφυρώνεται με τις γρήγορα διαφοροποιούμενες R πρωτεΐνες. (Sangster and Queitsch 2005).

## **1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**

Οι παράγοντες θερμικής καταπόνησης (Heat Shock Factors, HSF) ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων θερμικού σοκ. (Nover, 1991; Morimoto et al., 1992). Η αυξημένη έκφραση των θερμοεπαγόμενων γονιδίων οδηγεί στην ραγδαία συγκέντρωση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, HSPs. Παρά του γεγονότος ότι οι παράγοντες αυτοί ποικίλουν αρκετά σε μέγεθος ή αλληλουχία, η βασική τους δομή και ο τρόπος αναγνώρισης του προαγωγέα είναι συντηρημένα στο ευκαρυωτικό βασίλειο.

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι παράγοντες θερμικού σοκ βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση ως μονομερή. Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση ασυνήθιστων πρωτεϊνών μετά από κάποια μορφή καταπόνησης ενεργοποιεί τους HSFs που σχηματίζουν έτσι τριμερείς δομές.

Η σύνδεση των τριμερών HSFs γίνεται σε συγκεκριμένες περιοχές του προαγωγέα των γονιδίων των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, που ονομάζονται στοιχεία θερμικής καταπόνησης (Heat shock Element, HSE). Τα στοιχεία αυτά αποτελούνται από επαναλήψεις της κεντρικής αλληλουχίας 5'-nGAAn-3' ή της συμπληρωματικής αλληλουχίας 5'-nTTCn-3'. Για μια επιτυχή σύνδεση είναι απαραίτητες τουλάχιστον τρεις τέτοιες επαναλήψεις στη μορφή 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3'. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι το πιο διαδεδομένο, υπάρχουν όμως και άλλα με μικρές παραλλαγές. (Schoffl et al., 1998; Morimoto, 1998; Wu et al., 1995). Στο γονιδίωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* έχουν εντοπισθεί 21 γονίδια που κωδικοποιούν για HSFs, γεγονός που υποδεικνύει την πολύπλοκη φύση της απόκρισης στην υψηλή θερμοκρασία (Schoeffl and Praendl, 1999).

Τα στοιχεία θερμικού σοκ δομικά συντελούνται από α) μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA (*DNA binding domain*), β) μια περιοχή ολιγομερισμού (*oligomerization domain, HR-A/B*), γ) μια αλληλουχία σινιάλο πυρηνικής τοποθέτησης (*Nuclear Localization Signal, NLS*) και δ) από το C-καρβόξυ τελικό άκρο (*Activation Domain, AD*).

## **1.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ (RNA silencing)**

Ο όρος RNA παρεμβολή (RNAi, RNA interference) χρησιμοποιήθηκε ως γενικός όρος στους διάφορους οργανισμούς, ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς, για να περιγράψει το μηχανισμό της γονιδιακής αποσιώπησης η οποία έχει ως αποτέλεσμα είτε την αποικοδόμηση ορισμένων mRNA-στόχων είτε την καταστολή της μετάφρασης του mRNA-στόχου. Η παρεμβολή (ή αποσιώπηση) συμβαίνει μετα-μεταγραφικά και επάγεται από την παρουσία δίκλωνου RNA, dsRNA (double stranded RNA).

Πρόκειται για έναν πολύ συντηρημένο μηχανισμό μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών και γι' αυτό δρά ως φυσικός αμυντικός μηχανισμός έναντι ιών, μεταθετών στοιχείων και ενδεχομένως άλλων επαναλαμβανόμενων γενωματικών ακολουθιών (αποσταθεροποίησης). Επίσης, κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη φυτών και ζώων επάγοντας ένα ευαίσθητο σύστημα γονιδιακής ρύθμισης το οποίο μπορεί να συμβεί μέσω αποικοδόμησης του RNA ή μέσω καταστολής της μετάφρασης ή μέσω τροποποίησης της χρωματίνης. (Wang and Metzloff, 2005). Οι όροι που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή του μηχανισμού γονιδιακής αποσιώπησης, διαφέρουν μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Συγκεκριμένα, στους φυτικούς οργανισμούς χρησιμοποιούνται οι όροι συγκαταστολή ή μετά-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS), στους μύκητες χρησιμοποιείται ο όρος καταστολή και στους ζωικούς οργανισμούς χρησιμοποιείται ο όρος RNA παρεμβολή (RNA interference). Ανεξάρτητα όμως από την ονομασία που δίνεται σε κάθε περίπτωση ο μηχανισμός σε όλες τις περιπτώσεις βασίζεται στην ύπαρξη δίκλωνων περιοχών, dsRNA.

Ο σχηματισμός δίκλωνων περιοχών συνιστά μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο με την οποία ένα RNA μπορεί να ελέγξει την ενεργότητα ενός άλλου. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου μονόκλινα (συνήθως πολύ μικρά) μόρια RNA ζευγαρώνουν με μια συμπληρωματική περιοχή ενός mRNA, παρεμποδίζοντας έτσι την έκφρασή του. Το φαινόμενο αυτό αρχικά παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις στις οποίες αντισημείωντα γονίδια (antisense genes) εισήχθησαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα αντισημείωντα γονίδια κατασκευάζονται με αντιστροφή του προσανατολισμού ενός γονιδίου, ως προς τον υποκινητή, έτσι ώστε τελικά να συντίθεται αντισημείων RNA. Η σύνθεση του αντισημείωντος RNA αδρανοποιεί το RNA-στόχο λειτουργώντας ως ένας ρυθμιστής RNA. Η καταστολή της έκφρασης επιτυγχάνεται με

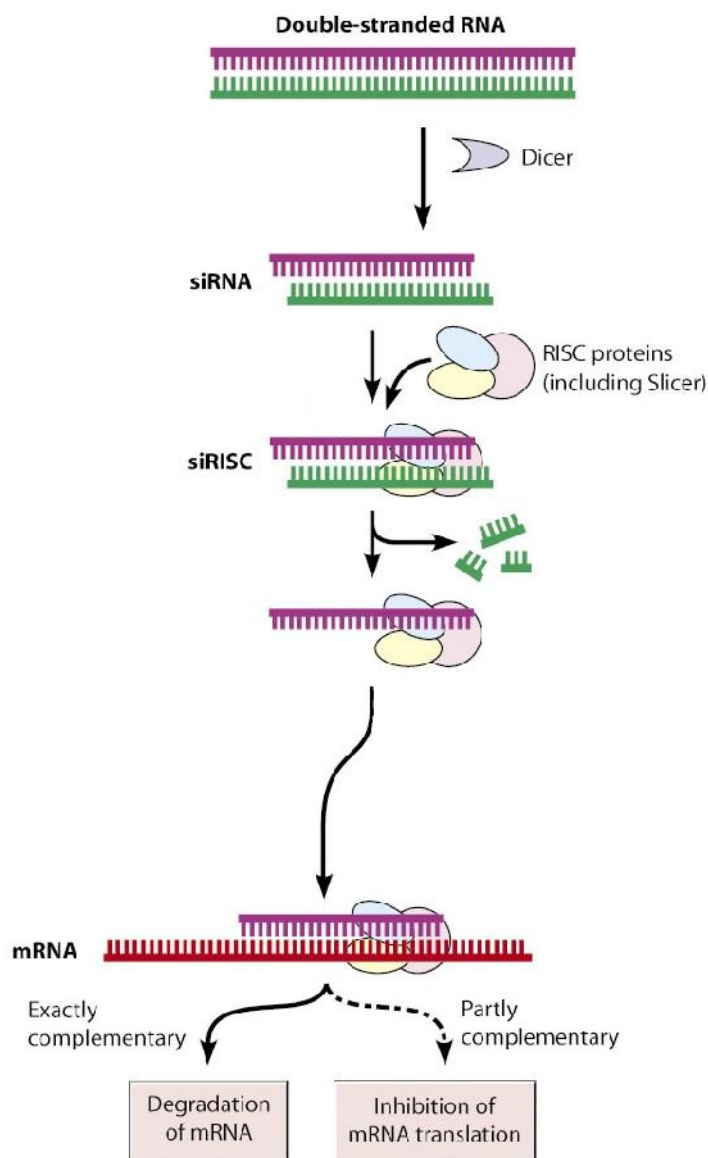
παρεμπόδιση της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου, της επεξεργασίας του προϊόντος RNA ή παρεμπόδιση της μετάφρασης του μηνύματος, σε κάθε περίπτωση η καταστολή εξαρτάται από το σχηματισμό δίκλωνων μορίων RNA\*RNA.

Ο μηχανισμός της RNA αποσιώπησης, τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, διαθέτει δυο επικαλυπτόμενα αλλά και διακριτά μονοπάτια, το siRNA (small interfering RNAs) και το miRNA (micro-RNA). (Baulcombe D, 2004; Meister G and Tuschl T, 2004). Τα mi/siRNA ονομάζονται μικρά μόρια RNA (small RNAs, sRNA) και έχουν πολλές ομοιότητες. Έχουν μέγεθος 21-24 νουκλεοτίδια και προέρχονται από μεγαλύτερα πρόδρομα δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNA) μετά τη δράση της ριβονουκλεάσης Dicer. Επίσης και τα δύο ενσωματώνονται σε ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συστήματα αποσιώπησης μέσω των οποίων καθοδηγούν την καταστολή γονιδίων-στόχων. Ωστόσο, έχουν μία θεμελιώδη διαφορά όσον αφορά την φύση των πρόδρομών τους RNA. Τα miRNA προέρχονται από μονόκλιωνα μόρια RNA τα οποία περιλαμβάνουν ατελή δευτεροταγή δομή "φουρκέτας" ενώ τα siRNA προέρχονται από μεγάλο μεγέθους δίκλιωνα μόρια. (Matthew W. Jones-Rhoades et al., 2006). Η παρούσα πτυχιακή αφορά το σχηματισμό και τον μηχανισμό δράσης των siRNA.

Τα μεταθετά στοιχεία, τα διαγονίδια και οι ιοί επάγουν το σχηματισμό δίκλωνων μορίων RNA. Όμως και ενδογενείς αλληλουχίες μπορεί να προκαλέσουν την δημιουργία dsRNAs. Σε όλες τις περιπτώσεις ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αποσιώπησης, σχηματική απεικόνιση του οποίου παρουσιάζεται στην εικόνα 5. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν μια RNA-εξαρτώμενη-RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), η οποία χρησιμοποιεί ως μήτρα μονόκλινο RNA. Με την βοήθεια της δημιουργούνται τα dsRNA τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από την εξειδικευμένη RNAαση Dicer, που είναι παρούσα σε ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, και αποικοδομούνται σε μικρά τμήματα των 22-23 ζεύγη νουκλεοτιδίων σε μήκος, τα siRNAs. Μια αλυσίδα των siRNA ενσωματώνεται στο RNA επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης, RISC (RNA induced silencing complex). Η επιλογή της μονόκλωνης αλυσίδας που θα ενσωματωθεί στο RISC γίνεται με βάση τη θερμοδυναμική, εκείνη με το πιο ασταθές 5' άκρο "φορτώνεται" στο σύμπλοκο. Στη συνέχεια γίνεται η ανάγνωση των ομόλογων περιοχών στο mRNA-στόχο δημιουργώντας στα σημεία εκείνα δίκλωνες περιοχές. Αυτό έχει ως συνέπεια την αποκοπή του mRNA, με το προϊόν της αποκοπής να χαρακτηρίζεται από 3' υδροξυλική και 5' φωσφορική ομάδα. Το τελικό αποτέλεσμα

είναι η αποδόμηση του mRNA. (Carrington C. James et al., 2000; Matthew W. Jones-Rhoades et al., 2006).

Μια απο τις σημαντικότερες πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στο σύμπλοκο RISC είναι αυτές της οικογένειας Argonaute (AGO). Ο σημαντικότερος ρόλος τους είναι η δέσμευση και ενσωμάτωση της μονής αλυσίδας του siRNA στο σύμπλοκο αποσιώπησης αλλά φαίνεται να συμμετέχουν και στην αλλαγή της διαμόρφωσης του συμπλόκου ώστε να είναι εφικτή η σύνδεση της απλής αλυσίδας του siRNA.



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

**Εικόνα 6. Μηχανισμός της δράσης του RNAi.** Το διπλής έλικας RNA κόβεται από την Dicer σε μικρότερα δίκλιωνα μόρια μεγέθους 21-24 νουκλεοτιδίων, τα siRNA. Τα siRNA, στη συνέχεια, συνδέονται με το σύμπλοκο RISC, αναγνωρίζουν την ομόλογη περιοχή στο mRNA-στόχο και προσδέονται σε αυτό. Η πρόσδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του mRNA και συνεπώς την καταστολή της έκφρασης.

## **1.7 Η οικογένεια RAC/ROP small GTPases**

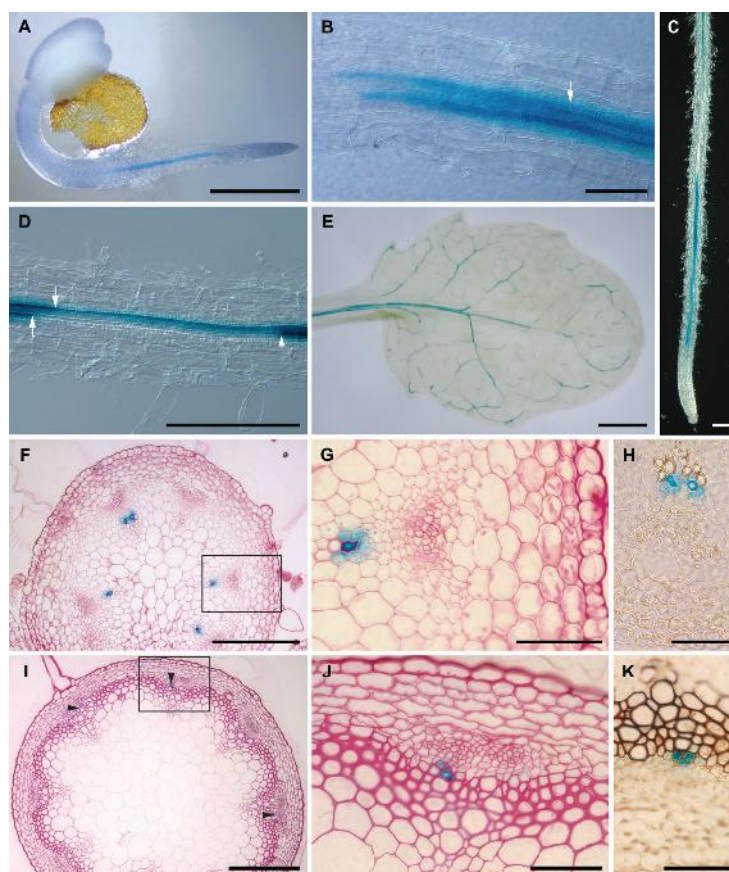
Η Rho οικογένεια μικρών GTPασών (Rho, Rac και Cdc42) αποτελεί μια ξεχωριστή ομάδα πρωτεϊνών η οποία φτάνει πολύ πίσω στην εξέλιξη, από τα πρώτα μονοκύτταρα ευκαριωτικά κύτταρα. Πρωτεΐνες της Rho οικογένειας συναντάμε στα πρωτόζωα αλλά και στους μύκητες, τα φυτά και τα ζώα. Μπορεί να ενεργοποιηθούν από ενδογενή ή εξωγενή σινιάλα παίρνοντας την ενεργή GTP μορφή τους, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες στόχους του κυττάρου ή με τελεστές αλλά και την επαγωγή πολλών κυτταρικών αποκρίσεων. Στις κυτταρικές αντιδράσεις περιλαμβάνονται η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η μεταγωγή σημάτων λόγω στρεσαρίσματος και η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων μέσω διαμεμβρανικών σινιάλων.

Έρευνες έδειξαν πως στα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες RAC είναι σημαντικές για την επιλογή της τοποθεσίας του πολυμερισμού της ακτίνης μεταξύ της πτυχωτής μεμβράνης και τον ελασματοποδίων (Ridley et al. 1992). Στη ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, όπου δεν υπάρχουν οι RAC πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη Cdc42 παίζει σημαντικό ρόλο συντονίζοντας μορφογενετικές διαδικασίες εξαρτώμενες από την ακτίνη. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως οι πρωτεΐνες RAC στα φυτά έχουν παρόμοιες λειτουργίες με αυτές των ομολόγων τους στη ζύμη και τα θηλαστικά (Xia et al. 1996, Lin and Yang 1997). Επιπροσθέτως, οι πρωτεΐνες RAC στα φυτά φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης του γυρεοσωλήνα (Winge et al. 2000).

Η οικογένεια των RAC γονιδίων είναι μεγάλη, συνίσταται από 11 γονίδια και μπορεί να διαιρεθεί σε δύο υποοικογένειες (subgroup I και subgroup II) με βάση διαφορών που εμφάνισαν τα γονίδια στην αλληλούχιση και την παρουσία ενός πρόσθετου εσωνίου στα μέλη της υποοικογένειας II (Winge et al. 2000, Christensen et al. 2003). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως στα ριζικά τριχίδια του φυτού *Arabidopsis thaliana* αλλά και στα επιδερμικά κύτταρα, οι πρωτεΐνες της RAC/ROP οικογένειας παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πολική ανάπτυξη των κυττάρων (Molendijk et al. 2001, Jones et al. 2002, Fu et al. 2002), επίσης υποδεικνύεται η εμπλοκή τους στην ρύθμιση της οξειδωτικής δραστηριότητας της NADPH (Kawasaki et al., 1999; Ono et al., 2001; Baxter-Burrell et al., 2002). Η δραστηριότητα της NADPH έχει προταθεί ως ένα σημαντικό κομμάτι τόσο στην απόκριση των φυτών σε παθογόνους μικροοργανισμούς και σε ορμονικές διαταραχές όσο και στην ανθεκτικότητα απέναντι σε καταστάσεις έλλειψης οξυγόνου (Neill et al., 2002; Overmyer et al., 2003).

◆ Το γονίδιο *AtRAC2/ROP7*

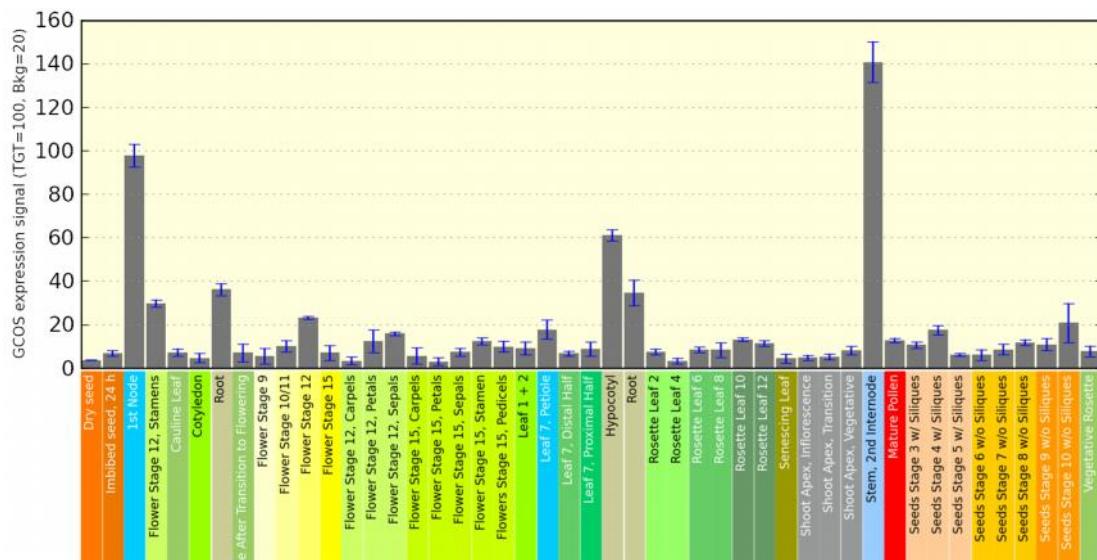
Από τα 11 γονίδια της οικογένειας *AtRAC/ROP*, το γονίδιο *AtRAC2/ROP7* (At5g45970) είναι αυτό που ενδιαφέρει την παρούσα εργασία. Αποτελεί αρχαίο μέλος της υποοικογένειας I, της οικογένειας γονιδίων *AtRAC/ROP* και φαίνεται να έχει εξελιχθεί με την εμφάνιση των αγγειωδών φυτών (Winge et al. 2000, Christensen et al. 2003). Σε παλαιότερες μελέτες, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* φαίνεται να εμφανίζονται στις ρίζες και το βλαστό (Winge et al., 1997), ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν πως η έκφρασή του είναι υψηλή και ‘ενεργή’ μόνο στο πρωτοξύλωμα των ριζών, κοτυληδόνων, βλαστών και φύλλων και ακολουθεί η έκφραση στον σχηματισμό του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (Brembu et al. 2005).



**Εικόνα 6:** Ιστοχημική ανάλυση της *AtRAC2/ROP7:GUS* κατασκευής στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Τέσσερις ανεξάρτητες σειρές μετασχηματισμού έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα. (A) νεαρά φυτά *AtRAC2/ROP7:GUS* ηλικίας 1 ημέρας δείχνουν την έκφραση του *GUS* στο πρωτοξύλωμα. (B) έκφραση του *GUS* σε πρωτοξύλωμα και μεταξύλωμα σε 6 ημερών πρωτογενούς ρίζας. Τα βέλη δηλώνουν τις πρώτες ορατές δομές δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος. (C) έκφραση του *GUS* σε πρωτογενής ρίζα ηλικίας 10 ημερών. (D) τμήμα της πρωτογενούς ρίζας, (E), δείχνοντας τις

εσωτερικές και εξωτερικές κυτταρικές σειρές του μεταξυλώματος. (E) νεαρά φύλλα ροζέτας από φυτό ηλικίας 12 ημερών όπου δείχνουν την έκφραση του GUS στον αγγειακό ιστό. (F) τομή βλαστού ηλικίας 27 ημερών με επιπλέον χρώση με σαφρανίνη. Η έκφραση του GUS τοποθετείται στα αναπτυσσόμενα κύτταρα του ξύλου. (G) μεγένθυση της σημαίνουσας περιοχής της (F). (I) τομή βλαστού στην περιοχή του πρώτου μεσογονάτιου σε φυτά ηλικίας 42 ημερών με επιπλέον χρώση με σαφρανίνη. (J) μεγένθυση της σημαίνουσας περιοχής της εικόνας (I). μπάρες: 500μm για τις (A) και (E), 200μm για τις (C), (D), (F) και (I) και τέλος, 50μm για τις (B), (G), (J) και (K).

Βέβαια, πρόσφατα δεδομένα από microarrays δείχνουν πως mRNA του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* υπάρχει παντού στο φυτό, σε όλους του ιστούς και όλα τα αναπτυξιακά στάδια σε μικρή ποσότητα. Σύμφωνα με δεδομένα του προγράμματος ef-Browser, παρατηρούνται κάποια μέγιστα της έκφρασης του γονιδίου σε συγκεκριμένους ιστούς όπως είναι τα κύτταρα του αγωγού ιστού στο πρώτο και δεύτερο μεσογονάτιο στο βλαστό και στο υποκοτύλιο. Στην εικόνα 7 φαίνεται το σχεδιάγραμμα της έκφρασης του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* σε κάθε ιστό και αναπτυξιακό στάδιο όπως έχει δημοσιευθεί στο TAIR.



**Εικόνα 7:** σχεδιάγραμμα της έκφρασης του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* σε διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια του φυτού *Arabidopsis thaliana*.



Όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, τα γονίδια της οικογένειας AtRAC/ROP εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια σημαντικά για την επιβίωση του κυττάρου. Έχει δειχθεί πως οι πρωτεΐνες του γονιδίου AtRAC2/ROP7 εμπλέκονται: (α) στη ρύθμιση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού, (β) της παραγωγής υπεροξειδίου ως αντίδραση άμυνας, (γ) στη μεταγωγή σήματος που επάγεται από την παρουσία καταπόνησης καθώς και (δ) σε μηχανισμούς κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο προαγωγέας του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* ώστε να επιτευχθεί η αποσιώπηση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών HSP90 πρωτεϊνών σε συγκεκριμένους ιστούς όπως είναι τα κύτταρα του αγωγού ιστού και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Σκοπός είναι η μελέτη αλλά και η οποιαδήποτε πιθανή εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στην οργάνωση του αγωγού ιστού.

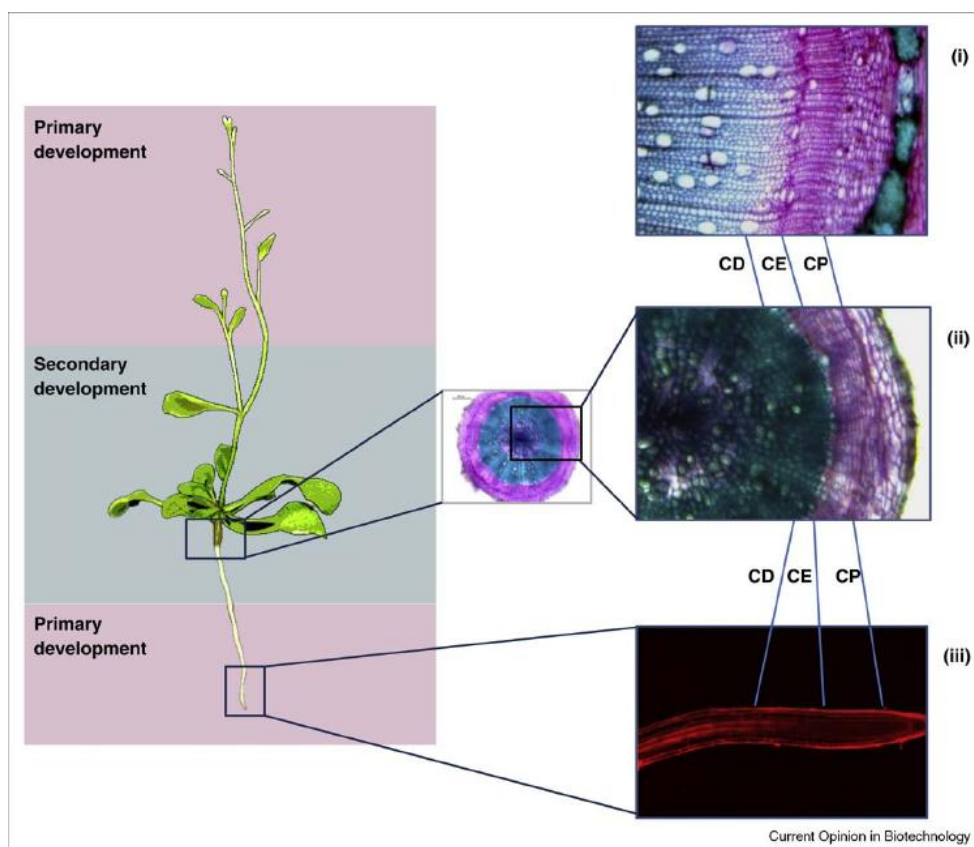
## **1.8 Ο Αγγειακός Ιστός ( plant Vascular tissue)**

Καθώς οι περισσότεροι ρυθμιστικοί μηχανισμοί ελέγχου της ανάπτυξης και της λειτουργίας του μεριστώματος της ρίζας και του ακραίου μεριστώματος του βλαστού είναι γνωστοί, τα δεδομένα για παρόμοιες λειτουργίες των πλάγιων μεριστωμάτων όπως είναι το αγγειώδες κάμβιο, παραμένουν ελλιπή. Τόσο η κατανόηση της ανατομίας και της ανάπτυξης των πλάγιων μεριστωμάτων (προκάμβιο ή αγγειώδες κάμβιο) είναι σχετικά ατελής όσο και η κατανόηση της γενετικής ρύθμισης αυτών. Σήμερα, τα περισσότερα δεδομένα βασίζονται στην μελέτη του ρόλου των φυτικών ορμονών στην ανάπτυξη του αγγειακού ιστού. Για τον λόγο αυτό η αυξίνη, η κυτοκίνη, η γιββερελίνη και το αιθυλένιο φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διατήρησης και της δράσης των μεριστωματικών κυττάρων του καμβίου.

### ◆ Κατασκευή και σχηματισμός του αγωγού ιστού

Ο φυτικός αγγειακός ιστός εξυπηρετεί δύο βασικές λειτουργίες του φυτού: (α) προσδίδουν στήριξη και (β) δίνουν την δυνατότητα για την μεταφορά νερού, θρεπτικών συστατικών και άλλων ουσιών που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη του φυτού αλλά και την άμυνά του. Επίσης, ο αγγειακός ιστός ενώνει όλα τα μέρη του φυτού από το ριζικό σύστημα μέχρι και τα φύλλα μέσω του βλαστού. Ο τρόπος με τον οποίο οργανώνεται ο αγγειακός ιστός σε κάθε φυτό είναι ποικίλος και πολυδύναμος καθώς εξαρτάται από την

βοτανική ταξινόμηση των ειδών. Σε πολλά γυμνόσπερμα και δικοτυλήδωνα αγγειόσπερμα φυτά διακρίνονται δύο επίπεδα ανάπτυξης του αγγειακού: (α) η πρωτογενής ανάπτυξη (primary, εικ.8) και (β) η δευτερογενής ανάπτυξη (secondary, εικ.8). Κατά την πρωτογενή ανάπτυξη στα φύλλα, τους βλαστούς και την ρίζα, ο αγγειακός ιστός δημιουργεί σχηματισμούς, τις δεσμίδες, οι οποίες αποτελούνται από δυο πλήρως διαφοροποιημένους τύπους ιστών, το ξύλο και τον ηθμό. Κατά την δευτερογενή ανάπτυξη στους βλαστούς και την ρίζα το μοτίβο του αγγειακού εξελίσσεται περαιτέρω και παίρνει την τελική μορφή του η οποία αποτελείται από ομόκεντρους δακτυλίους ξύλου (βρίσκονται στο κέντρο), καμβίου και ηθμού (A. Elo et al. 2009). Τα καμβιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και δίνουν γέννηση στον δευτερογενή ηθμό προς τα έξω και στο δευτερογενές ξύλωμα προς τα μέσα (Zhang et al. 2011).



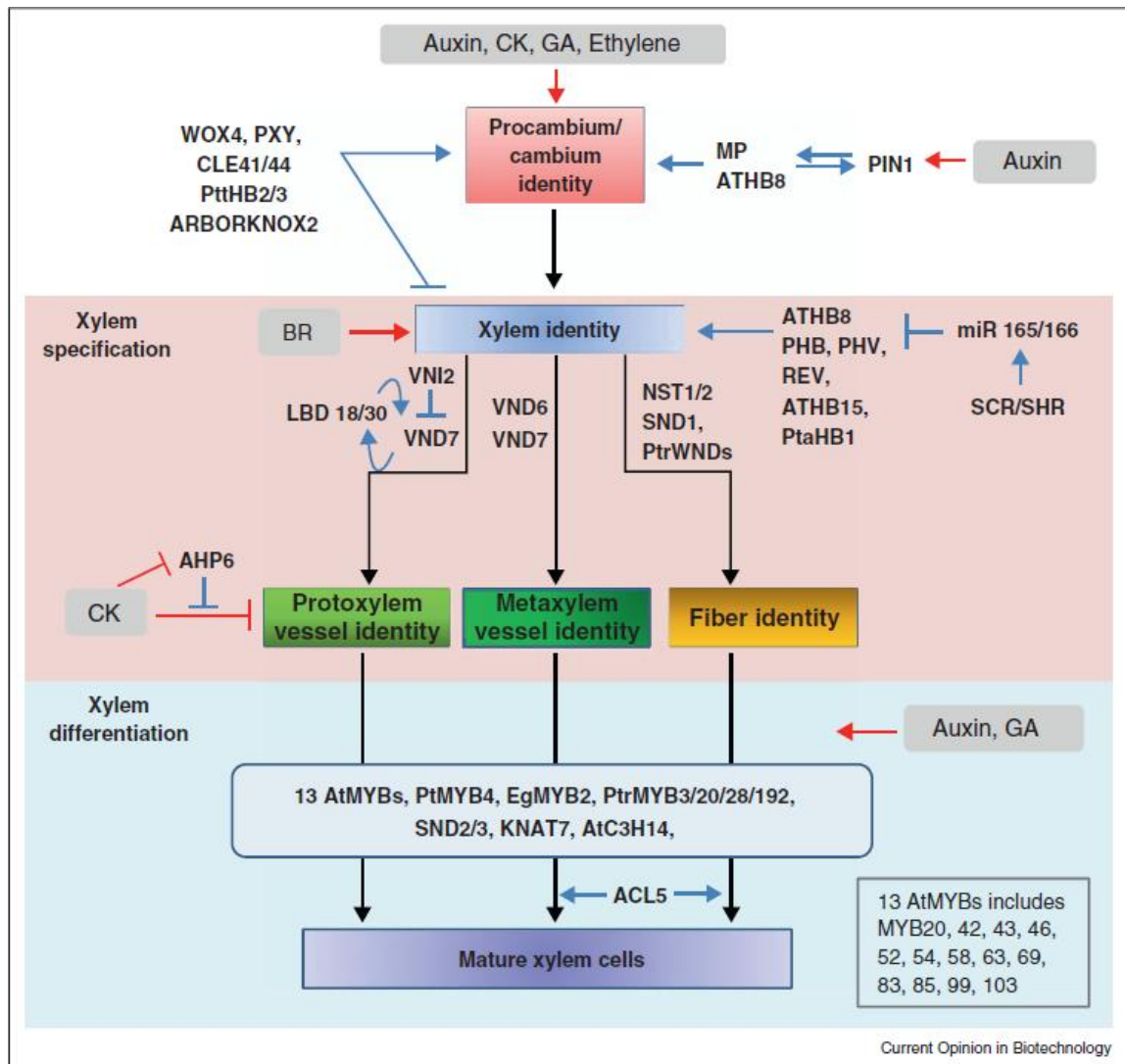
**Εικόνα 8:** Ανατομία των πρωτογενών και δευτερογενών αγγειακών ιστών του φυτού *Arabidopsis thaliana* σε σύγκριση με την περιοχή σχηματισμού ξύλου του *Populus*. Τα ίδια αναπτυξιακά στάδια μπορούν να αναγνωριστούν σε τομές (i) του βλαστού του *Populus* και (ii) σε υποκοτύλιο *Arabidopsis*, ηλικίας 6 ημερών και τα δύο αντιπροσωπεύουν την δευτερογενή ανάπτυξη του αγγειακού. Επίσης, στο εικονίδιο (iii) φαίνεται η πρωτογενής

ανάπτυξη της ρίζας στο φυτό *Arabidopsis* μετά από παρατήρηση στο *confocal* (Zhang et al. 2011).

◆ Ορμονική ρύθμιση της διατήρησης της ταυτότητας και της δράσης του καμβίου.

Όπως αναφέραμε και προηγούμενα οι φυτικές ορμόνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αγγειακού ιστού. Ειδικότερα, η αυξίνη έχει δειχθεί πως διεγείρει και διατηρεί την δραστικότητα του μεριστώματος του καμβίου και τον σχηματισμό των αλυσίδων του αγγειακού. Είναι γεγονός πως η πολική μεταφορά της αυξίνης είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του αγγειακού μοτίβου και της ανάπτυξης των αλυσίδων του προκαμβίου. Η θεωρία της καναλοποίησης της ροής της αυξίνης προτάθηκε αρχικά από τον Sachs, σύμφωνα με την οποία η συνεχόμενη πολική μεταφορά της αυξίνης μέσω των κυττάρων είχε ως συνέπεια την διαφοροποίηση των προκαμβιακών κυττάρων και συνεπώς την διαφοροποίηση των αγγειωδών δεσμίδων. Πιο συγκεκριμένα, κατά τον σχηματισμό των αγγείων στα φύλλα, τα πρόδρομα προκαμβιακά κύτταρα φαίνεται να σχηματίζονται από υποεπιδερμικά κύτταρα του φύλλου. Ακολούθως, καθώς σχηματίζονται οι δεσμίδες του αγγειακού, τα νεοσχηματιζόμενα αγγειακά κύτταρα διαιρούνται και επιμηκύνονται σε έναν κοινό άξονα απαραίτητο για τον σχηματισμό του αγγειακού δικτύου (A. Elo et al. 2009).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, στα αγγεία των φύλλων η ροή της αυξίνης καθοδηγείται από την πολική τοποθέτηση ενός μεταφορέα εκροής της αυξίνης, του PINFORMED 1 (PIN1) του οποίου η έκφραση φαίνεται να προάγει την διαφοροποίηση των πρόδρομων προκαμβιακών κυττάρων. Επίσης, το γονίδιο *ATHB8*, το οποίο αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα της κλάσης III HD-ZIP, φαίνεται να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των πρόδρομων προκαμβιακών κυττάρων αλλά και την διαφοροποίηση του προκαμβίου ενώ η έκφρασή του φαίνεται να εξαρτάται από την δράση ενός παράγοντα απόκρισης της αυξίνης, τον MONOPTEROS (MP). Υπάρχουν πέντε γονίδια που ανήκουν στην κλάση HD-ZIP III στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, το *PHB/ATHB14*, το *PHV/ATHB9*, το *REV/IFL1*, το *ATHB8* και το *CAN/ATHB15*. Έχει δειχθεί πως τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν τον αριθμό των προκαμβιακών κυττάρων μέσω της επαγωγής της διαφοροποίησης του ξύλου κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του αγγειακού ιστού (Zhang et al. 2011). Στην εικόνα 9 δίνεται το ρυθμιστικό μονοπάτι κατά την διάρκεια σχηματισμού του ξύλου στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και τα δέντρα.



**Εικόνα 9:** Ρυθμιστικό δίκτυο σχηματισμού του ξύλου στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και στα δέντρα. Τα προκαμβιακά και καμβιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε διαφόρων ειδών κύτταρα ξύλου κατά την διάρκεια της πρωτογενούς και δευτερογενούς ανάπτυξης. Η ρύθμιση του μονοπατιού της ξυλογένεσης φαίνεται να είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των ειδών που ανήκουν στα ποώδη φυτά και αυτών που ανήκουν στα ξυλώδη και μάλιστα η ρύθμιση αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι μεταγραφικοί παράγοντες, φυτικές ορμόνες και άλλοι πολλοί ρυθμιστικοί παράγοντες. CK: κυτοκίνη, GA: γιββερελίνη, JA: γιασμονικό οξύ, BR: μπρασινωστεροειδή (Zhang et al. 2011).

Για περαιτέρω στοιχεία ως προς την λειτουργία της αυξίνης ως θετικός ρυθμιστής της δράσης του καμβίου έχουν προταθεί τα μεταλλάγματα του γονιδίου INTERFASCICULAR FIBERLESS/REVOLUTA (ifl) στο φυτό *Arabidopsis*. Στα

μεταλλάγματα αυτά, η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των μεταφορέων αυξίνης έχει ως αποτέλεσμα την δραματική μείωση της βασιπεταλικής ροής της αυξίνης και την μείωση της δράσης του καμβίου στα βασικά μέρη του ανθοφόρου βλαστού (A. Elo et al. 2009).

Εκτός βέβαια από την αυξίνη συνεργιστικό ρόλο στην μεριστωματική δράση του καμβίου παίζουν και οι υπόλοιπες ορμόνες όπως η κυτοκίνη, η γιββερελίνη, το αιθυλένιο και τα μπρασινοστεροειδή. Έχειδειχθεί ότι η εφαρμογή αυξίνης μαζί με γιββερελίνη προάγει την διαίρεση των κυττάρων του καμβίου περισσότερο από την μεμονομένη εφαρμογή των δυο ορμονών δηλώνοντας πως οι δυο αυτές ορμόνες δρούν συνεργιστικά για την ρύθμιση της δράσης του καμβίου. Επίσης, φαίνεται πως η συγκέντρωση της αυξίνης στον βλαστό είναι υψηλότερη όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με την γιββερελίνη κι αυτό γιατί η εφαρμογή γιββερελίνης επάγει την έκφραση ενός άφθονου στο κάμβιο μεταφορέα αυξίνης, το *PINI*. Μαζί, αυτά τα δεδομένα δείχνουν πως η δράση της γιββερελίνης επάγει την μεταφορά της αυξίνης (Digby J et al. 1966, Bjorklund S et al. 2007).

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## **2.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού**

Για την ανάπτυξη των φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σπέρματα του *Arabidopsis thaliana* ενυδατώνονται για 24h στους 4<sup>0</sup>C και στη συνέχεια αποστειρώνονται σε διάλυμα 70% αιθανόλης ακολουθούμενο από διάλυμα 20% χλωρίνης. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες 30 σπέρματα του *Arabidopsis thaliana* σε κάθε τριβλίο, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου. Τα τριβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22<sup>0</sup>C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 16ώρες φως/ 8ώρες σκοτάδι).

### **2.1.1 Ιστοκαλιέργεια**

#### **➤ Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS (Murashige And Skoog)**

1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS με την ανάλογη σύσταση.
2. Αποστείρωση του υποστρώματος MS για 20min στους 120<sup>0</sup>C.
3. Γέμισμα των τριβλίων με 20ml θρεπτικού υποστρώματος μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminair flow), με τον οποίο επιτυγχάνονται αποστειρωμένες συνθήκες.
4. Αφήνονται να στερεοποιηθούν.
5. Τα τριβλία μπορεί να διατηρηθούν για περίπου 2 εβδομάδες στους 4<sup>0</sup>C.

#### **➤ Απολύμανση σπερμάτων *Arabidopsis thaliana* και επίστρωση αυτών σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης**

1. Εκβλάστηση των σπερμάτων προϋποθέτει την επιτυχημένη έξοδό τους από την κατάσταση ληθάργου. Για να συμβεί αυτό, τα σπέρματα τοποθετούνται σε ddH<sub>2</sub>O για 24h στους 40C.
2. Απολύμανση των σπερμάτων με 70% αιθανόλη για 30sec, απομάκρυνση της αιθανόλης και προθήκη διαλύματος χλωρίνης 20% για 1-2min ανάλογα με την ποσότητα των σπερμάτων. Η όλη διαδικασία γίνεται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.
3. Απομάκρυνση του διαλύματος της χλωρίνης και ξέπλυμα των σπερμάτων 5 φορές με ddH<sub>2</sub>O από 1min τη φορά.

4. Επίστρωση των σπορίων στην επιφάνεια υποστρώματος, σε στρογγυλά τριβλία Petri που περιέχουν θρεπτικό μέσο MS με τη βοήθεια πιπέτας Gilson.
5. Τα τριβλία αφήνονται ανοιχτά να στεγνώσουν για 30min περίπου.
6. Σφραγίζονται με ταινία parafilm και μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών.
7. Μετά από δύο εβδομάδες τα φυτά έχουν αναπτυχθεί αρκετά και έτσι μπορούν να μεταφερθούν στο χώμα όπου για 3-4 μέρες μένουν καλυμμένα με διαφανή μεμβράνη και παρατηρούνται σε περιβάλλον υγρασίας για να ξεπεράσουν την καταπόνηση από τη μεταφύτευση. Έτσι, αναπτύσσονται μέχρι να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο και να γίνει η συλλογή σπερμάτων.

## **2.2 Απομόνωση Γενοματικού DNA από Φυτά *Arabidopsis* με την μέθοδο CTAB**

- ◆ Φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτά *Arabidopsis*) ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβισης.
- ◆ Το ομογενοποιημένο υλικό μεταφέρεται σε σωλήνα falcon. Για κάθε gr ομογενοποιημένου ιστού προστίθενται στο σωλήνα 2ml 2X διαλύματος CTAB, που έχει προθερμαθεί στους 60<sup>0</sup>C.
- ◆ Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 15min στους 60<sup>0</sup>C. Σ' αυτό το στάδιο δημιουργούνται σύμπλοκα CTAB-νουκλεϊκών οξέων.
- ◆ Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά.
- ◆ Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 5000 rpm/min για 5min.
- ◆ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προσδιορίζεται ο όγκος του. Προστίθεται 1/5 του όγκου του διαλύματος CTAB 5% w/v (προθερμασμένου στους 60<sup>0</sup>C). Ανάμιξη του μίγματος.



- ◆ Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) στο δείγμα. Ανάμιξη.
- ◆ Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10000 rpm/min για 12min.
- ◆ Προσδιορισμός του όγκου του υπερκείμενου διαλύματος και πάλι. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα κατακρήμνισης CTAB 1% w/v, σε αναλογία 1:1.3 σε σχέση με τον όγκο του υπερκείμενου. Το δείγμα αναμιγνύεται και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1hr.
- ◆ Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10000 rpm/min για 12min.
- ◆ Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναιώρηση ιζήματος σε 0.5ml REB (ρυθμιστικού διαλύματος επαναδιάλυσης) για κάθε gr φυτικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε.
- ◆ Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης. Ανάμιξη και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- ◆ Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm/min για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ◆ Το δείγμα επαναδιαλύεται σε 400μl dH<sub>2</sub>O και υφίσταται καθαρισμό με φαινόλη, φαινόλη-χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο:
  - Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και έντονη ανάμιξη
  - Φυγοκέντρηση στις 12000rpm/min για 5min
  - Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Έντονη ανάμιξη του δείγματος.
  - Φυγοκέντρηση στις 12000rpm/min για 5min
  - Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Έντονη ανάμιξη δείγματος.
  - Φυγοκέντρηση στις 12000rpm/min για 5min
  - Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο και προσθήκη 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 4.8 και 2 όγκους αιθανόλης 100% για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων.
  - Επώαση στους -20°C για 12hrs.
  - Φυγοκέντρηση στις 12000rpm/min για 15min στους 4°C.
- ◆ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O.

### **2.3 Απομόνωση Ολικού RNA από φυτικούς ιστούς**

- ◆ Φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτά *Arabidopsis* ή διάφορα όργανά του) ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου με κατάλληλο γουδί λειοτριβήσης.
- ◆ Το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf των 1.5ml όπου προστίθεται ίση ποσότητα φαινόλης και ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής του RNA (1:1)
- ◆ Έντονη ανάμιξη του δείγματος και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 5min.
- ◆ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- ◆ Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 5min.
- ◆ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο erpendorf χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- ◆ Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 5min.
- ◆ Για την κατακρήμιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.8 και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100%
- ◆ Κατακρήμιση στους -20°C για 12 ώρες
- ◆ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13.000rpm για 20min.
- ◆ Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- ◆ Το ίζημα διαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O
- ◆ Αποθήκευση στους -80°C.

#### **2.3.1 Καθαρισμός και Ποσοτικοποίηση RNA**

##### **2.3.1α Καθαρισμός RNA από υπολείμματα DNA με το ένζυμο RQ1 DNase**

- ◆ Σε φιαλίδιο erpendorf των 1.5ml λαμβάνει χώρα η εξής αντίδραση:
  - 6 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x αρχική συγκέντρωση
  - 1 μl DNase
  - 53 μl RNA
- Ανάμιξη και τοποθέτηση των erpendorf στους 37°C για 30min
- Με το πέρας των 30min προστίθενται αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 300μl

- Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1). (1:1)
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρωση (13.000grms) για 5min.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1). (1:1)
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρωση (13.000grms) για 5min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρωση (13000grm) για 5min
- Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.8 (30μl) και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100%
- Κατακρήμνιση στους -20°C για 12 ώρες.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4°C στις 13.000grms για 20min.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται στους -80°C.

### 2.3.1β Υπολογισμός συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τα μεριστώματα των φυτών *Arabidopsis* (COL-0 και RacRNAi μετάλλαγμα), πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης (**O.D.**) αυτού σε φωτόμετρο ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του. Η απορρόφηση στα 260 nm δίνει τη συγκέντρωση του RNA και η απορρόφηση στα 280 nm τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA, π.χ πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και πολυφαινολικά.

- Ο λόγος O.D<sub>260</sub>/O.D<sub>280</sub> δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος RNA . Σε καθαρά δείγματα RNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις ο λόγος O.D<sub>260</sub>/O.D<sub>280</sub> κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0
- Η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε RNA προκύπτει από τη σχέση :  

$$C_{(\mu\text{g}/\mu\text{l})} = 40 \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{συντελεστής αραίωσης} \times \text{O.D}_{260} \text{ του δείγματος}$$

## **2.4 Βακτηριακά στελέχη**

### **2.4.1 *Escherichia coli***

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση πλασμιδίων είναι το DH5a (*E.coli*). το στέλεχος αυτό έχει υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ( $>2 \times 10^6$  transformants/ $\mu\text{g}$  of plasmid DNA). Ο γενότυπός τους χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της  $\Delta$  (*lacZ*) M15 περιοχής που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την συμπληρωματικότητα με το *lac a* τμήμα που κωδικοποιείται από πολλούς πλασμιδιακούς φορείς. Έτσι είναι δυνατή η επιλογή μπλέ-άσπρων αποικιών κατά την ανά[πτυξή τους σε θρεπτικό μέσο που περιέχει X-gal και IPTG.

#### **2.4.1.α Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό**

- ◆ Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους (DH5a) αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο LB για 12hrs στους 37°C.
- ◆ Μεταφορά 2ml από την αρχική καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB (αναλογία 1:1).
- ◆ Επώαση των κωνικών φιαλών στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει  $\text{O.D.}_{550} = 0.5$ .
- ◆ Τοποθέτηση της καλλιέργειας σε πάγο.
- ◆ Μεταφορά της καλλιέργειας σε πλαστικό μπουκάλι και φυγοκέντρηση για 5min στις 5000r/min στους 4°C (πλήρης ισοζύγιση απαραίτητη). Κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων.
- ◆ Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο  $\text{CaCl}_2$  25mM. Προσθήκη όγκου ίσου με του μισού του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας.
- ◆ Επανάληψη ίδιου τρόπου κατακρήμνισης.
- ◆ Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο  $\text{CaCl}_2$  75mM. Προσθήκη ίσου όγκου με το 1/15 του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας.
- ◆ Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v. Απαιτείται πολύ καλή μίξη.

- ◆ Το δείγμα μοιράζεται σε φιαλίδια erpendorf και καταψύχεται αμέσως με την βοήθεια υγρού αζώτου.
- ◆ Αποθήκευση και διατήρηση των 'δεκτικών' βακτηριακών κυττάρων στους -80°C.

#### 2.4.1.β Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

- ◆ Σε 200μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- ◆ Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30min
- ◆ Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 1-2 min στους 42°C.
- ◆ Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB ενώ το δείγμα βρίσκεται στους 42 °C και επώαση στη συνέχεια στους 37°C για 1hr.
- ◆ Φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 13000r/ min για 1min και απομάκρυνση των 2/3 του υπερκειμένου.
- ◆ Επαναδιάλυση του ιζήματος και επίστρωση κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής που διαφέρει κατά περίπτωση.
- ◆ Επώαση των τριβλίων για 12-16 hrs σε θάλαμο στους 37 °C.

#### 2.4.2 Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασχηματισμού (Transform efficiency)

- ◆ Χωρίζουμε το τριβλίο σε τεταρτημόρια και μετράω τις αποικίες σε ένα από αυτά. Έστω ότι έχουμε n αποικίες.
- ◆ Στο τριβλίο θα έχουμε:  $4xn=4n$  αποικίες.
- ◆ Έχουμε περίπου 10ng plasmid DNA. Οπότε:

Στα 10ng έχουμε 4n αποικίες

Στα 1000ng έχουμε x? αποικίες,  $x = 400n$  αποικίες

Οι 400n αποικίες αντιστοιχούν στην ποσότητα που επιστρώθηκε. Έστω ότι επιστρώσαμε y μl από τα z μl που είχαμε αρχικά. Οπότε:

Στα y μl που επιστρώσαμε έχουμε 400n αποικίες

Στα z μl έχουμε x? αποικίες,  $x = 400nz/y$  αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA.

Ικανοποιητικό εύρος αποδοτικότητας:

$5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA.
---

### **2.4.3 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα**

Για να αποθηκεύσουμε βακτηριακά κύτταρα για μεγάλα χρονικά διαστήματα ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

- ◆ Εμβολιάζουμε με μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους που θέλουμε να αποθηκεύσουμε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο που περιέχει κάποιο αντιβιοτικό στο οποίο είναι ανθεκτικό το στέλεχος, με σκοπό την αποφυγή ενδεχομένων μολύνσεων, και γίνεται επώαση στους 37°C με συνεχή ανάδευση για 12-16hrs.
- ◆ Στη συνέχεια, μεταφέρονται 600μl από την παραπάνω καλλιέργεια σε φιαλίδιο erpendorf και προστίθενται 300μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%.
- ◆ Αναμιγνύουμε έντονα και ψύχουμε το φιαλίδιο σε υγρό άζωτο.
- ◆ Τοποθετούμε τα κύτταρα στους -80°C όπου μπορούν να διατηρηθούν ζωντανά έως και 10 χρόνια.

## **2.5 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA**

### **2.5.1 Αλκαλική λύση**

Μεταφέρεται 1.5ml από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε ολονύχτια φιαλίδιο erpendorf και φυγοκεντρείται για 1min στις 13000r/min.

- ◆ Απομάκρυνση υπερκειμένου ώστε το ίζημα να μείνει όσο πιο στεγνό γίνεται.
- ◆ Προσθήκη 200μl διαλύματος P1 και επαναδιάλυση του ιζήματος με πιπέτα.
- ◆ Προσθήκη 200μl διαλύματος P2, ανάδευση ελαφρά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές και επώαση του erpendorf ανοιχτό σε RT (θερμοκρασία δωματίου) για 4min.
- ◆ Προσθήκη 200μl παγωμένου διαλύματος 3M CH<sub>3</sub>COOK/5M CH<sub>3</sub>COOH (P3) και καλή ανάμιξη μέχρι να εμφανιστούν λευκά κομμάτια.
- ◆ Επώαση στον πάγο για 15min.
- ◆ Φυγοκέντρηση για 20min στους 4°C στις 13000r/min.
- ◆ Προσεκτική μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο erpendorf.
- ◆ Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης αιθανόλης 70% και καλή ανάμιξη.
- ◆ Επώαση για 10min σε RT.
- ◆ Φυγοκέντρηση στις 13000r/min για 15min.
- ◆ Απομάκρυνση της αιθανόλης χωρίς τίναγμα και επώαση σε RT ανοιχτό για στέγνωμα.

- ◆ Προσθήκη 50μl ddH<sub>2</sub>O και επαναδιάλυση του ιζήματος.
- ◆ Αποθήκευση και διατήρηση στους -20°C.

### **2.5.2 Μέθοδος λύσης δια του βρασμού**

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από τους Holmes et. al 1981.

- ◆ Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 350μl διαλύματος STET.
- ◆ Βράζουμε το δείγμα για 1min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 12000r/min.
- ◆ Το λευκό ίζημα απομακρύνεται από το φιαλίδιο με την βοήθεια οδοντογλυφίδας.
- ◆ Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης σε σχέση με τον όγκο του δείγματος.
- ◆ Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12000r/min για 12min.
- ◆ Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα ξεπλένεται με 250μl 70% αιθανόλης.
- ◆ Το DNA επαναδιαλύεται σε 50μl ddH<sub>2</sub>O.

### **2.5.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την βοήθεια κολώνας QIAGEN**

Όταν απαιτείται το πλασμιδιακό DNA να είναι υψηλής καθαρότητας, η απομόνωση πραγματοποιείται με την βοήθεια κολώνας QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit, Cat No 27104). Το πρωτόκολλο απομόνωσης παρέχεται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Η μέθοδος αυτή συνίσταται όταν το δείγμα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για καθορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του (sequencing).

## 2.6 Πέψη Νουκλεϊνικών Οξέων με Ενδονουκλεάσες Περιορισμού

Για να δράσει ένα ένζυμο περιορισμού, δηλαδή να αναγνωρίσει και να “κόψει” μια εξανουκλεοτιδική αλληλουχία βάσεων, χρειάζεται κατάλληλες συνθήκες:

- ◆ Πρώτον, πρέπει να υπάρχει ένα υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να είναι πλασμιδιακό DNA, γενωματικό DNA ή DNA φάγου και να περιέχει τουλάχιστον μια αλληλουχία έξι βάσεων, η οποία να αναγνωρίζεται από το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού. Επίσης, και η καθαρότητα του υποστρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στο βαθμό που θα προχωρήσει η αντίδραση αφού πολλές φορές κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA μπορεί να μεταφέρονται παράγοντες που να δρουν περιοριστικά για τη δράση των ενζύμων.
- ◆ Δεύτερον, η ποσότητα και η ποιότητα του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου (buffer) παίζουν ρόλο. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρέχονται κυρίως έτοιμα με το ένζυμο περιορισμού από την εταιρεία προέλευσης και η ποσότητα που χρησιμοποιείται είναι το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης από 10x buffer.
- ◆ Τρίτον, η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται παίζει σημαντικό ρόλο. Περιοριστικό ρόλο στην ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται αποτελεί η συγκέντρωση της γλυκερόλης που περιέχεται στο διάλυμα συντήρησης του ενζύμου η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% στον τελικό όγκο της αντίδρασης. Ο όγκος της αντίδρασης όπου λαμβάνει χώρα η πέψη κυμαίνεται μεταξύ 30-50μl.
- ◆ Σε φιαλίδιο eppendorf προσθέτουμε:

10x ρυθμιστικό διάλυμα:	10% του τελικού όγκου
Δείγμα DNA:	μέχρι 80% του τελικού όγκου
Ένζυμο περιορισμού:	μέχρι 10% του τελικού όγκου
ddH <sub>2</sub> O:	μέχρι το 100% του τελικού όγκου

- ◆ Στη συνέχεια αναμιγνύουμε το δείγμα και επωάζουμε σε κατάλληλη θερμοκρασία για 1-2hrs. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού. Η πλειονότητα όμως λειτουργεί άριστα στους 37°C. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη φαίνονται στον πίνακα 1.



**Πίνακας 1:** Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, οι αλληλουχίες που αυτά αναγνωρίζουν και το προεξέχον τους άκρο. Τα βέλη στις αλληλουχίες δείχνουν το σημείο τομής.

ΟΝΟΜΑ ΕΝΖΥΜΟΥ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ	ΠΡΟΕΞΕΧΟΝ ΑΚΡΟ
<b>EcoR I</b>	<b>G↓AATTC</b>	<b>5'</b>
<b>Hind III</b>	<b>A↓AGCTT</b>	<b>5'</b>

## 2.7 Ανάλυση Νουκλεϊνικών Οξέων σε Πηκτή Αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων η οποία είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0.8% ως 2% αγαρόζη w/v.

- ◆ Σε διάλυμα 1X TAE προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης.
- ◆ Θερμαίνουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα καταστεί διαφανές.
- ◆ Προσθέτουμε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
- ◆ Τοποθετούμε την πηκτή σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνουμε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- ◆ Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα χρωστικής 5x dye.
- ◆ Μετά την πήξη απομακρύνουμε τη χτένα και προσθέτουμε κατάλληλο όγκο 1X TAE, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- ◆ Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής που δημιουργήθηκαν από τη χτένα.
- ◆ Συνδέουμε τη συσκευή σε ηλεκτρικό πεδίο και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V. Τα δείγματα μεταναστεύουν από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο αφού είναι αρνητικά φορτισμένα.

Εάν θέλουμε να εκτιμήσουμε το μέγεθος των ζωνών του DNA (μετά από πέψη),

ηλεκτροφορούμε δίπλα στα δείγματά μας δείκτες (ladders) οι οποίοι έχουν καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη.

## **2.8 Απομόνωση και Καθαρισμός Κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης**

- ◆ Ανάλογα με το μέγεθος του προς απομόνωση κλάσματος DNA προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 0,8% w/v.
- ◆ Το δείγμα αναλύεται στην πηκτή. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να απομονωθεί είναι ικανοποιητικός, αφαιρείται η ζώνη που το περικλείει με τη βοήθεια κοπιδιού.
- ◆ Το κομμάτι της πηκτής τοποθετείται σε φιαλίδιο erpendorf 1.5ml.
- ◆ Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολλο της QIAquick Gel Extraction Kit (Cat No 28704).

## **2.9 Ενωποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα**

Η διαδικασία της ενοποίησης στηρίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να αναγνωρίζει άκρα και να συνδέει τμήματα με κολλώδη (5' ή 3' προεξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα. Οι χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς καθίστανται γραμμικοί μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού, οπότε και είναι δυνατή η ενωποίησή τους με κατάλληλο τμήμα DNA μέσω της λιγάσης.

### **2.9.1 Διαδικασία A-tailing**

Στις περιπτώσεις όπου τα τμήματα τα οποία πρόκειται να ενωποιηθούν δεν παρουσιάζουν κολλώδη άκρα (5' ή 3'), έχουν δηλαδή τυφλά άκρα, εφαρμόζεται μια διαδικασία στόχος της οποίας είναι η δημιουργία τμημάτων με προεξέχοντα μόρια αδενινών στο 3' άκρο. Αυτό επιτυγχάνεται με μια αντίδραση στην οποία χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως η EXT (FINZYMES) ή και η Taq (INVITROGEN) DNA πολυμεράσες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να προσθέτουν μόρια αδενινών στο 3' άκρο. Έτσι, καθίσταται δυνατή η ενωποίηση των υπο κλωνοποίηση τμημάτων με φορείς οι οποίοι φέρουν προεξέχοντες θυμίνες στο 3' άκρο τους, όπως είναι ο φορέας PGEM-T easy.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl. Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται:

- ◆ Κατάλληλη ποσότητα DNA
- ◆ Κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10x, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1x
- ◆ 1μl Taq DNA πολυμεράση
- ◆ 1μl MgCl<sub>2</sub> 25mM
- ◆ dATPs σε τελική συγκέντρωση 0.2mM
- ◆ ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης
- ◆ Επώαση της αντίδρασης για 15-30min στους 70°C

### 2.9.2 Αντίδραση Ενωποίησης

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας PGEM-Teasy. Η κάθε αντίδραση ενωποίησης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 15μl ή 20μl. Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται:

- ◆ Κατάλληλη ποσότητα DNA, ώστε με δεδομένη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα (συνήθως 25ng) να επιτυγχάνεται η επιθυμητή αναλογία (Y) μορίων τμήματος DNA: μόρια φορέα. Γενικά ισχύει ο τύπος:

$$Y = \frac{\text{μέγεθος φορέα (Kb)} \times \text{ng τμήματος DNA}}{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος τμήματος DNA}}$$

Συνήθως χρησιμοποιείται αναλογία ίση με την μονάδα αλλά και αναλογίες 3:1 ή 1:3 λειτουργούν ικανοποιητικά.

- ◆ Κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (ligation buffer) 10x ή 2x, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1x
- ◆ 1μl T4 DNA λιγάσης
- ◆ ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης
- ◆ το δείγμα ανμιγνύεται και τοποθετείται για 4-12hrs στους 14-16°C

## **2.10 Μεταφορά Νουκλεϊνικών Οξέων**

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες είτε πλαστικές είτε νιτροκυτταρίνης. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα χρησιμοποιούνται, στη συνέχεια, ως 'στόχοι' σε πειράματα υβριδισμού με την χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών.

### **2.10.1 Μεταφορά DNA κατά Southern από πηκτή αγαρόζης σε πλαστική μεμβράνη**

- ◆ Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή τοποθετείται σε λάμπα υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζεται μαζί με χάρακα.
- ◆ Στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.25N HCL για 15min υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα αλλάζεται και η απο-πυρινοποίηση επαναλαμβάνεται για άλλα 15min.
- ◆ Ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του οξέος.
- ◆ Αποδιάταξη των νουκλεϊνικών οξέων με εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα αποδιάταξης (0.5N NaOH, 1.5M NaCL) για 30min, με συνεχή ανάδευση.
- ◆ Επανάληψη του ίδιου βήματος.
- ◆ Ξέπλυμα της πηκτής με απιονισμένο νερό και τοποθέτησή της σε διάλυμα ουδετεροποίησης (1M Tris-HCL, 1.5M NaCL, pH 7,5) για 30min, με συνεχή ανάδευση.
- ◆ Επανάληψη του ίδιου βήματος.
- ◆ Μεμβράνη (Boehringer) κομμένη στο ίδιο μέγεθος με την πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 2x SSC για 1min.
- ◆ Πάνω σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, του οποίου οι άκρες βυθίζονται στο δοχείο που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (20x SSC), τοποθετείται η πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή έρχεται σε απευθείας επαφή με το φίλτρο της μεμβράνης πάνω στο οποίο τοποθετούνται τρία (3) φύλλα διηθητικού χαρτιού κομμένα στις διαστάσεις της μεμβράνης. Στην κορυφή τοποθετείται απορροφητικό χαρτί, το οποίο υποβοηθά την απορρόφηση του διαλύματος μεταφοράς από την πηκτή μέσω παθητικής διάχυσης και βάρους 0.5kg.
- ◆ Η μεταφορά λαμβάνει χώρα συνήθως για 12-24hrs.

- ◆ Μετά το τέλος της μεταφοράς η πρόσδεση των νουκλεϊνικών οξέων στην μεμβράνη επιτυγχάνεται με επώαση αυτής στους 80°C για 2hrs και στη συνέχεια την έκθεσή της σε υπεριώδης ακτινοβολία για 1.5min.
- ◆ Η μεμβράνη μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε πείραμα υβριδισμού τοποθετείται ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού και διατηρείται στους 4°C.

## **2.11 Υβριδισμός**

Ο όρος υβριδισμός χρησιμοποιείται για να περιγράψει το σχηματισμό δίκλωνων μορίων που προκύπτουν από το συνδυασμό μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων. Λόγω της συμπληρωματικότητας, οι συνθήκες του υβριδισμού καθορίζουν το ποσοστό σχηματισμού υβριδίων μεταξύ νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Η άριστη θερμοκρασία υβριδισμού στην περίπτωση DNA:DNA υβριδισμού είναι 25°C χαμηλότερη από την θερμοκρασία T<sub>m</sub> (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την T<sub>m</sub> συνδέονται μεταξύ τους μέσω της εξίσωσης:

$$T_m = 81,50C + 16,6 \log[Na^+] + 0,41 (\%G+C) - 0,61 (\% \text{ φορμαμίδιο}) - 500n$$

Όπου **n**, ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το υβρίδιο. Η διαδικασία του υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων συνίσταται συνήθως από τα εξής στάδια:

### **2.11.1 Προϋβριδισμός**

Ο προϋβριδισμός πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης με τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα σε διάλυμα προϋβριδισμού. Ο προϋβριδισμός γίνεται στον θάλαμο υβριδισμού στην ίδια θερμοκρασία όπου θα λάβει χώρα ο υβριδισμός, δηλαδή στους 65°C και διαρκεί 1hr με συνεχή ανάδευση της μεμβράνης. Το διάλυμα προϋβριδισμού είναι το ίδιο με το διάλυμα υβριδισμού:

- ◆ 7% SDS
- ◆ 0.5M Na[P]
- ◆ 1mM EDTA
- ◆ 1% w/v BSA
- ◆ ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου

Στο στάδιο αυτό καλύπτονται οι ελεύθερες θέσεις στη μεμβράνη, οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη-ειδική δέσμευση του ανιχνευτή.

### 2.11.2 Υβριδισμός

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από τους Church and Gilbert 1984.

- ◆ Αποδιάταξη του σημασμένου (DiG) ανιχνευτή με βρασμό στους 100°C για 5min.
- ◆ Μετά το τέλος της αποδιάταξης άμεση τοποθέτηση του ανιχνευτή στον πάγο.
- ◆ Προθέρμανση του διαλύματος υβριδισμού στην θερμοκρασία που θα γίνει ο υβριδισμός (65°C).
- ◆ Απομάκρυνση του διαλύματος προϋβριδισμού από την μεμβράνη
- ◆ Προσθήκη του προθερμασμένου διαλύματος υβριδισμού και του αποδιατεταγμένου ανιχνευτή.
- ◆ Ο υβριδισμός λαμβάνει χώρα τουλάχιστον για 16hrs με συνεχή ανάδευση στον θάλαμο υβριδισμού.

### 2.11.3 Ξεπλύματα

Μετά το τέλος του υβριδισμού λαμβάνουν χώρα τα εξής στάδια:

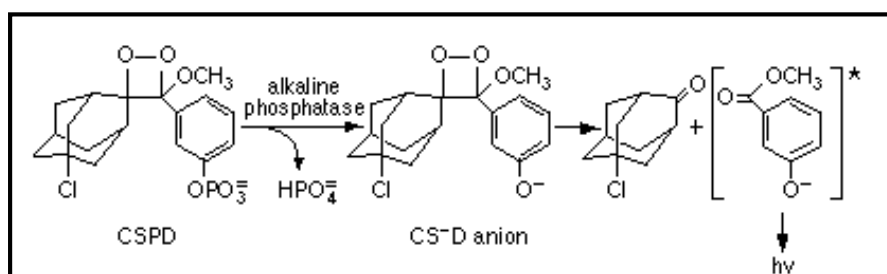
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 5% SDS, 1mM EDTA στους 65°C.
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 5% SDS, 1mM EDTA στους 60°C.
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 1% SDS, 1mM EDTA στους 55°C.
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 1% SDS, 1mM EDTA στους 50°C.
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 1% SDS, 1mM EDTA στους 45°C.
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 1% SDS, 1mM EDTA στους 40°C.
- ◆ 1x15min ξέπλυμα σε 40mM Na[P], 1% SDS, 1mM EDTA στους 35°C.

Μετά τα ξεπλύματα ακολουθεί η ανίχνευση του σήματος της μεμβράνης, η οποία δεν πρέπει να στεγνώσει μέχρι να ξεκινήσει το πρωτόκολλο ανίχνευσης. Στα ξεπλύματα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην έχουμε πολύ “background”. Το πιο σημαντικό είναι η αλλαγή της συγκέντρωσης του SDS.

## 2.12 Ανίχνευση (detection starter Kit II, Cat. No. 1 585 614)

Το Detection Starter Kit II χρησιμοποιεί την διγοξιγενίνη, ένα στεροειδές επτάνιο (πρωτογενές αντίσωμα), με σκοπό την σήμανση ανιχνευτών που θα χρησιμοποιηθούν στον υβριδισμό. Για να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε τους σημασμένους ανιχνευτές πρέπει να χρησιμοποιηθεί και ένα δευτερογενές “αντίσωμα”, το **anti-digoxigenin-AP** το οποίο προσδένεται στην διγοξιγενίνη των ανιχνευτών σύμφωνα με την θεωρία κλειδιού-κλειδαριάς που ισχύει μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου.

Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση το οποίο αποτελεί το μέσο με το οποίο θα γίνει τελικά η ανοσοανίχνευση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το υπόστρωμα CSPD, το οποίο αναγνωρίζεται από την αλκαλική φωσφατάση, αποφωσφορυλιώνεται και το αποτέλεσμα της αντίδρασης (εικόνα 2.11.1) είναι η παραγωγή φωτός σε υψηλά μήκη κύματος της τάξεως των 477nm. Το φως δεσμεύεται σε ειδικό φίλμ. Η έκθεση του φίλμ στο φως κυμαίνεται από 5min έως 30min.



Εικόνα 2.11.1: Η αντίδραση του CSPD.

Στη συνέχεια δίνονται τα βήματα για την ανοσοανίχνευση μεμβράνης εμβαδού 100cm<sup>2</sup>:

- ◆ Ξέπλυμα μεμβράνης σε διάλυμα καθαρισμού (0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl pH 7.5, 0.3% v/v Tween 20)
- ◆ Επώαση για 30min σε 100ml blocking solution (10x blocking 1:10 with Maleic acid). Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται μπλοκάρισμα των μη εξειδικευμένων περιοχών πρόσδεσης της μεμβράνης.
- ◆ Επώαση για 30min σε 20ml διάλυμα αντισώματος (1:10.000 σε blocking solution).
- ◆ Ξεπλύματα 2x15min της μεμβράνης σε διάλυμα καθαρισμού.

- ◆ Επώαση της μεμβράνης για 2-5min σε 20ml διαλύματος ανίχνευσης (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5).
- ◆ Η μεμβράνη τοποθετείται στην κασέτα εμφάνισης φιλμ με την πλευρά που είναι δεσμευμένο το DNA προς τα πάνω. Εφαρμόζεται 1ml υποστρώματος CSPD σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- ◆ Η μεμβράνη παραμένει για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ◆ Στη συνέχεια αφαιρείται προσεχτικά η περίσσεια του υποστρώματος και η μεμβράνη επωάζεται για 10min στους 37°C.
- ◆ Σε σκοτεινό θάλαμο, γίνεται η έκθεση του φιλμ στη μεμβράνη για περίπου 20-30min. Στη συνέχεια, γίνεται εμφάνιση του φιλμ σύμφωνα με πρότυπα πρωτόκολλα εμφάνισης φιλμ.

## 2.13 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

### 2.13.1 genomic PCR

Στον παρακάτω πίνακα περιέχονται οι περιεκτικότητες και οι ποσότητες των αντιδρώντων, βάση των ενζύμων και των πυκνών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη:

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x	1x	5μl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	1.5μl
dNTPs	10mM από καθένα	200μM	1μl
Άνω εκκινητής	10-20μM	300nM	1.5μl
Κάτω εκκινητής	10-20μM	300nM	1.5μl
DNA μήτρα	-	-	2μl
<b>DNA πολυμεράση</b>	<b>(units/μl)</b>	<b>(units)</b>	<b>(u/μl)</b>
Taq (Invitrogen)	5	1	0.2μl
ddH <sub>2</sub> O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl		

Η Taq DNA πολυμεράση της invitrogen έχει το χαρακτηριστικό να προσθέτει αδενίνη στο 3' άκρο του DNA χωρίς να έχουμε προσθεσει αδενίνη ως μήτρα. Αυτό το



γνώρισμα διευκολύνει την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορείς όπως ο pGEM κ.α.

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.5ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR που είναι τοποθετημένος στον πάγο. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρώνται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα και τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής MJ Research PT200 που έχει ήδη προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα.

Οι θερμοκύκλοι που απαρτίζουν το πρόγραμμα της PCR επιλέχθηκαν με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται παρακάτω.

1x	α) Αποδιάταξη της μήτρας για 2min στους 94 <sup>0</sup> C
25-40x	β) Αποδιάταξη στους 94 <sup>0</sup> C για 30sec γ) Υβριδισμός εκκινητών συνήθως σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το T <sub>m</sub> των εκκινητών για 30-40sec <sup>(i)</sup> δ) Επιμήκυνση στους 72 <sup>0</sup> C <sup>(ii)</sup> για την <i>Taq Invitrogen</i> , για χρόνο που ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του πολυμερισμού και των προδιαγραφών του ενζύμου
1x	ε) Τελική επιμήκυνση και κατανάλωση του ενζύμου για 7-10min, στη θερμοκρασία επιμήκυνσης του κάθε ενζύμου

Το παραπάνω αποτελεί ένα πολύ γενικευμένο προφίλ θερμοκρασιών και σταδίων PCR αντίδρασης που επιδέχεται μεγάλο αριθμό παρεμβάσεων ανάλογα με τις επιθυμητές εφαρμογές και ιδιαιτερότητες.

**(i):** Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης T<sub>m</sub>. Η άριστη θερμοκρασία στην περίπτωση DNA\*DNA υβριδισμού είναι 25<sup>0</sup>C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης του υβριδίου (T<sub>m</sub>).

Η θερμοκρασία T<sub>m</sub> υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \cdot GC\% - 650/\text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$$

**(ii):** Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος των αναμενόμενων προϊόντων. Για προϊόντα μέχρι 3Kb είναι 72<sup>0</sup>C, ενώ για προϊόντα μεγαλύτερα από 3Kb είναι 68<sup>0</sup>C.

Όταν τελειώσουν οι αντιδράσεις PCR, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0.8-1.2% ανάλογα με το αναμενόμενο μήκος των αποτελεσμάτων. Η αποθήκευση των αντιδράσεων PCR γίνεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της παρούσας εργασίας

<b>CER1A-F</b>	5'-ACTGAGTTGTGGTTTATGAG -3'
<b>CER1A-R</b>	5'-GGAAAAGCATATGGGCTACG -3'
<b>RACRNAi-F</b>	5'-GCTTCAAATTTCCCTTCCCTTACGAA-3'
<b>HSPRNAi-R</b>	5'-GGACCATCTTAGTTCCTCTACCAA-3'
<b>RACinsert-F</b>	5'- AGTGGTGGCAGCTGAAGACT-3'
<b>RACinsert-R</b>	5'-GCGCAGTGAGTGATTGACATTTG -3'
<b>LB3</b>	5'- TGGTTCACGTAGTGGGCGATCG-3'

- ♦ Τα προγράμματα που εφαρμόστηκαν για τα διάφορα ζεύγη εκκινήτων είναι τα παρακάτω:

<b>Πρόγραμμα: Hsp</b>
Εκκινήτες: RACRNAiF/ HSPRNAiR
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 2min</li> <li>2. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 25sec</li> <li>3. <math>56^{\circ}\text{C}</math> for 35sec</li> <li>4. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 40sec</li> <li>5. Go to 2 for 29 times</li> <li>6. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 5min</li> <li>7. <math>10^{\circ}\text{C}</math> for ever</li> <li>8. End</li> </ol>

<b>Πρόγραμμα: CER1A</b>
Εκκινήτες: CER1A F/R
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 2min</li> <li>2. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 25sec</li> <li>3. <math>55^{\circ}\text{C}</math> for 35sec</li> <li>4. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 40sec</li> <li>5. Go to 2 for 34 times</li> <li>6. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 5min</li> <li>7. <math>10^{\circ}\text{C}</math> for ever</li> <li>8. End</li> </ol>

<b>Πρόγραμμα: RAC2</b>
Εκκινήτες: RACinsert F/LB1
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 2min</li> <li>2. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 25sec</li> <li>3. <math>58^{\circ}\text{C}</math> for 35sec</li> <li>4. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 2min</li> <li>5. Go to 2 for 31 times</li> <li>6. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 5min</li> <li>7. <math>10^{\circ}\text{C}</math> for ever</li> <li>8. End</li> </ol>

<b>Πρόγραμμα: RAC1</b>
Εκκινήτες: RACinsert F/R
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 2min</li> <li>2. <math>94^{\circ}\text{C}</math> for 25sec</li> <li>3. <math>58^{\circ}\text{C}</math> for 35sec</li> <li>4. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 2min</li> <li>5. Go to 2 for 31 times</li> <li>6. <math>72^{\circ}\text{C}</math> for 5min</li> <li>7. <math>10^{\circ}\text{C}</math> for ever</li> <li>8. End</li> </ol>

### 2.13.2 Tail PCR (Therma asymmetric interlaced PCR)

Ο μηχανισμός της TAIL-PCR αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάκτηση τμημάτων DNA τα οποία βρίσκονται κοντά σε γνωστές αλληλουχίες. Συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση ένθετων και αλληλουχιών από P1, YAC και κοσμίδια, καθώς επίσης και για την απομόνωση αλληλουχιών οι οποίες περιβάλλουν T-DNA και μεταθετές ενθέσεις και γονίδια ανθρώπων και φυτών [YAO-GUANG LIU AND NING HUANG 1998]

Όσον αφορά τη στρατηγική του μηχανισμού της TAIL PCR, γνωρίζουμε ότι απαιτεί την χρησιμοποίηση τριών εξειδικευμένων εκκινητών σε συνεχόμενες αντιδράσεις μαζί με την παρουσία εκφυλισμένων εκκινητών (AD) οι οποίοι έχουν μικρότερη  $T_m$  (θερμοκρασία τήξης), έτσι ώστε η σχετική αποτελεσματικότητα των ενισχύσεων των εξειδικευμένων και μη προϊόντων να μπορεί να ελεγχθεί θερμικά. Περιλαμβάνει τρεις αντιδράσεις: κατά την πρώτη αντίδραση, διεξάγεται ένας κύκλος PCR με περιορισμένη αυστηρότητα δημιουργώντας μία ή και περισσότερες περιοχές πρόσδεσης για τους AD εκκινητές σε μία δεδομένη ακολουθία. Στη συνέχεια, κατά τις επόμενες αντιδράσεις λαμβάνει χώρα εναλλαγή κύκλων με μικρότερη και μεγαλύτερη αυστηρότητα (με μικρότερη και μεγαλύτερη θερμοκρασία) με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση των τελικών προϊόντων. Σε αυτό συμβάλλουν ειδικότερα οι εξειδικευμένοι εκκινητές οι οποίοι σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν στην ενίσχυση των αναμενόμενων προϊόντων.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις TAIL-PCR της παρούσας εργασίας:

<b>LB1</b>	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCGATCG-3'
<b>LB2</b>	5'-TGGAACAACACTCAACCCTATCTCG-3'
<b>LB3</b>	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
<b>ad 1.1</b>	5'-TGWGNAGSANCASAGA-3'
<b>ad 1.2</b>	5'-NTCGASTWTSWGT-3'
<b>ad 2.1</b>	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
<b>ad 2.2</b>	5'-AGWGNAGWANCAWAGG-3'
<b>ad 3.1</b>	5'-STTGWTASTNCTNTGC-3'
<b>ad 5.1</b>	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'

## Primary PCR

Στον παρακάτω πίνακα περιέχονται οι περιεκτικότητες και οι ποσότητες των αντιδρώντων, βάση των ενζύμων και των πυκνών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση του πρώτου tail PCR.

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x ή 2x	1x	2μl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	1.5μl
dNTPs	10mM από καθένα	200μM	0.4μl
Άνω εκκινητής	10-20μM	200nM	0.4 μl
Εκφυλισμένος εκκινητής	4x	1x	5μl
DNA μήτρα	-	-	0.5-1ng
<b>DNA πολυμεράση</b>	<b>(units/μl)</b>	<b>(units)</b>	<b>(u/μl)</b>
Taq (Invitrogen)	5	0.04	0.16
ddH <sub>2</sub> O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl		

- Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προσθέτονται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.5ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR που είναι τοποθετημένος στον πάγο. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρώνονται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα και τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής MJ Research PT200 που έχει ήδη προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα.

<b>Πρόγραμμα: 1<sup>st</sup> tail pcr</b>	
Εκκινητές: ad 1.1- 1,2, 2,1-2,2- 3,1- 5,1/LB1	
1. 4°C for 2min	13. 68°C for 1min
2. 93°C for 1min	14. 72°C for 2min and 30sec
3. 95°C for 1min	15. 94°C for 10sec
4. 94°C for 30sec	16. 68°C for 1min
5. 62°C for 1min	17. 72°C for 2min and 30sec
6. 72°C for 2min and 30sec	18. 94°C for 10sec
7. Go to step 4 for more cycles	19. 44°C for 1min
8. 94°C for 30sec	20. 72°C for 2min and 30sec
9. 25°C for 3min	21. Go to step 12 for 14 more cycles
10. Ramp at 0,2°C per sec and 30sec	22. 72°C for 5min
11. 72°C for 2min and 30sec	23. 4°C hold
12. 94°C for 10sec	24. END

## Secondary PCR

Στον παρακάτω πίνακα περιέχονται οι περιεκτικότητες και οι ποσότητες των αντιδρώντων, βάση των ενζύμων και των πυκνών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση του δεύτερου tail PCR:

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x ή 2x	1x	2μl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	0.6μl
dNTPs	10mM από καθένα	200μM	0,4μl
Άνω εκκινητής	10-20μM	200nM	0,4 μl
Εκφυλισμένος εκκινητής	4x	1x	5μl
DNA μήτρα	4μl of 200- fold diluted primary pcr product		
<b>DNA πολυμεράση</b>	<b>(units/μl)</b>	<b>(units)</b>	<b>(u/μl)</b>
Taq (Invitrogen)	5	0.02	0.12
ddH <sub>2</sub> O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl		

- Ετοιμάζουμε την αντίδραση με τον ίδιο τρόπο όπως προηγούμενα προσθέτοντας τους κατάλληλους εκκινητές και DNA που προέρχεται από το προϊόν της πρώτης αντίδρασης που είναι επαναδιαλυμένο στα 200μl. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρώνται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα και τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής MJ Research PT200 που έχει ήδη προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα.

<b>Πρόγραμμα: 2<sup>nd</sup> tail pcr</b>
Εκκινητές: ad 1.1- 1,2, 2,1-2,2- 3,1- 5,1/LB2
1. 4°C for 2min 2. 94°C for 10sec 3. 64°C for 1min 4. 72°C for 2min and 30sec 5. 94°C for 10sec 6. 64°C for 1min 7. 72°C for 2min and 30sec 8. 94°C for 10sec 9. 44°C for 1min 10. 72 °C for 2min and 30sec 11. Go to step 2 for 11 more cycles 12. 72°C for 5min 13. 4°C hold 14. END

### Tertiary PCR

Στον παρακάτω πίνακα περιέχονται οι περιεκτικότητες και οι ποσότητες των αντιδρώντων, βάση των ενζύμων και των πυκνών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση του τρίτου tail PCR:

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x ή 2x	1x	5μl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	1.5μl
dNTPs	10mM από	200μM	1μl
Άνω εκκινητής	10-20μM	200nM	1 μl
Εκφυλισμένος εκκινητής	4x	1x	12,5μl
DNA μήτρα	5μl of 100- fold diluted secondary per product		
<b>DNA πολυμεράση</b>	<b>(units/μl)</b>	<b>(units)</b>	<b>(u/μl)</b>
Taq (Invitrogen)	5	0,03	0.12
ddH <sub>2</sub> O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl		

- Ετοιμάζουμε την αντίδραση με τον ίδιο τρόπο όπως προηγούμενα.

<b>Πρόγραμμα: 3<sup>d</sup> tail pcr</b>
Εκκινητές: ad 1.1- 1,2, 2,1-2,2- 3,1- 5,1/LB3
<ol style="list-style-type: none"><li>1. 4°C for 2min</li><li>2. 94°C for 10sec</li><li>3. 44°C for 1min</li><li>4. 72°C for 2min and 30sec</li><li>5. Go to step 2 for 19 more cycles</li><li>6. 72°C for 5min</li><li>7. 4°C hold</li><li>8. END</li></ol>

### 2.13.3 RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

Στην RT-PCR 1.5μg ολικού RNA ελεύθερο από DNA μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε δυο βήματα:

- ♦ Αρχικά το ολικό RNA ελεύθερο από DNA και ο εκκινητής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης αποδιατάσσονται στους 65<sup>0</sup>C για 5min. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις σ' αυτό το βήμα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα.

Συστατικά Πρώτου Βήματος	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ολικό RNA ελεύθερο από DNA	-	1.5μg
Εκκινητής για ανάστροφη μεταγραφή (20μM)	1μl	
dNTPs 10mM	1μl	200mM
ddH <sub>2</sub> O	έως τα 12μl	-
Όγκος πρώτου βήματος 12μl		

- ♦ Μετά το πέρας των 5min ακολουθεί γρήγορη ψύξη στον πάγο, ελαφρά φυγοκέντρωση και προσθήκη των συστατικών του δεύτερου βήματος οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των οποίων δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Συστατικά Δευτέρου Βήματος	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
5 x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης	4 μl	1 x
100 mM DTT	2 μl	10 mM
Αναστολέα RNάσης 30 units/ μl (Promega)	1 μl	15 units
Expand™ Ανάστροφη Μεταγραφάση 50 units/ μl (Roche)	1 μl	50 units
Όγκος δευτέρου βήματος 8μl		
Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20 μl		

- ♦ Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 42<sup>0</sup>C για 1h ενώ ακολουθούν 15min στους 70<sup>0</sup>C.
- ♦ Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση ακολουθεί αραίωση του cDNA στα 60μl (προσθήκη 40μl ddH<sub>2</sub>O) και διατήρηση αυτού στους 4<sup>0</sup>C. Από τον συνολικό όγκο των 60μl χρησιμοποιήθηκε για κάθε PCR αντίδραση σε κάθε δείγμα 1.5μl.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR στην παρούσα εργασία.

<b>18s-F</b>	5'-TTG ATT CTA TGG GTG GTG GT -3'
<b>18s-R</b>	5'-CCT TGT TAC GAC TTC TCC TT -3'
<b>HSP-F</b>	5'-AAA GAA TTC ATG GAG GCG TTG G-3'
<b>HSP-R</b>	5'-CAA GCT GTC CTT CAA CTG AGA AAT GC-3'
<b>PIN1-F</b>	5'- ACAAAGATGATTACGGCGG -3'
<b>PIN1-R</b>	5'- GACCATAACTCTTCTCTCTCTCG-3'
<b>MP-F</b>	5'- AGGATGGAGTTTGTTCGTTGG -3'
<b>MP-R</b>	5'- GCAAAGTAAGATGGATGGAGC -3'
<b>IFL1-F</b>	5'- GACATCATCACTTTCTTGGGG -3'
<b>IFL1-R</b>	5'- CGTGAGAGAAGCAGTGACAGTAT -3'



- ◆ Τα προγράμματα που εφαρμόστηκαν για τα διάφορα ζεύγη εκκινητών είναι τα παρακάτω:

<b>Πρόγραμμα: 18s</b>	<b>Πρόγραμμα: HSP90</b>
Εκκινητές: 18s-F/18s-R	Εκκινητές: HSP90-F/HSP90-R
1. 94 <sup>0</sup> C for 2min 2. 94 <sup>0</sup> C for 20sec 3. 53 <sup>0</sup> C for 30sec 4. 72 <sup>0</sup> C for 45sec 5. Go to 2 for 24 times 6. 72 <sup>0</sup> C for 5min 7. 10 <sup>0</sup> C for ever 8. End	1. 94 <sup>0</sup> C for 2min 2. 94 <sup>0</sup> C for 25sec 3. 56 <sup>0</sup> C for 35sec 4. 72 <sup>0</sup> C for 50sec 5. Go to 2 for 39 times 6. 72 <sup>0</sup> C for 5min 7. 10 <sup>0</sup> C for ever 8. End

<b>Πρόγραμμα: PIN1</b>	<b>Πρόγραμμα: MP</b>	<b>Πρόγραμμα: IFL1</b>
Εκκινητές: PIN1-F/PIN1-R	Εκκινητές: MP-F/MP-R	Εκκινητές: IFL1-F/IFL1-R
1. 94 <sup>0</sup> C for 2min 2. 94 <sup>0</sup> C for 20sec 3. 53 <sup>0</sup> C for 30sec 4. 72 <sup>0</sup> C for 45sec 5. Go to 2 for 24 times 6. 72 <sup>0</sup> C for 5min 7. 10 <sup>0</sup> C for ever 8. End	1. 94 <sup>0</sup> C for 2min 2. 94 <sup>0</sup> C for 25sec 3. 56 <sup>0</sup> C for 35sec 4. 72 <sup>0</sup> C for 50sec 5. Go to 2 for 39 times 6. 72 <sup>0</sup> C for 5min 7. 10 <sup>0</sup> C for ever 8. End	1. 94 <sup>0</sup> C for 2min 2. 94 <sup>0</sup> C for 25sec 3. 57 <sup>0</sup> C for 30sec 4. 72 <sup>0</sup> C for 45sec 5. Go to 2 for 39 times 6. 72 <sup>0</sup> C for 5min 7. 10 <sup>0</sup> C for ever 8. End

## 2.14 Διαλύματα και Θρεπτικά Μέσα

### 2.14.1 Θρεπτικά διαλύματα φυτών

#### MS (Murashige and Skoog)

- ◆ 1xMS (MS: Murashige and Skoog medium 2.2g/l Duchefa, μακρο-μικροστοιχεία και βιταμίνες)
- ◆ MES: 0.05% (για σταθεροποίηση του pH, SIGMA P-8164)
- ◆ Σακχαρόζη: 1% (πηγή άνθρακα)
- ◆ KOH 1N (για ρύθμιση του pH στο 5.7)
- ◆ Phytigel (SIGMA M8250-100G): 0.33% ή Αγαρόζη: 1% (για στερεοποίηση του υποστρώματος)

### 2.14.2 Διαλύματα απομόνωσης και καθαρισμού νουκλεϊνικών οξέων

- ◆ SEVAG  
24 χλωροφορμιο: 1 ισοαμυλική αλκοόλη
- ◆ 1% CTAB διάλυμα κατακρήμνισης DNA  
1% w/v CTAB (Cetyl- Trimethyl- Ammonium Bromide), 50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA pH8
- ◆ 2x CTAB buffer  
2% w/v CTAB, 100mM Tris-HCl pH8.5, 20mM EDTA pH8, 1.4M NaCl, 1% w/v PVP (Πολυβινυλ-πυρρολιδόνη, MB=40000), 1% w/v DTT
- ◆ 5% CTAB  
5% w/v CTAB, 0.35M NaCl
- ◆ REB διάλυμα επαναδιάλυσης DNA  
10μM Τρισ-ΗΨλ pH 7.5, 1μM EDTA pH8, 1M NaΨλ

### 2.14.3 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

- ◆ TAE 50x  
24.2gr (w/v) Tris-base, 100ml 0.5M EDTA pH8 (Ethylene- Diamine- Tetracetic Acid disodium salt), 57ml CH<sub>3</sub>COOH for 1lt of buffer
- ◆ Ethidium Bromide (EtBr)  
10mg/ml H<sub>2</sub>O. Αποθήκευση σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου

- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για gel αγαρόζης  
1x TAE, 0.5μg/ml EtBr
- ◆ Διάλυμα χρωστικής για ηλεκτροφόρηση DNA  
1x βασικού διαλύματος χρωστικών (10x) που περιέχει 1.25% (w/v) bromophenol blue και 1.25% (w/v) xylene cyanol σε dH<sub>2</sub>O, 50% σουκρόζη
- ◆ GeneRuler™ DNA Ladder Mix Fermentas

#### 2.14.4 Διαλύματα μετασχηματισμού και καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων

- ◆ Θρεπτικό μέσο LB  
0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) peptone. Για στερεό θρεπτικό μέσο προσθέτουμε και 1.4% bacteriological agar
- ◆ Ampicillin  
100mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C
- ◆ Kanamycin  
50mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C
- ◆ Gentamicin sulphate  
25mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -200C

#### 2.14.5 Διαλύματα χειρισμού και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- ◆ P1 διάλυμα αλκαλικής λύσης  
1ml P1: 20μl EDTA 0.5M, 50μl Tris-HCl pH8, 10μl RNase, 920μl dH<sub>2</sub>O
- ◆ P2 διάλυμα αλκαλικής λύσης  
1% SDS, 0.2N NaOH
- ◆ P3 διάλυμα αλκαλικής λύσης  
100ml P3: 60ml 3+5M CH<sub>3</sub>COOK, 11.5ml CH<sub>3</sub>COOH, 28.5ml dH<sub>2</sub>O
- ◆ STET ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης  
0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA (pH 8), 5% Triton X-100, 1mg/ml λυσοζύμης
- ◆ 2x ligation buffer  
30mM Tris-HCl pH7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG
- ◆ 10% BSA  
10gr/ 100ml dH<sub>2</sub>O. Αποθήκευση στους 4<sup>0</sup>C

◆ RNάση

Μητρικό διάλυμα RNάσης A 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH7.4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15min, διακοπή για 20min και επανάληψη βρασμού. Φυλάσσεται στους -20<sup>0</sup>C.

◆ NEBuffer 1

10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, pH7.0 at 25<sup>0</sup>C

◆ NEBuffer 3

50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl, 1mM Dithiothreitol, pH7.9 at 25<sup>0</sup>C.

◆ NEBuffer 4

50mM Potassium acetate, 20mM Tris-HCl, 10mM Magnesium acetate, 1mM Dithiothreitol, pH7.9 at 25<sup>0</sup>C

### 2.14.6 Διαλύματα αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

◆ dNTPs

10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM TTP, dH<sub>2</sub>O

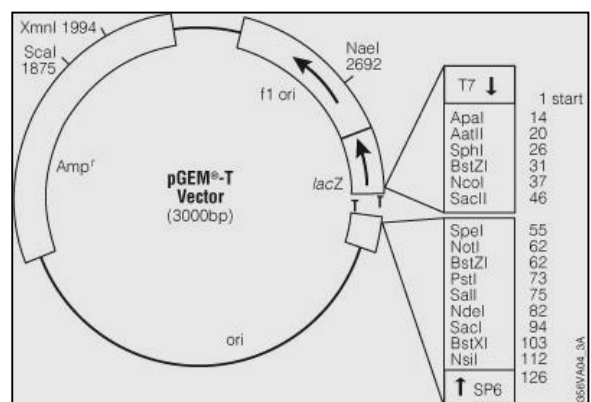
◆ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (Taq invitrogen)

200mM Tris-HCl, 500mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.15 Πλασμιδιακοί Φορείς

◆ pGEM-T Easy vector

Είναι ένας μικρός (3.015bp), εύρηστος φορέας για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, παρέχει την δυνατότητα επιλογής μπλ'ς-άσπρων αποικιών και είναι υψηλής αντιγραφικότητας μέσα σε κύτταρα *E.coli*. η περιοχή κλωνοποίησης έχει ελεύθερες 3'θυμίνες και εμπεριέχεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το κλωνοποιημένο τμήμα DNA εξάγεται εύκολα με την χρήση των ενζύμων περιορισμού.

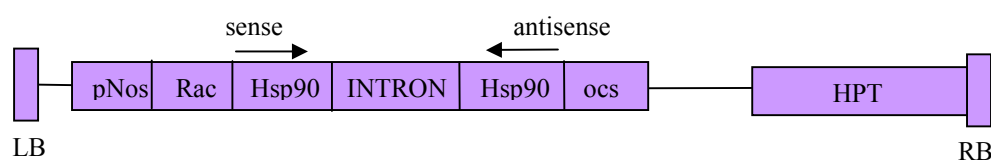


Εικόνα 2.14: Χάρτης pGEM-T easy φορέα

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 Χαρακτηρισμός των αποσιωπημένων σειρών RacRNAi/Hsp90RNAi

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των κυτταροπλασματικών Hsp90 στην αναπτυξιακή διαδικασία σχηματισμού του αγωγού ιστού στην *Arabidopsis*, δημιουργήθηκε κατάλληλη κατασκευή αποσιώπησης για τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας *AtHsp90* υπό τον έλεγχο του ιστοειδικού προαγωγέα του γονιδίου *Rac2/Rop7* όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.1. Η περιοχή των Hsp90 που περιέχεται στην κατασκευή αποτελεί την περιοχή με τη μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων και βρίσκεται σε κατεύθυνση νοήματος και αντινοήματος, με σκοπό την ενεργοποίηση του μηχανισμού αποσιώπησης.

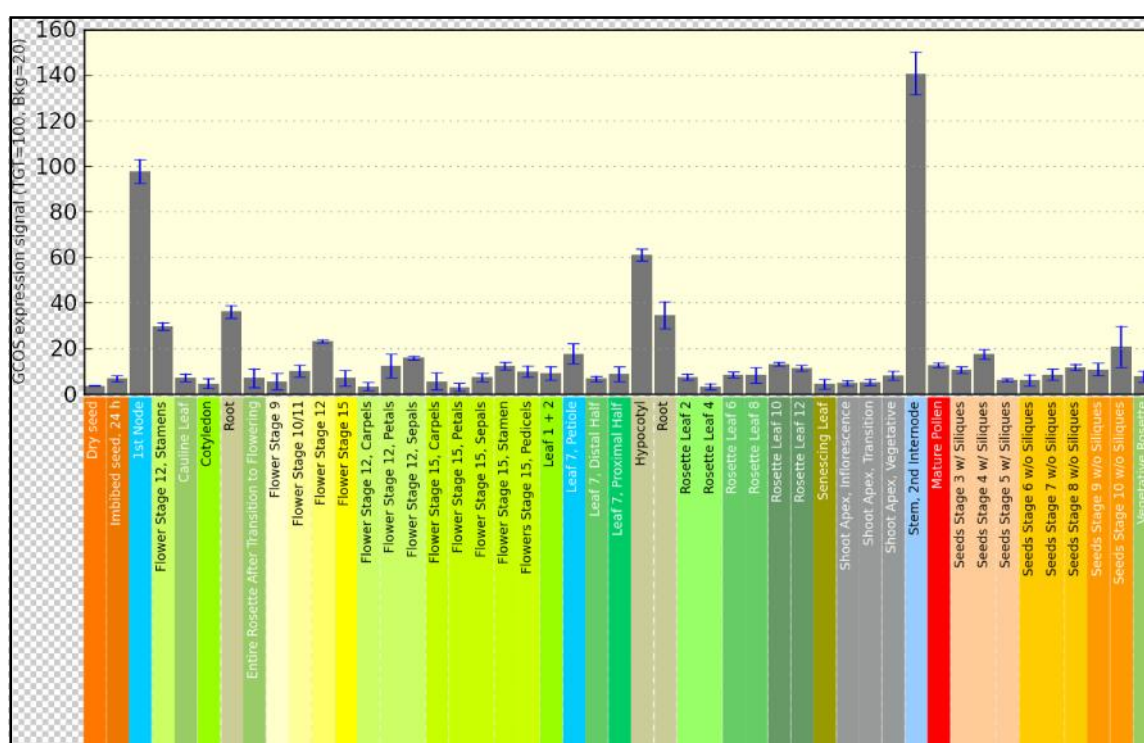


**Εικόνα 3.1.1:** Σχηματική αναπαράσταση της κασέτας έκφρασης *ihpRNA* για την αποσιώπηση των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων κάτω από την επίδραση του ιστοειδικού προαγωγέα *RAC*.

Η επιλογή του μηχανισμού αποσιώπησης ως εργαλείο για την μελέτη του ρόλου των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων στην ανάπτυξη, βασίστηκε σε παλαιότερες μελέτες του εργαστήριου όπου η δημιουργία τριπλών μεταλλαγμάτων των *Hsp90* είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο των φυτών σε μικρή ηλικία, ένα γεγονός που αποδεικνύει την τεράστια σημασία των HSP90 πρωτεϊνών στην ανάπτυξη του φυτού. Η επιλογή του ιστοειδικού προαγωγέα *Rac2/Rop7* είχε ως σκοπό την στοχευμένη αποσιώπηση των κυτταροπλασματικών *Hsp90* σε συγκεκριμένους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του φυτού.

Το γονίδιο *Rac2/Rop7* ανήκει στην Rho οικογένεια μικρών GTPασών (RHO, RAC και Cdc42). Αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες και ενεργοποιούνται όταν προσδένεται GTP και απενεργοποιούνται κατά την υδρόλυση του GTP σε GDP. Έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού, της παραγωγής υπεροξειδίου ως αντίδραση άμυνας, στη μεταγωγή σήματος που επάγεται από την παρουσία καταπόνησης καθώς και σε μηχανισμούς

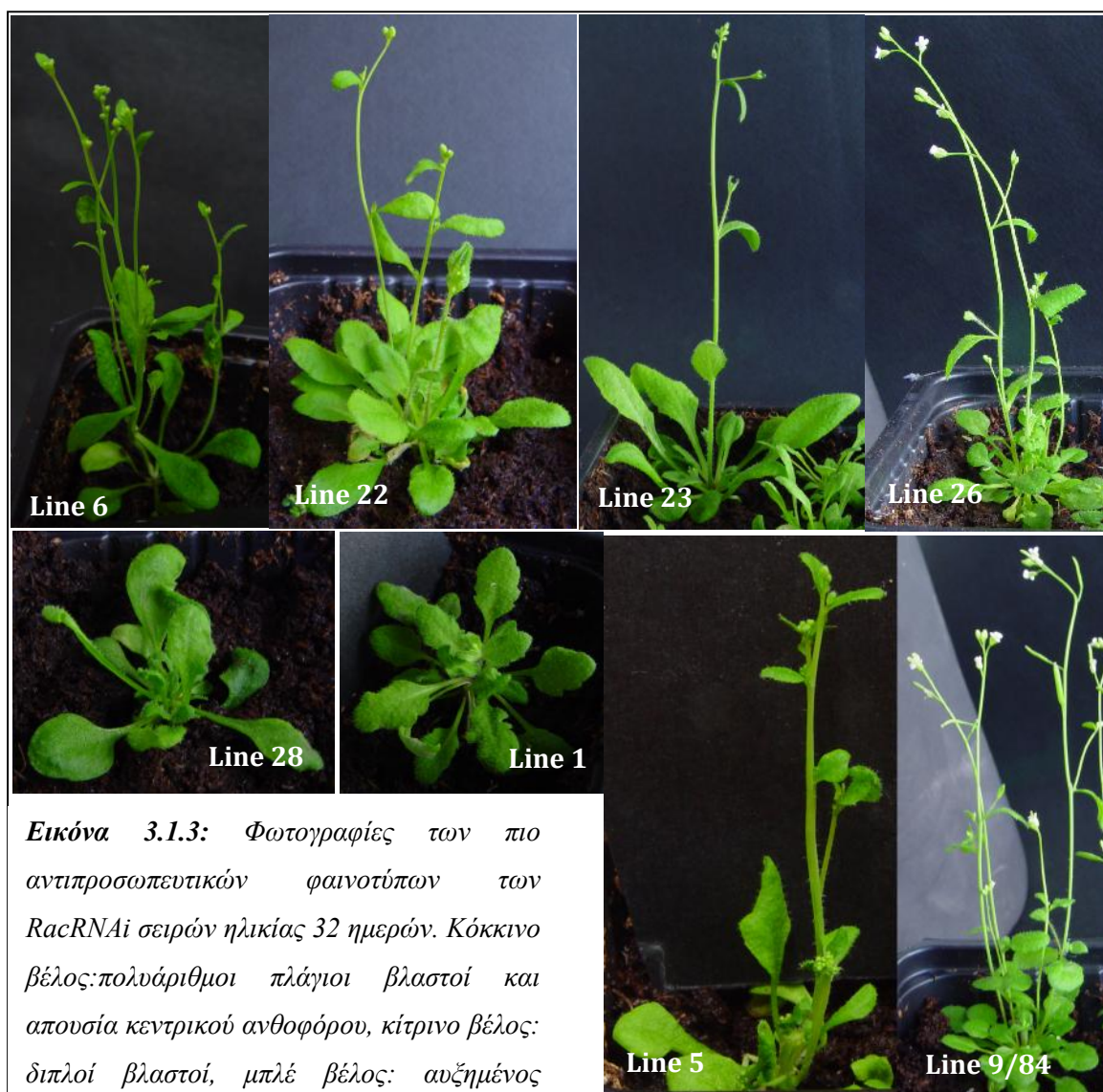
κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Το γονίδιο *AtRac2/Rop7* (At5g45970) είναι αρχαίο μέλος της υποομάδας I της *AtRac/Rop* οικογένειας γονιδίων και το πιο πιθανό είναι να έχει αναπτυχθεί από τότε που εμφανίστηκαν τα αγγειώδη φυτά (Winge et al, 2000, Christensen et al, 2003). Η έκφρασή του ανιχνεύεται στο **πρωτογενές ξύλωμα των ριζών, κοτυληδόνων, βλαστών και φύλλων** και έχει σχετιστεί με την ανάπτυξη του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Brembu et al, 2005). Στην εικόνα 3.1.2 παρουσιάζεται διάγραμμα της έκφρασης του γονιδίου *Rac2/Rop7* σύμφωνα με δεδομένα του προγράμματος e-fp Browser του TAIR.



Εικόνα 3.1.2: Έκφραση του γονιδίου *Rac2/Rop7* σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τα πρότυπα έκφρασης διαφαίνεται ότι το γονίδιο *Rac2/Rop7* να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Ωστόσο εμφανίζει κάποια μέγιστα όπως είναι στη ρίζα, το υποκοτύλιο, το πρώτο μεσογονάτιο και σε συγκεκριμένα ανθικά στάδια (12, στήμονες). Ωστόσο, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ανιχνεύονται στο δεύτερο μεσογονάτιο του βλαστού όταν αυτό έχει περάσει στην ανθική φάση.

Από τον μετασχηματισμό φυτών Col-0 με την κατασκευή αποσιώπησης *RacRNAi/Hsp90RNAi* προέκυψαν 30 αποσιωπημένες σειρές. Να σημειωθεί ότι ο φαινότυπος που παρουσιάζεται στην F2 γενιά των παραπάνω φυτών, εμφανίζει ομοιότητες με τους φαινότυπους των των κυτταροπλασματικών *Hsp90* μεταλλαγμάτων ολικής απώλειας. Γενικά, παρουσιάζεται μια εικόνα πλειοτροπικού φαινοτύπου με καθυστερημένη ανάπτυξη, διακυμάνσεις του ύψους, μεγάλο αριθμό φύλλων ροζέτας, πολυάριθμους πλάγιους βλαστούς και σε κάποιες περιπτώσεις απουσία κυριαρχίας κορυφής. Στην εικόνα 3.1.3 παρουσιάζονται τα πιο αντιπροσωπευτικά φυτά από μερικές από τις 30 αποσιωπημένες σειρές, στις οποίες είναι ορατοί οι φαινότυποι που περιγράφηκαν.

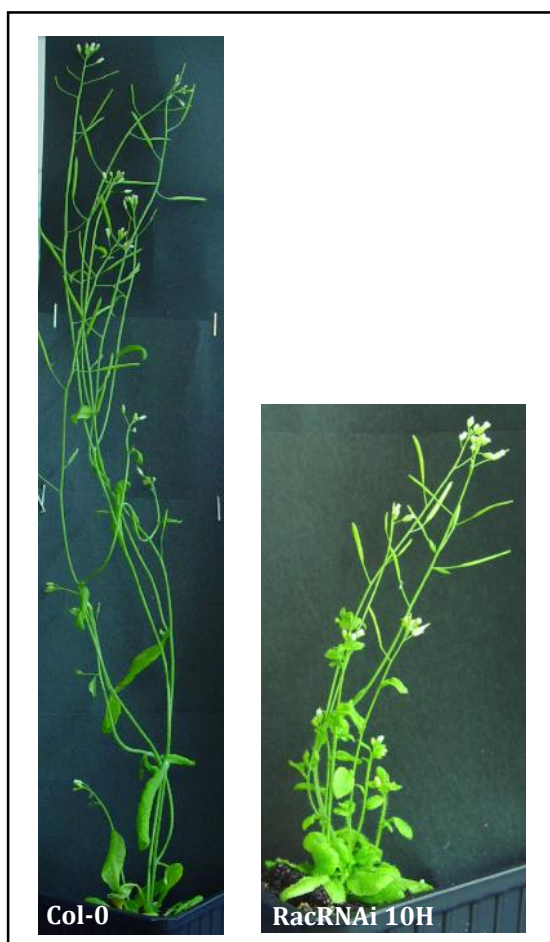


**Εικόνα 3.1.3:** Φωτογραφίες των πιο αντιπροσωπευτικών φαινοτύπων των *RacRNAi* σειρών ηλικίας 32 ημερών. Κόκκινο βέλος: πολυάριθμοι πλάγιοι βλαστοί και απουσία κεντρικού ανθοφόρου, κίτρινο βέλος: διπλοί βλαστοί, μπλέ βέλος: αυξημένος αριθμός φύλλων ροζέτας και πράσινο βέλος: θαμνώδη φυτά.



Στη παρούσα εργασία θα μελετήσουμε εκτενέστερα την RacRNAi 10H σειρά η οποία παρουσίασε τον περισσότερο ενδιαφέροντα φαινότυπο, αυτόν της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής. Σε φαινοτυπική ανάλυση που έγινε προηγουμένα στο εργαστήριο η σειρά RacRNAi 10H χαρακτηρίζεται από νάνα φυτά όπου το μεγαλύτερο ποσοστό των φυτών έχει ύψος από 6cm έως 8cm, όταν για τον άγριο τύπο η ίδια τιμή κυμαίνεται από 20-25cm. Επίσης, παρατηρήθηκε η έκπτυξη πολλών πλάγιων βλαστών, οι οποίοι αναπτύσσονται ταυτόχρονα, χωρίς να υπάρχει έκπτυξη ενός κεντρικού βλαστού αρχικά και των πλάγιων βλαστών αργότερα κατά την ανάπτυξη, όπως συμβαίνει με το φυτό αγρίου τύπου (Col-0).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της σειράς RacRNAi 10H είναι ο φαινότυπος του αγγειακού αγωγού στις κοτυληδόνες όπως παρατηρήθηκε από το οπτικό μικροσκόπιο. Ο αγγειακός ιστός παρουσίασε δυσμορφίες και ασυνέχειες συγκριτικά με το πρότυπο που δίνει το φυτό αγρίου τύπου αλλά και έλλειψη προσανατολισμού. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα φυτά στα οποία έγινε η παραπάνω φαινοτυπική παρατήρηση αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό (Hyg<sub>30</sub>). Αναλυτικότερη φαινοτυπική ανάλυση της σειράς RacRNAi 10H θα γίνει στη συνέχεια. Στην εικόνα 3.1.4 παρουσιάζονται ενδεικτικά, φυτά αγρίου τύπου και RacRNAi 10H.



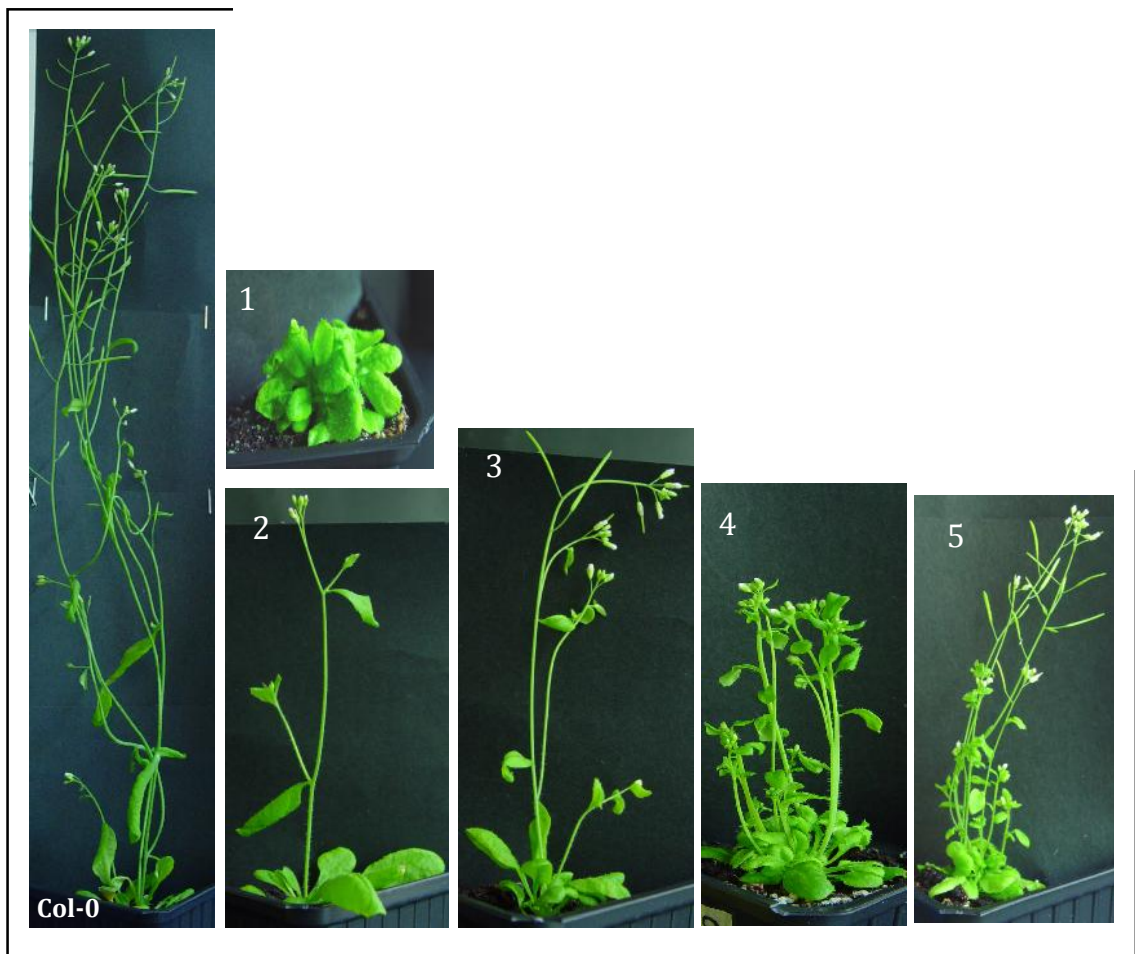
*Εικόνα 3.1.4: Φυτά αγρίου τύπου, col-0 (αριστερά) και RacRNAi 10H (δεξιά) ηλικίας 42 ημερών.*

### **3.2 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός της σειράς RacRNAi 10H**

Για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό της σειράς RacRNAi 10H χρησιμοποιήθηκαν σπόροι της F3 και F4 γενιάς, οι οποίοι στρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS χωρίς αντιβιοτικό. Συνολικά στρώθηκαν 100 σπόρια RacRNAi 10H F3 και 28 σπόρια RacRNAi 10H F4, τα οποία μετά από 18 ημέρες, δηλαδή στο στάδιο των έξι με επτά πραγματικών φύλλων μεταφυτεύθηκαν στο χώμα. Κάθε γλαστράκι περιείχε δύο φυτάκια. Παράλληλα με τα σπόρια της αποσιωπημένης σειράς, στρώθηκαν και φυτά αγρίου τύπου (Col-0). Οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών ήταν 16h φώς/ 8h σκοτάδι στους 22°C. Ακολούθησε φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών της F3 γενιάς στις 25 ημέρες και στις 32 ημέρες από την ημέρα που στρώθηκαν στα τρυβλία. Κατά την φαινοτυπική παρατήρηση μετρήθηκε ο αριθμός των φύλλων ροζέτας, η ύπαρξη ή μη κεντρικού βλαστού καθώς και άλλα χαρακτηριστικά του φυτού όπως είναι το ύψος, ο αριθμός των πλάγιων βλαστών απουσία και παρουσία κεντρικού βλαστού. Τέλος, έγινε παρατήρηση των καρποταξιών των φυτών της F4 γενιάς στο στερεοσκόπιο.

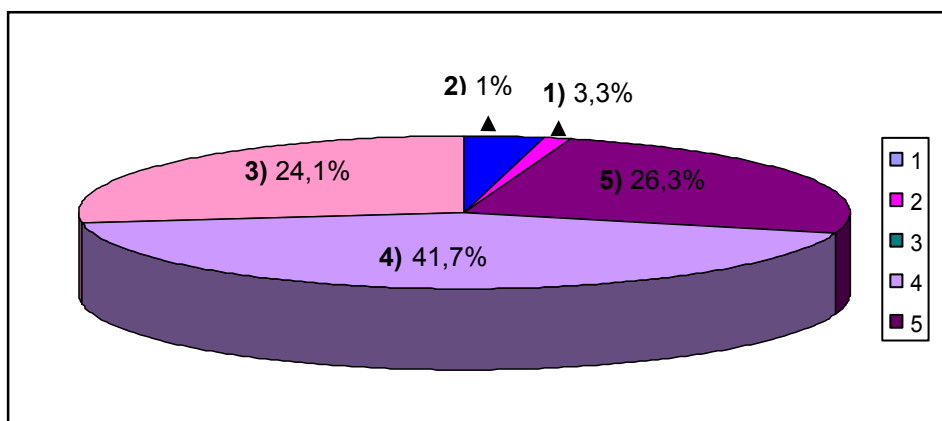
Από την φαινοτυπική παρατήρηση προέκυψαν πέντε κατηγορίες φυτών RacRNAi 10H. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται φυτά τα οποία στις 32 μέρες βρίσκονται ακόμη στην φάση της ροζέτας (εικόνα 3.2.1[1]). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει φυτά τα οποία φέρουν κεντρικό βλαστό αλλά απουσιάζουν οι πλάγιοι βλαστοί όπως συμβαίνει στα φυτά αγρίου τύπου ίδιας ηλικίας (εικόνα 3.2.1 [2]). Τα φυτά της τρίτης κατηγορίας χαρακτηρίζονται από την παρουσία κεντρικού βλαστού όπως συμβαίνει και στα φυτά της δεύτερης κατηγορίας ωστόσο είναι πιο ψηλά, φέρουν περισσότερες διακλαδώσεις στον κεντρικό βλαστό αλλά και πλάγιους βλαστούς (εικόνα 3.2.1 [3]).

Στην τέταρτη και πέμπτη κατηγορία ανήκουν φυτά τα οποία παρουσιάζουν έλλειψη κυριαρχίας κορυφής, με πολυάριθμους πλάγιους βλαστούς. Η διαφορές τους βέβαια είναι πολλές καθώς η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει φυτά πιο χαμηλά σε ύψος, με πεπλατυσμένους βλαστούς οι οποίοι ξεκινούν ως ένας και καταλήγουν σε τρεις ή και τέσσερις, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.1 [4]. Τέλος, η πέμπτη κατηγορία περιλαμβάνει φυτά με ψηλούς σχετικά βλαστούς σε σχέση με την κατηγορία [4], οι οποίοι φαίνεται να είναι λεπτοί σε μέγεθος αλλά δεν έχουν καλή στήριξη.



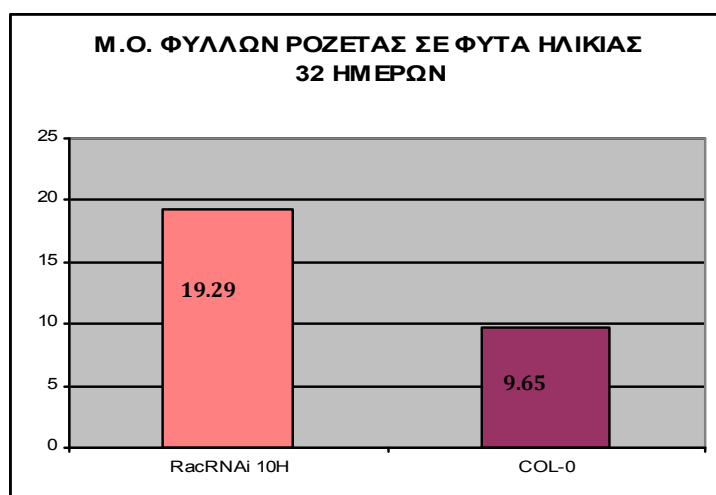
**Εικόνα 3.2.1:** Οι πέντε φαινοτυπικές κατηγορίες της *RacRNAi* σειράς και το φυτό αγρίου τύπου *col-0*, ηλικίας 32 ημερών. Τα γράμματα αντιστοιχούν στις πέντε φαινοτυπικές κατηγορίες της *RacRNAi* σειράς.

Βέβαια, και οι πέντε κατηγορίες χαρακτηρίζονται από φυτά μικρότερου ύψους σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (*col-0*) (έχει ήδη αναφερθεί ότι το ύψος των φυτών της *RacRNAi* 10H σειράς κυμαίνεται από 6cm έως 12cm με το μεγαλύτερο ποσοστό των φυτών να κυμαίνεται μεταξύ 6-8cm), από φυτά με υψηλό αριθμό φύλλων ροζέτας και από συμφυώμενους βλαστούς. Στο διάγραμμα 3.2.1 φαίνεται το ποσοστό που κατέχει κάθε φαινοτυπική κατηγορία στο σύνολο, 97 φυτών, του πληθυσμού.



**Διάγραμμα 3.2.1:** Τα ποσοστά που κατέχει κάθε φαινοτυπική κατηγορία της RacRNAi σειράς στον πληθυσμό. Οι αριθμοί 1-5 αντιστοιχούν στις φαινοτυπικές κατηγορίες όπως αυτές έχουν σημειωθεί στην εικόνα 3.2.1.

Κατά την φαινοτυπική παρατήρηση των παραπάνω φυτών (αγρίου τύπου και RacRNAi 10H) έγινε μέτρηση των φύλλων ροζέτας στις 32 ημέρες από την ημέρα που τα σπόρια στρώθηκαν στα τρυβλία. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται στο διάγραμμα 3.2.2, σύμφωνα με το οποίο ο μέσος όρος των φύλλων ροζέτας είναι 19.29 και 9.65 για τα φυτά της RacRNAi 10H σειράς και των αγρίου τύπου αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 3.2.2:** Απεικόνιση του μέσου όρου των φύλλων ροζέτας, φυτών RacRNAi 10H και φυτών αγρίου τύπου col-0. Αριστερά, ηλικίας 32 ημερών.

Τέλος, ακολούθησε παρατήρηση της μορφολογίας των καρποταξιών των φυτών της F4 γενιάς στο στερεοσκόπιο. Μεταξύ των υπολοίπων μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των σπορίων που περιέχονται ανά καρποταξία, ο αριθμός των μη γονιμοποιημένων θηλυκών και ο αριθμός των σπορίων που πεθαίνουν. Συνολικά παρατηρήθηκαν 60 καρποταξίες οι οποίες προέρχονταν από απογόνους τεσσάρων φυτών της σειράς RacRNAi 10H (Rac2, Rac26, Rac28 και Rac10). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα 3.2.1 ενώ στην εικόνα 3.2.2 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες εικόνες των καρποταξιών των φυτών.

<b>Rac siliques</b>			
<b>Φυτό</b>	<b>Σύνολο</b>	<b>Μη γονιμοποιημένα</b>	<b>Πεθαίνουν</b>
<b>pool</b>	46	3	4
<b>Rac26</b>	185	36	8
<b>Rac28</b>	1050	20	79
<b>Rac2</b>	53	5	1
<b>Rac10</b>	157	37	2
<b>Σύνολο</b>	1491	101	94

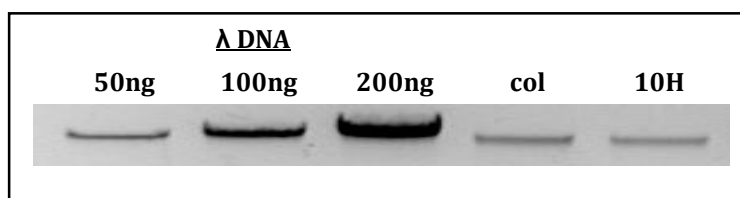
*Πίνακας 3.3.2: Μέτρηση των σπορίων των καρποταξιών των φυτών της σειράς RacRNAi 10H F4 γενιάς.*



*Εικόνα 3.2.2: Καρποταξίες των φυτών Rac26 και Rac10 στο στερεοσκόπιο. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τα μη γονιμοποιημένα θηλυκά ενώ τα κίτρινα βέλη δείχνουν τα σπόρια, τα οποία μετά την γονιμοποίηση του θηλυκού, πέθαναν.*

### 3.3 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi στο γένωμα του *Arabidopsis*.

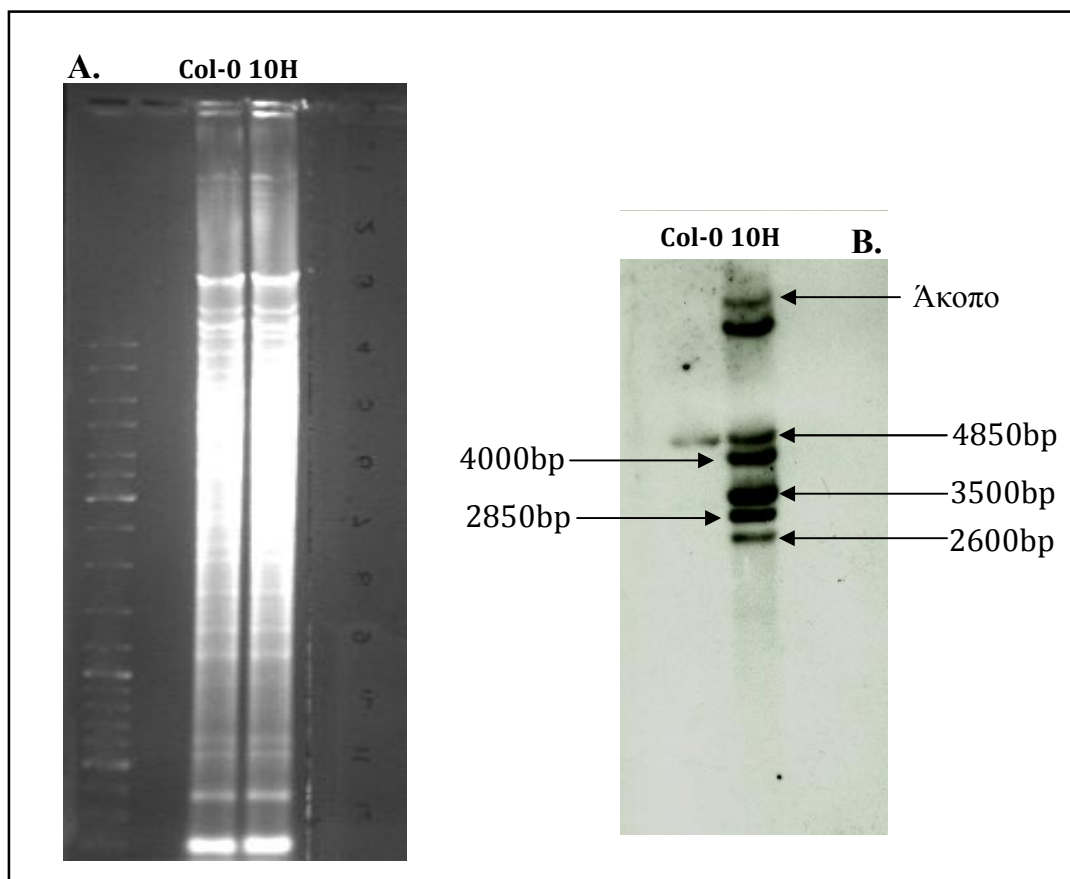
Προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi στο γένωμα του *Arabidopsis*, πραγματοποιήθηκε υβριδισμός γενωματικού DNA με ειδικά σημασμένο τμήμα της κατασκευής. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε γενωματικό DNA από ολόκληρα φυτά (37 ημερών) αγρίου τύπου και της RacRNAi 10H σειράς, με την μέθοδο CTAB (εικόνα 3.3.1) (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). 4μg γονιδιωματικού DNA υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού HindIII. Ακολούθησε ανάλυση των πέψεων σε πηκτή αγαρόζης 0.8% και μεταφορά του DNA σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (εικόνα 3.3.2).



*Εικόνα 3.3.1: Απομόνωση DNA με Long CTAB από φυτά Arabidopsis, col και RAC, 37 ημερών.*

Ταυτόχρονα, έγινε διπλή πέψη της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi με τα ένζυμα SacI και EcoRI, αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης κι έτσι απομονώθηκε τμήμα του Rac προαγωγέα, μεγέθους 1221bp. Η σήμανση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Roche, Dig High Prime DNA Labeling (Cat.No.1585614). Ο υβριδισμός έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Church και Gilbert 1988 (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι) στη θερμοκρασία των 65°C για 18 ώρες. Μετά τον υβριδισμό το φίλτρο ξεπλύθηκε 2 φορές με 40mM Na[P], 5% SDS, 1mM EDTA για 15min στους 65°C και 60°C. Ακολούθησαν άλλα πέντε ξεπλύματα με 40mM Na[P], 1% SDS, 1mM EDTA για 15min στους 55°C, 50°C, 45°C, 40°C και 35°C, αντίστοιχα. Τα ξεπλύματα είναι ίσως το πιο σημαντικό στάδιο καθώς η μεταβολή της συγκέντρωσης του SDS συμβάλλει στην απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή από τη μεμβράνη κι αποφεύγεται ο ‘θόρυβος’ κατά την έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ. Στην εικόνα 3.3.2

παρουσιάζονται οι πέψεις του γενωματικού DNA με το ένζυμο περιορισμού HindIII και ο υβριδισμός με τον σημασμένο ανιχνευτή.



**Εικόνα 3.3.2:** Α) Πέψη 4μg γενωματικού DNA από ολόκληρα φυτά *Arabidopsis* αγρίου τύπου και *RacRNAi* 10H σειράς, 37 ημερών, με το ένζυμο περιορισμού HindIII. Β) Πρότυπο του υβριδισμού των ζωνών (μεταφορά κατά Southern). Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το τμήμα του προαγωγέα *Rac2/Rop7* αφού πρώτα σημάνθηκε με το *Dig High Prime DNA Labeling Kit*. Τα βέλη και οι αριθμοί υποδεικνύουν τα σχετικά μοριακά βάρη σε bp των αντίστοιχων ζωνών.

Από το πρότυπο του υβριδισμού φαίνεται πως οι κύριες ζώνες που υβριδίζουν είναι επτά. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι στο γένωμα του *Arabidopsis* έχουν ενσωματωθεί περισσότερα από ένα αντίγραφα της κατασκευής *RacRNAi/Hsp90RNAi*. Συγκρίνοντας τα μοριακά βάρη των ζωνών που υβριδίζουν μεταξύ των δύο δειγμάτων (*col-0* και *Rac* 10H) παρατηρείται ότι η ζώνη που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 4850bp υπάρχει τόσο στον μάρτυρα (*col-0*) όσο και στην αποσιωπημένη σειρά *RacRNAi* 10H. Η συγκεκριμένη ζώνη αντιστοιχεί σε τμήμα του προαγωγέα του ενδογενούς γονιδίου του

*Arabidopsis*, *Rac2/Rop7*, από το οποίο έχει δημιουργηθεί ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε στον υβριδισμό. Άρα, η ζώνη αυτή δεν αποτελεί αντίγραφο της κατασκευής που έχει χρησιμοποιηθεί στον μετασχηματισμό των φυτών. Επίσης, η ζώνη με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000bp (στο δείγμα 10H) εικάζεται ότι αντιστοιχεί σε άκοπο γενωματικό DNA. Τελικά τα αποτελέσματα του υβριδισμού υποδεικνύουν ότι στο γένωμα του *Arabidopsis* για την σειρά RacRNAi 10H υπάρχουν πέντε αντίγραφα της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi.

### **3.4 Προσδιορισμός της θέσης των αντιγράφων της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi στο γένωμα του *Arabidopsis*.**

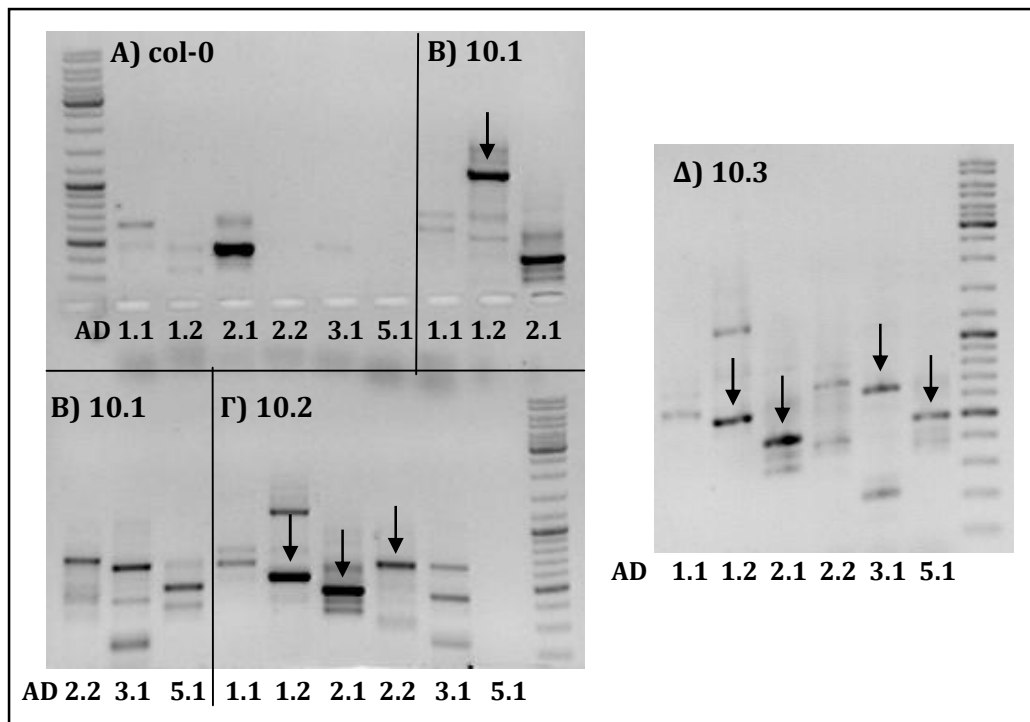
#### **3.4.1 Αντίδραση TAIL-PCR**

Για τον προσδιορισμό της θέσης των ενθέσεων στο γένωμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της TAIL-PCR, η οποία δίνει την δυνατότητα ενίσχυσης άγνωστων αλληλουχιών που βρίσκονται κοντά σε γνωστές αλληλουχίες με την βοήθεια κατάλληλων εκκινητών.

Αρχικά απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA, με την μέθοδο CTAB από φυτά αγρίου τύπου (Col-0), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και από τρία διαφορετικά φυτά της σειράς RacRNAi 10H. Στη συνέχεια, ακολούθησε αντίδραση Tail-PCR χρησιμοποιώντας ως εξειδικευμένους εκκινητές αλληλουχίες της T-DNA ένθεσης παράλληλα με πέντε διαφορετικούς εκφυλισμένους εκκινητές, AD (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

Στην εικόνα 3.4.1 δίνονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης Tail- PCR μετά από την ανάλυσή τους σε πηκτή αγαρόζης 1%.

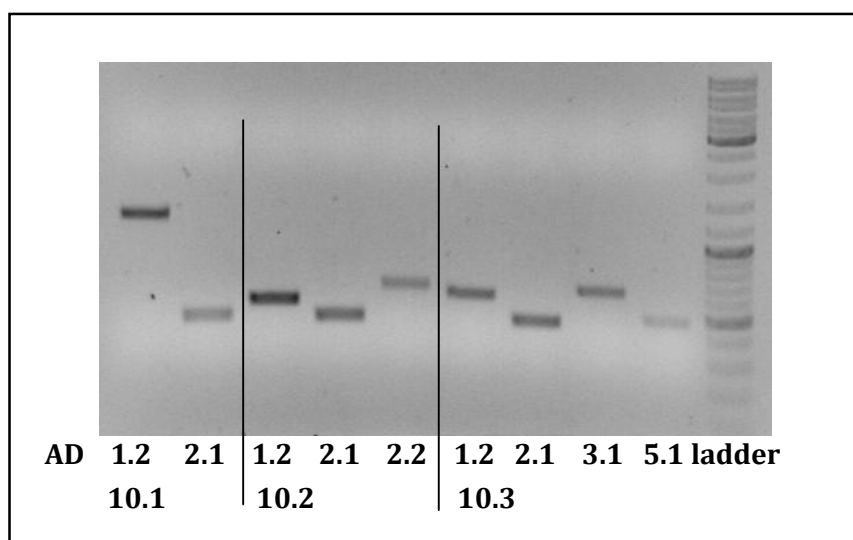




**Εικόνα 3.4.1:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων της TAIL-PCR αντίδρασης για *Arabidopsis* αγρίου τύπου (*Col-0*) (A) και για τρία φυτά *Arabidopsis* της *RacRNAi 10H* σειράς (B, Γ και Δ). Παρουσιάζονται τα προϊόντα και των πέντε αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους πέντε διαφορετικούς AD εκκινητές. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες που επιλέχθηκαν ως πραγματικά προϊόντα της αντίδρασης PCR.

Από την ανάλυση των προϊόντων παρατηρήθηκε ότι πραγματικό προϊόν ενισχύθηκε με όλους τους εκκινητές όμως για κάθε φυτό 10H το μοτίβο των ζωνών που ενισχύθηκαν ήταν κάπως διαφορετικό. Πιο συγκεκριμένα, με τον AD 1.1 εκκινητή δεν ενισχύθηκε καμία περιοχή γονιδιωματικού DNA και στα τρία φυτά, ωστόσο με τον AD 5.1 ανιχνεύεται προϊόν στα φυτά 10.1 και 10.3 ενώ στο φυτό 10.2 δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση. Όταν χρησιμοποιήθηκε ο AD 1.2 εκκινητής παρατηρήθηκε η ενίσχυση τμημάτων γονιδιωματικού DNA και στα τρία φυτά, όμως φαίνεται ότι δεν είναι το ίδιο προϊόν καθώς εμφανίζουν μεγάλη διαφορά στο μοριακό βάρος. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία τα προϊόντα που ενισχύθηκαν με τους εκκινητές AD1.2 για το φυτό 10.1, τους AD 1.2, 2.1 και 2.2 για το φυτό 10.2 και τέλος τους AD 1.2, 2.1, 3.1 και 5.1 για το φυτό 10.3 προκειμένου να εντοπιστούν οι θέσεις των ενθέσεων της *RacRNAi 10H* σειράς.

Ακολούθησε απομόνωση, καθαρισμός των επιλεγμένων κλασμάτων από την πηκτή αγαρόζης (εικόνα 3.4.2) και προσδιορισμός του ακριβούς μεγέθους και της ποσότητάς τους (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).



**Εικόνα 3.4.2:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης TAIL-PCR με τους εκκινητές που επιλέχθηκαν παραπάνω μετά από τον καθαρισμό.

Από την ανάλυση των καθαρών πλέον προϊόντων παρατηρήθηκε πως το προϊόν ενίσχυσης με τον εκκινητή AD 2.1 του φυτού 10.1 είναι ίδιο με το προϊόν του αντίστοιχου εκκινητή του φυτού 10.2. Για το λόγο αυτό, η ζώνη από το φυτό 10.1 δεν χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση. Τα μοριακά μεγέθη τα οποία αντιστοιχούν στα κλάσματα που απομονώθηκαν δίνονται στον πίνακα 3.4.1.

<b>Μοριακά μεγέθη σε bp</b>			
<b>AD</b>	<b>Φυτό 10.1</b>	<b>Φυτό 10.2</b>	<b>Φυτό 10.3</b>
<b>1.2</b>	1200	600	-
<b>2.1</b>	-	400	400
<b>2.2</b>	-	700	-
<b>3.1</b>	-	-	686
<b>5.1</b>	-	-	500

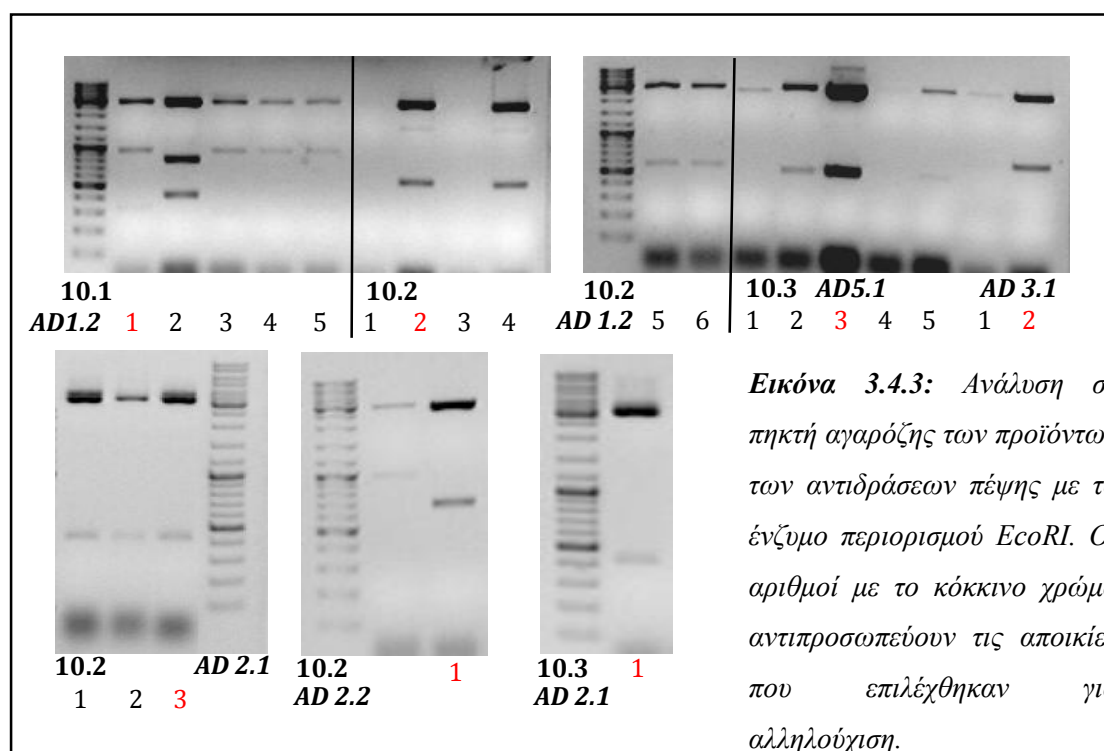
**Πίνακας 3.4.1:** Τα μοριακά μεγέθη των προϊόντων της TAIL-PCR τα οποία επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Στόχος των επόμενων βημάτων ήταν η κλωνοποίηση των κλασμάτων σε κατάλληλο φορέα και η αλληλούχισή τους προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιά θέση του γονιδιώματος εντοπίζονται οι ενθέσεις.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση για την προσθήκη αδερινών (A) στο 3' άκρο των τμημάτων που έχουν απομονωθεί ώστε να επιτευχθεί η ενοποίηση με τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T easy. Στη συνέχεια, ακολούθησε η αντίδραση ενοποίησης και ο μετασχηματισμός κατάλληλων δεκτικών κυττάρων DH5a και η επίστρωσή τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, LB, παρουσία αντιβιοτικού επιλογής.

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλέχθηκαν τυχαία για το φυτό 10.1: πέντε αποικίες από τον AD 1.2, για το φυτό 10.2: i) έξι αποικίες από τον AD 1.2, ii) τρεις αποικίες από τον AD 2.1, iii) μια αποικία από τον AD 2.2 και για το φυτό 10.3: i) μια αποικία από τον AD 2.1, ii) δύο αποικίες από τον AD 3.1 και τέλος iii) πέντε αποικίες από τον AD 5.1 προκειμένου να ελεγχθούν για την παρουσία του κατάλληλου ενθέτου (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

Ο έλεγχος για την εισαγωγή του κατάλληλου ενθέτου έγινε με πέψη του πλασμιδιακού DNA κάθε αποικίας με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 3.4.3) όπου επιλέχθηκαν οι θετικές αποικίες για κάθε ένθετο, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του QIAprep Kit πρωτοκόλλου και τέλος, ακολούθησε αλληλούχιση για κάθε ένα από τα επιλεγμένα κλάσματα.



**Εικόνα 3.4.3:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων των αντιδράσεων πέψης με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Οι αριθμοί με το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τις αποικίες που επιλέχθηκαν για αλληλούχιση.

### 3.4.2 Προσδιορισμός της θέσης των ενθέσεων με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης.

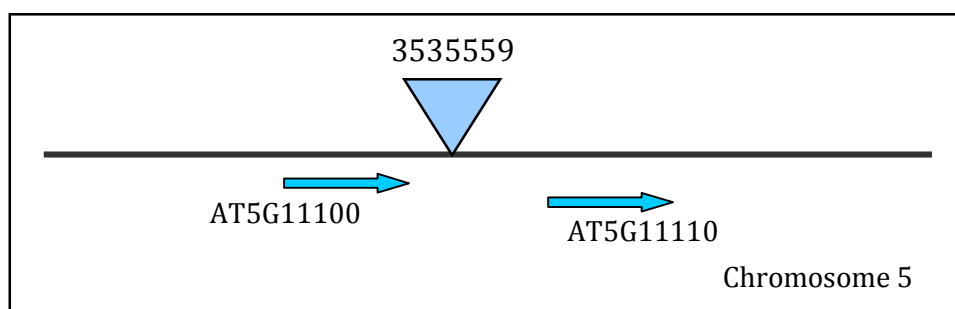
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των δειγμάτων DNA, τα οποία προήλθαν από την αντίδραση TAIL-PCR μετά την χρήση των διαφορετικών εκφυλισμένων εκκινητών αναλύθηκαν περαιτέρω. Στα πλαίσια αυτής της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν οι διαδικτυακοί τόποι TAIR και NCBI και τα πακέτα προγραμμάτων BLAST, reverse complement και multalin προκειμένου να προσδιοριστεί η ακριβής θέση των ενθέσεων στο γονιδίωμα του *Arabidopsis*.

Από τους επτά κλώνους που στάλθηκαν για αλληλούχιση μόνο ένας έδωσε αποτελέσματα για τον προσδιορισμό της θέσης μιας εκ των πέντε ενθέσεων που έχει η σειρά RacRNAi 10H σύμφωνα με τα αποτελέσματα του υβριδισμού. Οι ακολουθίες των υπολοίπων κλώνων κατά την στοίχισή τους δεν παρουσίασαν ομολογία με το γονιδιωματικό DNA του φυτού *Arabidopsis*. Ο κλώνος που παρουσίασε ομολογία με γνωστή ακολουθία, προήλθε από το φυτό 10.2 μετά από ενίσχυση με τον εκφυλισμένο εκκινητή AD 2.2. Στην εικόνα 3.4.4 δίνεται το αποτέλεσμα της αλληλούχισης του συγκεκριμένου κλώνου.

**10.2 AD 2.2**  
TAGTGGAGAAGCATAGGACCATGACAAATTTGGCAAGGACAAGATAGGGA  
GAGTGATAATGACATTTGACGCGAGTGATGTTAGAAGGAGAGTTTCAAGAG  
TGGTTTGAGTTAGATGGAGCTAAATCAGGGAAGCTTTGTGTCCATCTTAA  
ATGGACTCCTAGGCTTAAGCTCAGAGACGCCCTTTGATCATCTATCTTC  
TACTCTCAACACATTTACTTTGCTTATTTTTTGTTTTTTGTGTATAGTGT  
GCTGATGTTTGTACTTCTTGTCAATTGTTATCCTTTCTTCCTTGCCTTA  
GAAGAAACCAATATAAGTATTAATAATACACTTTTTCTGTTTATATTCAT  
TTTACTCACTTTACCTTCATTTGATTCGTAATTGTGAATGAATTTGTACT  
GAACTGATATTGGTTTTGGCCTTCAGGGGTGACCTTCTTTTCCTTTTAAA  
CTCTCCTACTTTAGATGATCATAATTAGCAGCAGCATGAACAAATATTGT  
CAAATAAAGGAAAAGTAATTAATTTGTGTAACAATTTGACGCTTAGACA  
ACTTAATAACACATTTGCGGACGTTTTTAATGTAAGTGGGGTGGTTTTTCTT  
TTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTG  
AGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGC

*Εικόνα 3.4.4: Αλληλουχία της πρώτης ένθεσης στη σειρά RNAi. Το μώβ χρώμα αντιπροσωπεύει τον εκφυλισμένο εκκινητή AD 2.2, το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει τον εκκινητή της T-DNA κατασκευής, το μπλέ χρώμα αντιστοιχεί σε τμήμα της αλληλουχίας της ένθεσης και η υπόλοιπη, λευκή περιοχή αντιστοιχεί στην άγνωστη θέση του γονιδιώματος στην οποία βρίσκεται η ένθεση.*

Η ένθεση εντοπίζεται στη θέση 3.535.559 του χρωμοσώματος 5 του φυτού *Arabidopsis thaliana* (εικόνα 3.4.5). Με βάση την στοίχιση, 338 βάσεις ανοδικά της θέσης ένθεσης βρίσκεται το 3' άκρο του γονιδίου AT5G11100 ενώ 666 βάσεις καθοδικά της θέσης αυτής βρίσκεται το γονίδιο AT5G11110. Σύμφωνα με τα δεδομένα του TAIR, το γονίδιο AT5G11100 δεν έχει κάποια συγκεκριμένη γονιδιακή λειτουργία σε αντίθεση με το γονίδιο AT5G11110 που κωδικοποιεί για μια συνθάση φωσφορικής σακχαρόζης, η οποία εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της σακχαρόζης.



**Εικόνα 3.4.5:** Αναπαράσταση της θέσης του γονιδιώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana* στην οποία βρίσκεται η ένθεση που τελικά χαρτογραφήθηκε. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5, στον κλώνο T5K6 και συγκεκριμένα στη θέση 3535559 του φυτού *Arabidopsis* η οποία δεν αντιστοιχεί σε γονίδιο.

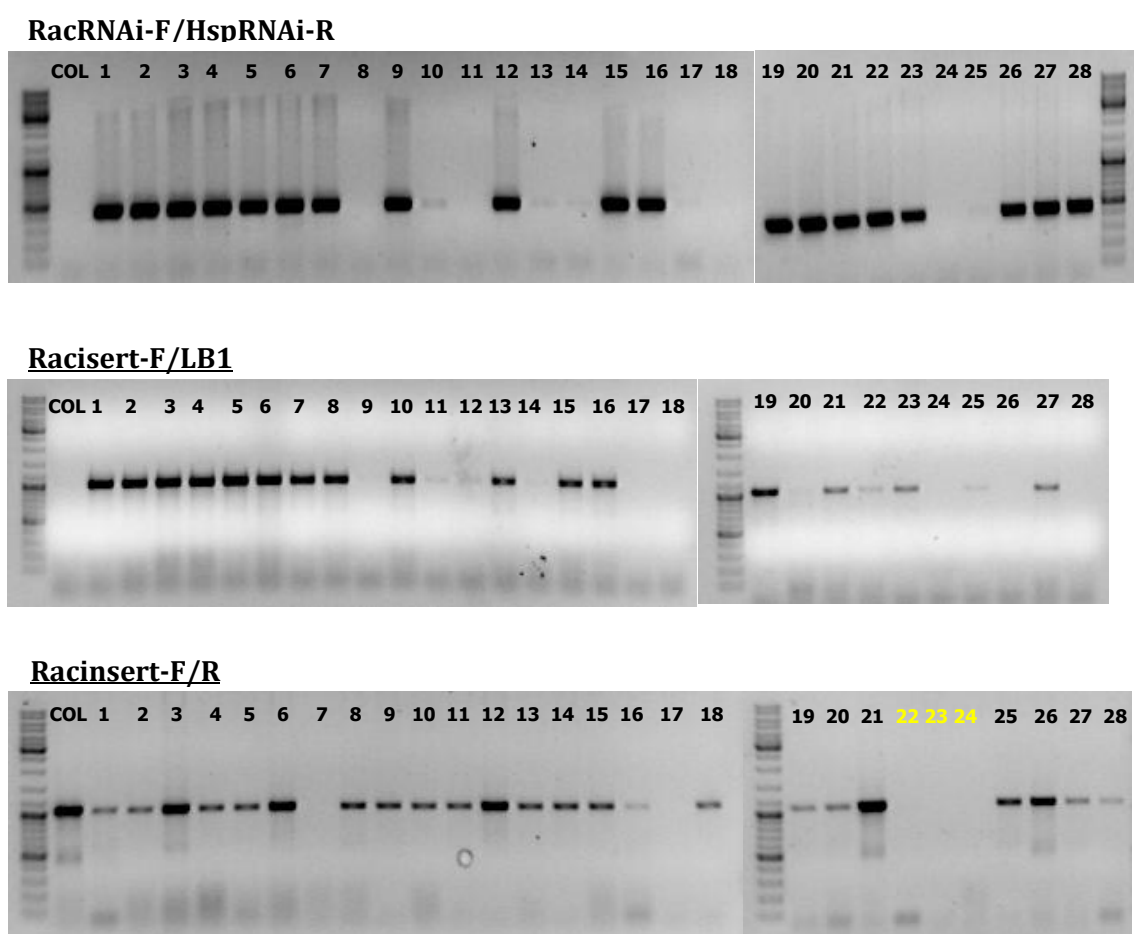
### **3.5 Μοριακός χαρακτηρισμός της σειράς RacRNAi 10H**

Ο μοριακός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε σε φυτά της σειράς RacRNAi 10H της F3 αλλά και της F4 γενιάς. Τα φυτά της F3 γενιάς είναι τα ίδια με αυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός που περιγράφηκε προηγουμένα. Συνολικά εξετάστηκαν 97 φυτά. Τα φυτά της F4 γενιάς που χαρακτηρίστηκαν αποτελούν απογόνους των φυτών Rac2, Rac26 και Rac10. Συνολικά εξετάστηκαν 28 φυτά.

Για τον μοριακό χαρακτηρισμό των φυτών πραγματοποιούνται τέσσερις αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη σειρά αντιδράσεων ενισχύεται το προϊόν των CERA1 εκκινητών ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι το DNA που έχει απομονωθεί είναι καλό. Στη δεύτερη σειρά, ενισχύεται το προϊόν των RacRNAi/Hsp90RNAi εκκινητών ώστε να διαχωρίσουμε τα φυτά που είναι μετασηματισμένα από τα φυτά του αγρίου τύπου. Στη τρίτη σειρά αντιδράσεων ενισχύεται το προϊόν των Racinsert/LB1 εκκινητών ώστε να

επιβεβαιώσουμε ποια φυτά από αυτά που είναι μετασηματισμένα φέρουν την ένθεση που έχει χαρτογραφηθεί. Τέλος, στη τέταρτη σειρά αντιδράσεων ενισχύθηκε το προϊόν των Racinsert F/R εκκινήτων (οι οποίοι είναι εκκινήτες που έχουν σχεδιαστεί εκατέρωθεν της περιοχής που εντοπίστηκε η ένθεση). Η αντίδραση αυτή σε συνδυασμό με την τρίτη αντίδραση υποδεικνύουν ποιά από τα φυτά είναι ομόζυγα και ποιά ετερόζυγα ως προς την χαρτογραφημένη ένθεση.

♦ F4 γενιά



*Εικόνα 3.5.1: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% των αντιδράσεων PCR για τον χαρακτηρισμό των φυτών της F4 γενιάς. Οι αριθμοί δηλώνουν τα φυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στον χαρακτηρισμό, 1-10 αντιπροσωπεύουν το Rac26, 11-15 αντιπροσωπεύουν το Rac10 και 19-28 αντιπροσωπεύουν το Rac2.*

Στον πίνακα 3.5.1 δίνονται αριθμητικά η ετεροζυγωτία-ομοζυγωτία καθώς και ο αριθμός των φυτών που αποτελούν ένδειξη για την ύπαρξη δεύτερης ένθεσης εκτός της ενθέσεως που έχει χαρτογραφηθεί παραπάνω με την αντίδραση TAIL – PCR. Ο χαρακτηρισμός γίνεται σε φυτά της F4 γενιάς, τα οποία αποτελούν απογόνους των φυτών Rac26, Rac2, Rac10.

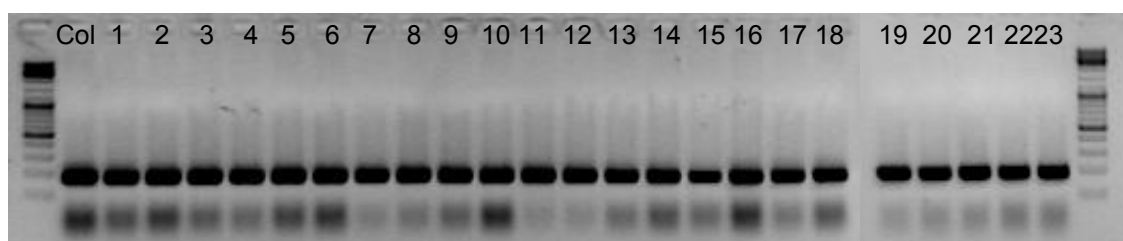
Χαρακτηρισμός της F4 γενιάς			
	Ετεροζυγωτία	Ομοζυγωτία	Ένδειξη 2ης ένθεσης
Rac26	8	1	1
Rac2	6	2	2
Rac10	5	-	1

*Πίνακας 3.5.1: Μοριακός χαρακτηρισμός φυτών της σειράς RacRNAi 10H F4 γενιάς ως προς την χαρτογραφημένη ένθεση.*

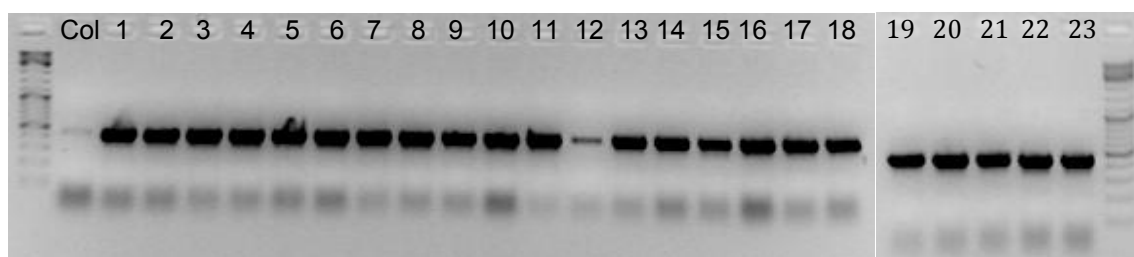
#### ♦ F3 γενιά

Για τον μοριακό χαρακτηρισμό της F3 γενιάς χρησιμοποιήθηκαν 97 φυτά συνολικά τα οποία αναπτύχθηκαν σε απλό θρεπτικό μέσο και σε συνθήκες όπως περιγράφονται στα υλικά και μέθοδοι. Στην εικόνα 3.5.2 δίνονται τα προϊόντα των τεσσάρων αντιδράσεων που είναι αναγκαίες για τον μοριακό χαρακτηρισμό 23 φυτών. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα 74 φυτά.

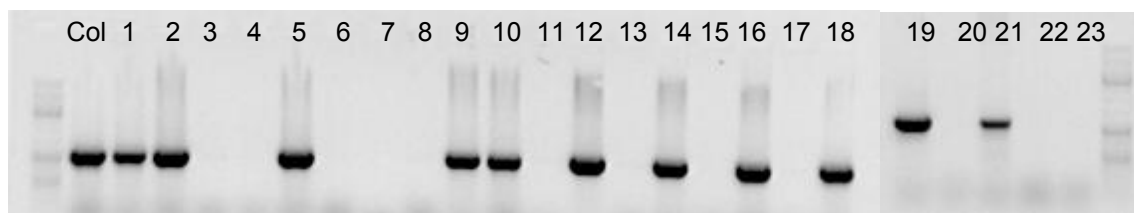
#### CERA1



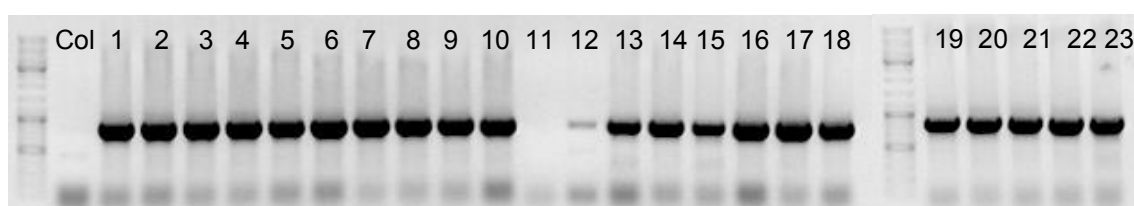
### RacRNAi-F/HspRNAi-R



### Racinsert-F/R



### Racisert-F/LB1



*Εικόνα 3.5.2: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των αντιδράσεων PCR για τον χαρακτηρισμό των φυτών της σειράς RacRNAi 10H της F3 γενιάς. Οι αριθμοί δηλώνουν τα φυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στον χαρακτηρισμό.*

Από τα φυτά της F3 γενιάς, μετασηματισμένα ήταν το 87,3%. Στα μετασηματισμένα φυτά έγινε έλεγχος ετεροζυγωτίας-ομόζυγωτίας ως προς την χαρτογραφημένη ένθεση. Τα αποτελέσματα από τις αντιδράσεις PCR έδειξαν πως υπάρχουν διακυμάνσεις ανάμεσα στις φαινοτυπικές κατηγορίες που περιγράφηκαν παράπανω. Πιο συγκεκριμένα, το 62,5% της 5<sup>ης</sup> ομάδας είναι ετεροζυγωτά ως προς την χαρτογραφημένη ένθεση, το 72,7% της 4<sup>ης</sup> ομάδας είναι ομόζυγα και το 61,6% της 3<sup>ης</sup> ομάδας είναι ετερόζυγα.



### **3.6 Ημιποσοστικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των Hsp90 γονιδίων αλλά και γονιδίων που σχετίζονται με την διαφοροποίηση και εγκαθίδρυση του ξύλου**

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της στοχευμένης αποσιώπησης των κυτταροπλασματικών *AtHsp90* γονιδίων υπό τον έλεγχο του RAC2/ROP7 προαγωγέα στην αρχιτεκτονική του βλαστού φυτά *Arabidopsis* αγρίου τύπου (Col-0) και RacRNAi αναπτύχθηκαν μέχρι την ωριμότητα και μελετήθηκαν οι βλαστοί τους. Η σημαντικότερη μεταξύ τους διαφορά εντοπίστηκε στην έλλειψη κεντρικού βλαστού στα RacRNAi φυτά. Ο φαινότυπος αυτός συνάδει με έλλειψη της γνωστότερης ανασχετικής αντιρροπίας δηλαδή της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής (επικόρη αύξηση) στα RacRNAi φυτά.

Είναι γνωστό ότι το AMB (Ακραίο Μερίστωμα Βλαστού/κορυφαίος οφθαλμός) των ανώτερων φυτών λειτουργεί ως σημείο συνεχούς οργανογένεσης, καθώς μια ομάδα πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων τροφοδοτεί τα αναπτυσσόμενα όργανα με νέα κύτταρα, προκειμένου να δημιουργηθεί η αρχιτεκτονική δομή που χαρακτηρίζει κάθε φυτικό είδος.

#### **◆ Προετοιμασία δειγμάτων για την ημι-ποσοτική PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν 10 μεριστώματα για κάθε δείγμα (col-0 και RACRNAi 10H) από τα οποία απομονώθηκε RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο εξαγωγής RNA. Το RNA καθαρίστηκε περαιτέρω με την RQ1 DNase (βλ. §2.2.3, υλικά και μέθοδοι). 1μl αναλύθηκε σε 1% πηκτή αγαρόζης.



Col-0/ολικό RNA

Μεριστώματα 14ημερών



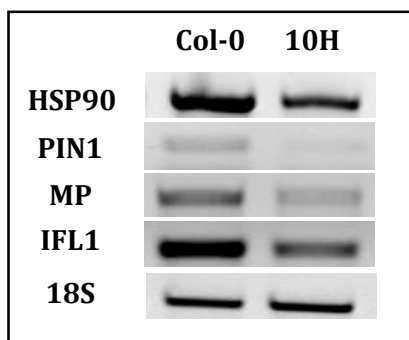
RACRNAi 10H/ολικό RNA

Μεριστώματα 14ημερών

Άλλο 1μl RNA χρησιμοποιήθηκε για την φωτομέτρηση και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Ακολούθησε RT-PCR για την οποία χρησιμοποιήθηκε 1.5μg ολικό RNA και στη συνέχεια ημι-ποσοτική PCR με σκοπό την μελέτη των γονιδίων Hsp90, PIN1, MP και IFL1

Τα αποτελέσματα της PCR (15μl) αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%:



**Εικόνα 3.6.** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων της PCR. Γίνεται παράθεση των αποτελεσμάτων της *pcr* των δειγμάτων, *col-0* και *RACRNAi 10H*. (Οι κύκλοι οι οποίοι δίνονται είναι 40c για τα γονίδια *HSP90*, *CLV1* και *WUS*, 31c για το γονίδιο *STM* και 25c για το γονίδιο *18s*.) Το γονίδιο **18s** ονομάζεται γονίδιο μάρτυρας και χρησιμοποιείται για να πιστοποιήσουμε ότι έχει γίνει σωστά η ποσοτικοποίηση του RNA. Εφόσον και στα δυο δείγματα φαίνεται οι ποσότητες να είναι ίδιες αυτό σημαίνει πως οι διαφορές στα αποτελέσματα των PCR για το ίδιο γονίδιο μεταξύ του μεταλλάγματος και του φυτού αγρίου τύπου δεν οφείλεται σε ανισοποσότητα της μήτρας που χρησιμοποιήθηκε.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατίθενται στην εικόνα 3.6, η αποσιώπηση των Hsp90 είναι γεγονός, αφού είναι εμφανής η μείωση στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ του Col-0 και του μεταλλάγματος RACRNAi 10H. Επίσης, μειωμένα επίπεδα έκφρασης φαίνεται να έχουν και τα γονίδια PIN1, MP και IFL1 τα οποία σύμφωνα με την βιβλιογραφία φαίνεται να εμπλέκονται στο ρυθμιστικό μονοπάτι σχηματισμού του ξύλου του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 4.1 Γενικά

Όλοι οι οργανισμοί κατά την διάρκεια της ζωής τους υφίστανται διαφόρων ειδών περιβαλλοντικές “πίεσεις”, τις οποίες καταφέρνουν να αντιμετωπίζουν μέσω της εξέλιξης ενός πλήθους φυσικών, βιοχημικών και αναπτυξιακών μηχανισμών. Ένας από τους καλύτερα μελετημένους μηχανισμούς αντίδρασης είναι η επαγωγή των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, (HSPs), μετά την αύξηση των φυσιολογικών επιπέδων θερμοκρασίας. Η θερμοεπαγόμενη απόκριση έχει δειχθεί πως είναι ένα καθολικό και εξελικτικά συντηρημένο φαινόμενο.

Μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών είναι η οικογένεια των HSP90. Αποτελούν υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες σε όλους τους οργανισμούς από τον άνθρωπο και τα φυτά μέχρι τα βακτήρια. Εκτός από το βασικό ρόλο του μοριακού συνοδού που τις χαρακτηρίζει, συμμετέχουν και σε ποικίλες λειτουργικές διαδικασίες όπως είναι η ορθή αναδίπλωση πολυπεπτιδίων, τα συστήματα μεταγωγής σήματος καθώς και ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου. Επίσης έχει δειχθεί πως έχουν άμεση επιρροή στην φαινοτυπική πλαστικότητα των οργανισμών. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν χαρακτηριστεί επτά μέλη που απαρτίζουν την πολυγονιδιακή οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών, τέσσερα κυτταροπλασματικά (*Hsp90.1*, *Hsp90.2*, *Hsp90.3*, *Hsp90.4*), ένα χλωροπλαστικό (*Hsp90.5*), ένα μιτοχονδριακό (*Hsp90.6*) και ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (*Hsp90.7*).

Πρόσφατες γενετικές και μοριακές μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη αλληλοεπικαλυπτόμενων ρυθμιστικών μηχανισμών για την λειτουργία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού και του δεσμικού κάμβιου. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν RNAi σειρές *Arabidopsis* που περιείχαν κατασκευή στοχευμένης αποσιώπησης των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών της HSP90 οικογένειας υπό την καθοδήγηση του ιστοειδικού *Rac2/Rop7* προαγωγέα. Η χρήση της συγκεκριμένης κατασκευής αποσκοπεί στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των Hsp90 σε συγκεκριμένους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια με στόχο την μελέτη του ρόλου του συστήματος στην ανάπτυξη του αγωγού ιστού. Όπως ήδη έχει αναφερθεί τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Rac2/Rop7* εντοπίζονται στο πρωτογενές και δευτερογενές ξύλωμα καθ'όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του φυτού.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας προσδιορίστηκε τόσο ο αριθμός των αντιγράφων της RNAi κατασκευής στο γονιδίωμα των διαγονιδιακών φυτών *Arabidopsis* όσο και η

ακριβής θέση ορισμένων από αυτές. Επίσης, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αποσιωπημένων σειρών και ημιποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των κυτταροπλασματικών Hsp90 γονιδίων καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται με την διαφοροποίηση και οργάνωση του αγωγού ιστού.

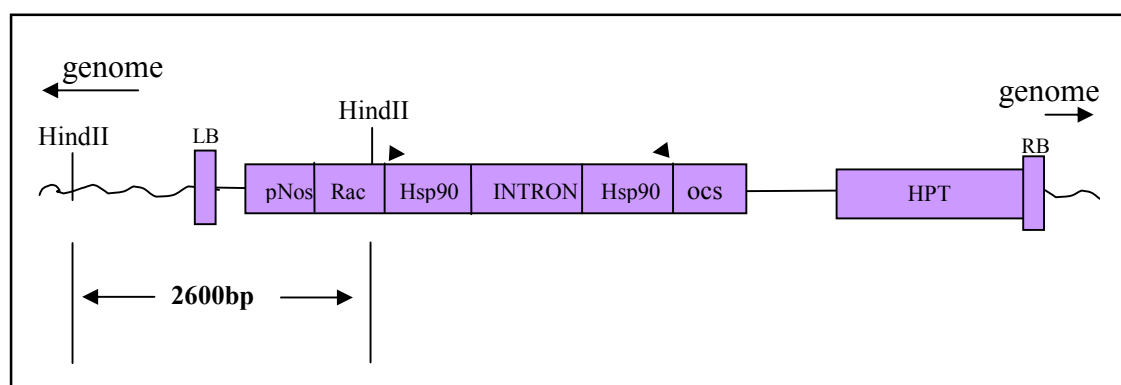
#### **4.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων του υβριδισμού κατά Southern και της Tail PCR**

Ο υβριδισμός κατά Southern χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων της RNAi κατασκευής που έχουν ενσωματωθεί στο γονιδίωμα της *Arabidopsis*. Το πρότυπο του υβριδισμού φαίνεται να δίνει επτά κύριες ζώνες που υβριδίζουν με τον σημασμένο ανιχνευτή. Ωστόσο από αυτές, η ζώνη που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 4,85 kbp είναι κοινή τόσο στον μάρτυρα (col-0) όσο και στην αποσιωπημένη σειρά RacRNAi 10H. Αυτό σημαίνει πως ο ανιχνευτής έχει υβριδίσει με το ενδογενές γονίδιο Rac2/Rop7, από το οποίο και προέρχεται, και όχι με τμήμα της κατασκευής αποσιώπησης. Η ζώνη που εμφανίζεται πιο ψηλά (πάνω από τα 10 kbp) από τις υπόλοιπες στο δείγμα 10H εξαιρείται αφού αποτελεί άκοπο γενωματικό DNA. Τελικά τα αποτελέσματα του υβριδισμού δείχνουν ότι στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* για την σειρά RacRNAi 10H υπάρχουν πέντε αντίγραφα της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi.

Για τον προσδιορισμό της θέσης ενσωμάτωσης των παραπάνω αντιγράφων της κατασκευής RacRNAi/Hsp90RNAi στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* επιλέχθηκε η προσέγγιση του TAIL-PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους ειδικούς και εκφυλισμένους εκκινητές. Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων της PCR, χαρτογραφήθηκε η μια από τις πέντε ενθέσεις και μάλιστα βρέθηκε πως έχει ενσωματωθεί στο 5<sup>ο</sup> χρωμόσωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει πως η ένθεση βρίσκεται στη θέση 3.535.559 του γονιδιώματος, όπου 338 βάσεις ανοδικά της θέσης αυτής βρίσκεται το 3' άκρο του γονιδίου AT5G11100 ενώ 666 βάσεις καθοδικά της θέσης αυτής βρίσκεται το γονίδιο AT5G11110. Σύμφωνα με τα δεδομένα του TAIR, το γονίδιο AT5G11100 δεν έχει κάποια συγκεκριμένη γονιδιακή λειτουργία σε αντίθεση με το γονίδιο AT5G11110 που κωδικοποιεί για μια συνθάση φωσφορικής σακχαρόζης, η οποία εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της σακχαρόζης (βλέπε Αποτελέσματα §3.3.2).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δυο προσεγγίσεων που χρησιμοποιήθηκαν (TAIL-PCR και υβριδισμός κατά Southern) καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ένθεση

που χαρτογραφήθηκε αντιστοιχεί στη ζώνη με το μοριακό μέγεθος 2,6 kbp. Στην εικόνα 4.2 φαίνεται αναλυτικά η κατασκευή αποσιώπησης με τις θέσεις που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού HindIII τόσο στο φυτικό γονιδίωμα όσο και μέσα στην T-DNA κατασκευή. Είναι λοιπόν προφανές ότι η ένθεση που χαρτογραφήθηκε αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη ζώνη που έδωσε το πρότυπο υβριδισμού μετά από πέψη του γονιδιώματος με το ένζυμο HindIII.



**Εικόνα 4.2:** Απεικόνιση της χαρτογραφημένης ένθεσης στο γονιδίωμα της *Arabidopsis*. Υποδεικνύονται τα σημεία τα οποία αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού HindIII καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης της πέψης που αναμένεται

### **4.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού των φυτών της RacRNAi 10H σειράς.**

Τα αποτελέσματα του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού της RacRNAi 10H σειράς υποδεικνύουν πως ακόμη και η μείωση των επιπέδων έκφρασης των Hsp90 μπορεί να επιφέρει σημαντική απόκλιση του φαινοτύπου από το φυσιολογικό. Χαρακτηριστικός είναι ο πλειοτροπικός φαινότυπος που παρουσιάζει η σειρά RacRNAi 10H, καθώς διακρίνονται πέντε φαινοτυπικές κατηγορίες, από τις οποίες το μικρότερο ποσοστό (3,3%) κατέχουν φυτά τα οποία παραμένουν στη βλαστητική φάση μέχρι την ηλικία των 32 ημερών και χαρακτηρίζονται από υψηλό αριθμό φύλλων ροζέτας. Το μεγαλύτερο ποσοστό (41,7%) κατέχει η φαινοτυπική κατηγορία που περιέχει φυτά τα οποία χαρακτηρίζονται από έλλειψη κυριαρχίας κορυφής, υψηλό αριθμό φύλλων ροζέτας και

υψηλό αριθμό πλάγιων ανθοφόρων βλαστών. Βέβαια κεντρικό βλαστό εμφανίζουν και τα φυτά της πέμπτης κατηγορίας με ποσοστό 26% τα οποία όμως χαρακτηρίζονται από ψηλά φυτά, με πολλαπλούς πλάγιους βλαστούς οι οποίοι είναι σχετικά λεπτοί και δεν εμφανίζουν ορθή στήριξη. Ωστόσο παρατηρούνται και δύο κατηγορίες που εμφανίζουν κεντρικό βλαστό με συνολικό ποσοστό 25% και χαρακτηρίζονται από μικρό αριθμό φύλλων ροζέτας και μικρό αριθμό πλάγιων βλαστών. Η βασική διαφορά των δύο αυτών κατηγοριών είναι το ύψος και ο αριθμός των διακλαδώσεων που φέρει ο κεντρικός ανθοφόρος βλαστός καθώς και ο αριθμός των πλάγιων βλαστών που εκφύονται μετά την άνθιση.

Περαιτέρω φαινότυποι που έχουν παρατηρηθεί και στις πέντε κατηγορίες είναι η παρουσία διπλών βλαστών ή ενός βλαστού ο οποίος στη συνέχεια χωρίζει σε δυο ή κάποιες φορές και σε περισσότερους βλαστούς. Παρατηρούνται φαινότυποι στις καρποταξίες των φυτών της *RacRNAi* 10H σειράς όπου υπάρχουν σπόρια τα οποία πεθαίνουν σε διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους ή είναι μη γονιμοποιημένα. Η μη επιτυχημένη γονιμοποίηση υποδεικνύει πιθανώς κάποιο πρόβλημα στη γύρη, ενώ το φαινόμενο της θνησιμότητας των εμβρύων που χαρακτηρίζει τη *RacRNAi* 10H σειρά θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαταραχή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κυτταρικού κύκλου και των μονοπατιών που καθορίζουν την κυτταρική ταυτότητα κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης. Ωστόσο τα δεδομένα αυτά μας επιτρέπουν να υποθέσουμε πως η παρουσία των HSP90 στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού είναι ιδιαίτερα σημαντική για την περαιτέρω ομαλή ανάπτυξή τους. Επίσης, παρατηρείται φαινότυπος στη ροζέτα, όπου ο αριθμός των φύλλων της αποσιωπημένης σειράς είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο αριθμό των φυτών *Col-0* στην ηλικία των 32 ημερών. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει κάποια συσχέτιση των HSP90 με τον χρόνο άνθισης των φυτών αφού σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο αριθμός των φύλλων ροζέτας αποτελεί χαρακτηριστικό της μετάβασης των φυτών από την βλαστητική φάση στην ανθική φάση. Τα φαινόμενα αυτά, στο σύνολό τους, αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινοτύπων λόγω έλλειψης/μείωσης των HSP90 πρωτεϊνών.

Είναι γνωστό πως οι HSP90 πρωτεΐνες σχετίζονται σημαντικά με την φαινοτυπική πλαστικότητα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Samakovli et al., 2007). Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από δεδομένα του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας, σύμφωνα με τα οποία μεταλλάγματα των HSP90 εμφανίζουν ποικιλομορφία στον φαινότυπο. Οι φαινότυποι περιλαμβάνουν μορφολογικές διαταραχές των σπόρων όπως, σπέρματα ρυτιδιασμένα και διαφορετικών σχημάτων αλλά και σπέρματα όπου το έμβρυο ή το ενδοσπέρμιο

απουσίαζαν, διαταραχές στο έμβρυο όπως, ελαττωματική ρίζα (π.χ. διαχωρισμός του κεντρικού κυλίνδρου), αδυναμία οργάνωσης του ηθμού και του ξύλου των κοτυληδόνων. Στο ώριμο φυτό οι διαταραχές στο φαινότυπο αφορούν κυρίως τη δομή του κορμού του φυτού εμπλέκοντας τις HSP90 σε αναπτυξιακά μονοπάτια που επηρεάζουν την μορφογένεση στα διαφορετικά της στάδια ( Samakovli, et al., 2007).

Η θεωρία που εξάγεται από αυτή την μελέτη είναι πως οι HSP90 πρωτεΐνες λειτουργούν στο φυτό ως οριοθέτες του φαινοτυπικού προτύπου δίνοντας έναν συγκεκριμένο πρότυπο για το φυτό *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0. Στα μεταλλάγματα όπου οι HSP90 “σβήνουν”, τα φαινοτυπικά όρια ανοίγουν και εμφανίζονται φαινότυποι οι οποίοι κατα κανόνα καταπιέζονται. Μάλιστα στην προσπάθεια δημιουργίας τετραπλών μεταλλάξεων των τεσσάρων κυτταροπλασματικών HSP90 εμφανίζεται θνησιμότητα δηλώνοντας την μεγάλη σημασία των θερμοεπαγόμενων αυτών πρωτεϊνών στην φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού.

Ο μοριακός χαρακτηρισμός φυτών της F3 και της F4 γενιάς της 10H σειράς ως προς την ένθεση που χαρτογραφήθηκε υπέδειξε ότι το 87,3% του συνόλου των φυτών της F3 γενιάς είναι μετασχηματισμένα. Τα διαγονιδιακά αυτά φυτά (που μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το συνολικό αριθμό ενθέσεων που περιέχουν) μπορεί να είναι είτε ετερόζυγα είτε ομόζυγα ως προς την χαρτογραφημένη ένθεση. Επίσης, στην F4 γενιά εντοπίζονται φυτά τα οποία είναι μετασχηματισμένα και εμφανίζουν τον φαινότυπο της 10H σειράς αλλά δεν φέρουν την χαρτογραφημένη ένθεση (αποτελέσματα, πίνακας 3.3.3α). Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με στοιχεία που προέκυψαν από διασταυρώσεις φυτών της 10H σειράς με φυτά αγρίου τύπου Col-0, που έχουν γίνει στο εργαστήριο αλλά δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, δεικνύουν πως ο φαινότυπος που κυριαρχεί δεν είναι αποτέλεσμα της θέσης της ένθεσης αλλά της έκφρασης της κατασκευής αποσιώπησης. Τον ισχυρισμό αυτό επιβεβαιώνει και ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός που έχει γίνει στις υπόλοιπες RacRNAi σειρές.

#### **4.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων του ημιποσοτικού PCR**

Προηγούμενα πειραματικά δεδομένα από την σειρά RacRNAi 10H αλλά και δεδομένα από πειράματα που βρίσκονται σε εξέλιξη δείχνουν πως τα φυτά λόγω της μείωσης των επιπέδων έκφρασης των κυτταροπλασματικών Hsp90 εμφανίζουν



προβλήματα στην ανάπτυξη του αγωγού ιστού. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι στις κοτυληδόνες φυτών της σειράς RacRNAi 10H ο φαινότυπος παρεκλίνει από το φυσιολογικό αφού εμφανίζονται ασυνέχειες και ανοίγματα των δεσμίδων αλλά και αποπροσανατολισμός των αγγείων από την ορθή κατεύθυνση. Επίσης υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως η οργάνωση και ο αριθμός των αγγειακών δεσμίδων στο υποκοτύλιο και τους βλαστούς παρεκλίνει κατά πολύ από το κανονικό. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με την έλλειψη κυριαρχίας κορυφής που εμφανίζει σε σημαντικό ποσοστό η αποσιωπημένη σειρά 10H αλλά και την ανάπτυξη πολυάριθμων φύλλων ροζέτας οδήγησαν στην μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στην ορμονική ρύθμιση του σχηματισμού του ξύλου στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Στα πλαίσια της μελέτης αυτής μελετήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στην αντίληψη και πολική μεταφορά της αυξίνης στο σχέδιο ανάπτυξης του αγωγού ιστού όπως το PINFORMED 1 (PIN1), το MONOPTEROS (MP) και το INTERFASCICULAR FIBERLESS/REVOLUTA (IFL1).

Το γονίδιο PIN1 κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα εκροής αυξίνης και εντοπίζεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη αλλά και το κυτταροπλάσμα. Φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως είναι η πολική μεταφορά της αυξίνης, η ορθή ανάπτυξη του βλαστού και της ρίζας καθώς και ο σχηματισμός του προτύπου του ξύλου και του ηθμού. Τα μεταλλάγματα του PIN1 εμφανίζουν δριμύς φαινοτύπους όσον αφορά την διαφοροποίηση των οργάνων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία “γυμνών” ανθοφόρων βλαστών λόγω έλλειψης ανθοφόρων μεριστωμάτων.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το γονίδιο PIN1 και το γονίδιο MP δρουν συνεργιστικά για την ορμονική ρύθμιση της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των οργάνων μέσω της αυξίνης (Mitsuhiro et al., 2002). Το γονίδιο MP κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ρυθμίζει την ανάπτυξη του αγωγού ιστού και τον σχηματισμό του κύριου άξονα του εμβρύου. Εντοπίζεται στην μεμβράνη και τον πυρήνα ενώ φαίνεται να εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως είναι ο σχηματισμός του προτύπου του ξύλου και του ηθμού, η ρύθμιση της ανάπτυξης και η απόκριση σε ερεθίσματα συγκεντρώσεων αυξίνης. Τα μεταλλάγματα του MP εμφανίζουν μοναδικούς φαινοτύπους στην ανάπτυξη του αγγειακού ιστού καθώς φαίνεται ότι σε όργανα όλων των αναπτυξιακών σταδίων ο αγωγός ιστός χαρακτηρίζεται από μείωση του αριθμού των δεσμίδων αλλά και ασυνέχειες του ιστού των αγγειακών δεσμίδων.

Από τα αποτελέσματα των PCR για τα επίπεδα της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων παρατηρείται πως και για τα δυο γονίδια τα επίπεδα έκφρασης είναι αρκετά

μειωμένα για την αποσιωπημένη σειρά 10H σε σύγκριση με τον μάρτυρα (col-0). Τα δεδομένα αυτά έρχονται να συμφωνήσουν με τον φαινότυπο της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής και την δυσλειτουργία που εμφανίζει το κεντρικό μερίστωμα. Μπορεί να εξαχθεί λοιπόν το συμπέρασμα πως η αποσιωπημένη RacRNAi 10H σειρά παρουσιάζει προβλήματα τόσο στην μεταφορά της αυξίνης όσο και στην αντίληψη των επιπέδων αυξίνης στο φυτό. Μάλιστα πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η εφαρμογή εξωγενούς αυξίνης σε PIN1 και MP μεταλλάγματα επάγει την διαφοροποίηση πλάγιων οργάνων αλλά όχι οργάνων από την κεντρική ζώνη μπλοκάροντας την ικανότητα των μεριστωματικών κυττάρων να αντιληφθούν το εξωγενές ερέθισμα (Vernoux et al., 2011). Υπάρχουν ισχυρές πειραματικές ενδείξεις (που δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη) που υποδεικνύουν ότι η RacRNAi 10H σειρά αποκρίνεται με παρόμοιο τρόπο σε τέτοιου είδους εξωγενή ερεθίσματα.

Το τρίτο γονίδιο που μελετήσαμε ήταν το IFL1 το οποίο ανήκει στην οικογένεια HD-ZIP III μεταγραφικών παραγόντων μαζί με άλλα τέσσερα μέλη. Έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τον αριθμό των προκαμβιακών κυττάρων μέσω της επαγωγής της διαφοροποίησης του ξύλου κατά την ανάπτυξη του αγωγού ιστού (Zhang et al., 2011). Εντοπίζεται στον πυρήνα και εμπλέκεται και αυτό μαζί με το PIN και το MP στον σχηματισμό του προτύπου του ξύλου και του ηθμού. Μεταλλάγματα του IFL1 εμφανίζουν δραματική μείωση του αριθμού των κυττάρων του αγωγού ιστού στις δεσμίδες αλλά και απόκλιση στην δευτερογενή ανάπτυξη του ξυλώματος. Στην RacRNAi 10H σειρά τα επίπεδα έκφρασης του IFL1 γονιδίου φαίνεται να είναι μειωμένα σε σύγκριση με το φυτό μάρτυρα (col-0).

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των τεσσάρων κυτταροπλασματικών Hsp90 πρωτεϊνών στους ιστούς έκφρασης του γονιδίου RAC επιφέρουν σημαντικές αποκλίσεις από τον φυσιολογικό φαινότυπο. Πιο συγκεκριμένα εντοπίζεται πρόβλημα στη λειτουργία του κεντρικού μεριστώματος, ένα γεγονός που εξάγεται από την έλλειψη κυριαρχίας κορυφής που χαρακτηρίζει το μετάλλαγμα στο μεγαλύτερο ποσοστό των φυτών. Επίσης, παρατηρείται ότι επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης κομβικών γονιδίων για την διαφοροποίηση και τον σχηματισμό του αγωγού ιστού τα οποία σε συνδυασμό με μακροσκοπικά και μικροσκοπικά αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία συνάδουν στην προβληματική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος των φυτών της RacRNAi 10H σειράς.

Ανακεφαλαιώνοντας τα μέχρι τώρα πειραματικά μας δεδομένα, συνηγορούν υπέρ της εμπλοκής των HSP90 τόσο σε μονοπάτια που διέπουν τα αρχικά στάδια ανάπτυξης

του *Arabidopsis* (εμβρυογένεση) όσο και σε δίκτυα που σχετίζονται με τα πρότυπα ανάπτυξης διαφορετικών οστών που απαρτίζουν το σώμα του ώριμου φυτού.

## 5. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Anderson J.V, Li Q.B, Haskell D.W and Guy C.L. 1994.** Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum- luminal 70kD heat shock cognate gene and expression of 70kD heat shock genes during cold acclimation. *Plant Physiology* 104, 1359-1370.
- **Bagasra O & Prilliman K.R. (2004).** RNA interference: The molecular immune system. *Journal of Molecular Histology* 35: 545–553.
- **Bartel Bonnie and David P. Bartel. (2003).** MicroRNAs: At the Root of Plant Development, *Plant Physiology, Vol. 132, pp. 709–717*
- **Baulcombe David. (2004).** RNA silencing in plants. *Nature* 431.
- **Beissinger M and Buchner J. 1998.** How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379, 245-259.
- **Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl J.L. 2004.** Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 7, 391-399
- **Boston R. S, Viitanen P. V, Vierling E. 1996.** Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology* 32, 191-222.
- **Brembu T., Winge P. and Bones M. (2005).** The small GTPase AtRAC2/ROP7 is specifically expressed during late stages of xylem differentiation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 419, pp. 2465-2476
- **Bruce Veit. (2009).** Hormone mediated regulation of the shoot apical Meristem. *Plant Mol Biol* 69:397-408.
- **Buchner J. 1999.** Hsp90 & Co. - a holding for folding. *TIBS* 24: 136-141
- **Bukau B and Horwich A.L. 1998.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- **Carrington J. C., Kasschau K. D & Johansen L.K. (2001).** Activation and Suppression of RNA Silencing by Plant Viruses. *Virology* 281: 1-5.
- **Chen Q, Osteryoung K, Vierling E. (1994).** A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes in vivo and in organelle. *J. Bio. Chem.* 269, 13216-13223.
- **Chicas A & Macino G. (2001).** Characteristics of post – transcriptional gene silencing. *EMBO reports* 2: 992 – 996.

- **Craig E.A., Gambill B.D., Nelson R.J. 1993.** Heat shock proteins: Molecular chaperons of protein biogenesis. *Microbiological Rev.* 57: 402-414.
- **Dettmer J., Elo A., Helariutta Y. (2008).** Hormone interactions during vascular development. *Plant Mol Biol*, 69:347–360.
- **Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M and Buchner J. (1997).** Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal* 16, 221-229.
- **Ellis R. J. (1999).** Molecular chaperones: Pathways and networks, *Current Biology*, 9:R137–R139
- **Ellis, R. J. (1996).** Stress proteins as molecular chaperones. In Van Eden, W. and Young, D.B. (eds), *Stress Proteins in Medicine. Marcel Decker*: 1–26.
- **Frydman J. (2001).** Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:603–647.
- **Haralampidis Kosmas, Milioni Dimitra, Rigas Stamatis, and Hatzopoulos Polydefkis. 2002.** Combinatorial Interaction of Cis Elements Specifies the Expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 Gene1. *Plant Physiology*, Vol. 129, 1138–1149
- **Hendrick, J. and Hartl, F.U. (1993).** Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62, 349-384
- **Jakob Ursula, Gaestel Matthias, Engel Katrin, and Buchner Johannes. (1993).** Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones, *The Journal Of Biological Chemistry Vol. 268*, pp. 1517-152
- **Jones – Rhoades M. W, Bartel D.P & Bartel B. (2006).** MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 19-53.
- **Krishna P, Gloor G. (2001).** The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell stress and chaperones* 6, 238-246.
- **Lewin B. (2004).** Genes VIII. Published by Pearson Education Inc. Upper Saddle River, NJ 07458.
- **Liang P. and MacRae T. H. (1997).** Molecular chaperones and the cytoskeleton, *Journal of Cell Science* 110, 1431-1440
- **Lindquist S. and Craig E.A. (1988).** The heat shock proteins, *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-77

- **Matthew W. Jones-Rhoades, David P. Bartel, and Bonnie Bartel. (2006).** MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:19–53
- **Mayer M.P and Bukau B. (1999).** Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr. Biol.* 9, R322-R325.
- **Miernyk A. Jan. (1999).** Protein Folding in the Plant Cell, *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 695–703
- **Milioni Dimitra and Hatzopoulos Polydefkis. 1997.** Genomic organization of hsp90 gene family in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 35: 955–961
- **Morimoto. R.I. (1998).** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperons and negative regulators. *Genes and Development* 12: 3788-3796.
- **Nieto-Sotelo J, Kannan K.B, Martinez L.M and Segal C. (1999).** Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* 230, 187-195.
- **Nover L. (1991).** Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton (Fd).
- **Nover L, Scharf K.D, Gagliardi D, Vergne P, Czarnicka-Verner E and Gurley WB. (1996).** The Hsf world: Classification properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chap.1: 215-223.*
- **Ori N., Eshed Y., Chuck G., Bowman L. J. and Hake S. (2000).** Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* 127, 5523-5532 .
- **Parsell D.A and Lindquist S. (1993).** The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
- **Picard D. (2002).** Heat shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1640-1648.
- **Prasinou Constantinos, Krampis Konstantinos, Samakovli Despina and Hatzopoulos Polydefkis. 2004.** Tight regulation of expression of two Arabidopsis cytosolic Hsp90 genes during embryo development. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, 633–644.
- **Prasinou Constantinos, Haralampidis Kosmas, Milioni Dimitra, Samakovli Despina, Krampis Konstantinos, Hatzopoulos Polydefkis. 2008.** Complexity of Hsp90 in organelle targeting. *Plant Mol Biol*,

- **Pratt WB, Krishna P, Olsen LJ. (2001).** Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci* 6:54–58
- **Pratt W.B and Toft D.O. (2003).** Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery, *Experimental Biology and Medicine review*.
- **Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E., and Lindquist, S. (2000).** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 479–492.
- **Queitsch C, Sangster T.A and Lindquist S. (2002).** Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417, 618-624.
- **Richter K. and Buchner,J. (2001).** Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.*, 188:281–290.
- **Rutherford S.L & Lindquist S. (1998).** Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-342.
- **Saibil R. Helen (2008).** Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology*, 18:35–42
- **Salathia N & Queitsch C. (2007).** Molecular mechanisms of canalization: Hsp90 and beyond. *J. Biosci.* 32: 457–463.
- **Samakovli Despina, Thanou Aggeliki, Valmas Charalampos and Hatzopoulos Polydefkis. 2007.** Hsp90 canalizes developmental perturbation. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, 3513–3524
- **Sangster T.A, Queitsch C. (2005).** The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current opinion in Plant Biology* 8, 86-92.
- **Sangster T. A, Salathia N, Undurraga S, Milo R , Schellenberg K, Lindquist S & Queitsch C. (2008).** HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *PNAS* 105: 2963–2968
- **Scheibel T, Siegmund HI, Jaenicke R, Ganz P, Lilie H, Buchner J. (1999).** The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1297–1302.
- **Schirmer E., Glover J., Singer M., Lindquist S. (1996).** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol 21, 289-296

- **Schoffl F, Prandl R, Reindl A. (1998).** Regulation of the heat shock response, *Plant Physiology* 117, 1135-1141.
- **Schoffl F, Prandl R. (1999).** Derepression of the heat shock protein synthesis in transgenic plants. In: Smallwood M, Calvert C, Bowles D, eds. Plant responses to environmental stress. *Oxford: Bios Scientific Publishers Limited* 65-73.
- **Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K. (2003).** HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:11777–11782.
- **Vierling E. (1991).** The roles of heat shock proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:579-620
- **Waddington C H .(1953)** Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7: 118–126.
- **Waddington C H. (1956)** Genetic assimilation of the bithorax phenotype. *Evolution* 10: 1–13.
- **Waters E, Lee G, Veirling E. (1996).** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Biol.*47:325–338.
- **Waterhouse P.M, Wang M.B and Lough T. (2001).** Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- **Wang Wangxia, Vinocur Basia, Shoseyov,Oded Altman Arie. (2004).** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science, Vol.9 No.5*
- **Wang M – Bo & Metzlaff. M. (2005).** RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 216-222.
- **Young J. C, Moarefi I & Hartl F.U. (2001).** Hsp90 : a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* 154: 267-274.
- **Zhang Xiaodong, Beuron Fabienne and Freemont S. Paul (2002).** Machinery of protein folding and unfolding, *Current Opinion in Structural Biology*, 12:231–238
- **Μαργαριτοπούλου Θ. (2007).** Η κυτταρική τοποθέτηση της Hsp90. Πτυχιακή μελέτη. Γ.Π.Α, Εργ. Μοριακής Βιολογίας.
- **Φλεμετάκης Ε και Κατινάκης Π. (2006).** Σημειώσεις στην τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA. Γ.Π.Α
- **Χατζόπουλος Π. (2004).** Βιοτεχνολογία φυτών. Αθήνα : Εκδόσεις Έμβρυο. ISBN : 960-8002-08-7