

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

**Μοριακές αλληλεπιδράσεις του Hsp90  
συστήματος κατά την βλαστική και  
αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης  
του φυτού *Arabidopsis thaliana***

**Μεταπτυχιακή διατριβή  
Μέγκουλα Παναγιώτα**



**ΑΘΗΝΑ 2014**

Η ανάθεση του θέματος της παρούσας εργασίας έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ (συνεδρία 13<sup>η</sup> /07-06-13) κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

1. Μηλιώνη Δήμητρα, Επικ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
2. Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)
3. Ρήγας Σταμάτης, Επικ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εν λόγω μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών» του Τμήματος Βιοτεχνολογίας. Με την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επικ. Καθηγήτρια Δήμητρα Μηλιώνη για την άψογη συνεργασία μας, το συνεχές ενδιαφέρον και την πολύπλευρη υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας μου. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με δέχτηκε στο εργαστήριό του.

Επιπλέον, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα, τη βοήθεια και την πολύτιμη παρέα τους στη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Ιδιαίτερα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαργαριτοπούλου Θεώνη για την υπερπολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε, τόσο σε γενικό επίπεδο όσο και στο κομμάτι των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Ακολουθως, πολλά ευχαριστώ οφείλω στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δέσποινα Σαμακοβλή για τις ζωτικής σημασίας υποδείξεις και βοήθεια που μου παρείχε, ειδικότερα στο κομμάτι των ιστοχημικών αναλύσεων GUS. Δε θα μπορούσα ακόμη να ξεχάσω τις συμφοιτήτριες, συναδέλφους και πάνω από όλα φίλες μου Τόνια Λυριωτάκη και Κατερίνα Σκουφά για την ηθική τους υποστήριξη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου εκφράζοντας την απέραντη ευγνωμοσύνη μου για την υποστήριξη και την αγάπη τους που υπήρξαν καταλυτικές για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες HSP90 αποτελούν ένα υψηλά συντηρημένο και άκρως εξειδικευμένο σύστημα μοριακού συνοδού το οποίο διευκολύνει την ωρίμανση ενός καθορισμένου συνόλου πρωτεϊνών κατέχοντας σημαντικούς βιολογικούς ρόλους. Τα υποστρώματα αυτά αποτελούνται κυρίως από πρωτεϊνικές κινάσες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών που καταλαμβάνουν κεντρικές θέσεις σε πολλά βιολογικά δίκτυα καθώς εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής ομοιόστασης, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση. Επιπλέον, το σύστημα HSP90 αποτελεί ένα κομβικό στοιχείο της πρωτεόστασης η οποία ελέγχει πολλά σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, οι HSP90 αποτελούν μόρια-κλειδιά για την ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών ουσιαστικών για την επιβίωση ενός οργανισμού και ασκούν ισχυρές επιδράσεις στην βιολογία των οργανισμών, τις ασθένειες και τις εξελικτικές διαδικασίες. Το σύστημα HSP90 ενέχεται επίσης στον φαινοτυπικό καθορισμό, ενώ παράλληλα ανοίγει νέους ορίζοντες για την θεραπεία του καρκίνου, αποτελώντας η ίδια η πρωτεΐνη φαρμακευτικό στόχο.

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, με τη χρήση της τεχνολογικής προσέγγισης BiFC αποδείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν με τον κομβικό ρυθμιστή της άνθησης TFL2 αλλά όχι με τον ρυθμιστή της ανάπτυξης των πετάλων RBE. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν αποσιωπημένες σειρές *Arabidopsis thaliana* (RacRNAi και LFY/RNAi) που χαρακτηρίζονται από μειωμένα επίπεδα έκφρασης των *Hsp90* σε συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια, προκειμένου να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *WUS* και *CYCLINB1;1*. Ιστοχημικές αναλύσεις GUS υπέδειξαν την απουσία έκφρασης του γονιδίου *WUS* σε φυτάρια τριών και πέντε ημερών RacRNAi (σειρά 10H) και την παρουσία έκφρασής του σε έμβρυα της ίδιας σειράς, υποδεικνύοντας την πιθανή ύπαρξη ενός αναπτυξιακού παραθύρου κατά το οποίο το γονίδιο *WUS* παύει να εκφράζεται στα φυτά αυτά. Αντίστοιχη πειραματική προσέγγιση σε έμβρυα φυτών LFY/RNAi (σειρά 10.141) υπέδειξε την απουσία έκφρασης του γονιδίου *WUS*. Επιπλέον, ιστοχημικές GUS αναλύσεις έδειξαν πως στα φυτά RacRNAi 10H το πρότυπο της έκφρασης του γονιδίου *CYCLINB1;1* παρουσιάζει διακυμάνσεις.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα δεδομένα μας συνηγορούν υπέρ της εμπλοκής των HSP90 τόσο σε μονοπάτια που διέπουν τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του *Arabidopsis* (εμβρυογένεση) όσο και στη διαδικασία της άνθησης.



## ABSTRACT

HSP90 proteins consist a highly conserved and extremely specialized molecular chaperone system, which facilitates the maturation of a defined group of proteins, playing crucial biological roles. These substrates are enriched in protein kinases and steroid hormone receptors occupying central positions in many biological networks as they are involved in the control of cellular homeostasis, proliferation, differentiation and apoptosis. Furthermore, the HSP90 chaperone system forms a proteostasis hub that controls numerous important signalling pathways in eukaryotic cells. As a consequence, HSP90 regulates a plethora of essential cellular functions for the survival of organisms and exerts marked effects on normal biology, disease and evolutionary processes. Moreover, HSP90 capacitates phenotypic variation while widens the horizons for the cure of cancer, being the molecule itself a pharmaceutical target.

Objectives of the current master thesis were a) the analysis of the HSP90 protein interactions with two proteins involving in flowering, TFL2 and RBE and b) the study of WUS, a central player in shoot meristem regulation, and CYCLINB1;1 promoters transcriptional activity.

We used the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay to demonstrate *in planta* interactions among TFL2, HSP90.1 and HSP90.3. However, no interactions were observed between RBE, HSP90.1 and HSP90.3.

Transgenic *Arabidopsis* RNAi plants (lines 10H and 10.141) harbouring a transcriptional fusion between WUS and the reporter gene (b-glucuronidase) GUS, were analysed for GUS expression in 3, 5 day-old seedlings and in mature flowers. In 10H line, no GUS expression was detected in 3 and 5 day-old seedlings. However, the WUS promoter was able specifically to direct GUS expression in developing seeds of RNAi 10H plants but not in RNAi 10.141 plants. Furthermore, transgenic *Arabidopsis* RNAi plants (line 10H) expressing a transcriptional fusion between CYCLINB1;1 promoter and the reporter gene GUS, were analysed for GUS expression in 3, 5 day-old seedlings and in mature flowers. The CYCLINB1;1 promoter was active in all tissues tested.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones)</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSPs) και απόκριση στο θερμικό στρες</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (HSPs)</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Η οικογένεια HSP100 (Clp).....	14
1.3.2 Η οικογένεια HSP70.....	15
1.3.3 Η οικογένεια HSP60.....	16
1.3.4 Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (sHSPs).....	16
1.3.5 Η οικογένεια HSP90.....	17
1.3.5.α Φυλογένεση της HSP90.....	19
1.3.5.β Κυτταρική τοποθέτηση.....	20
1.3.5.γ Δομή της HSP90 πρωτεΐνης.....	20
1.3.5.δ Βοηθητικά συνοδά μόρια της HSP90 .....	21
1.3.5.ε Πρωτεΐνες-υποστρώματα της HSP90 (client proteins) .....	22
1.3.5.στ HSP90 και εξέλιξη .....	24
<b>1.4. Άνθηση</b> .....	<b>24</b>
1.4.1 Μονοπάτια άνθησης .....	28
1.4.1.α Μονοπάτι φωτοπεριόδου μακράς ημέρας.....	29
1.4.1.β Αυτόνομο μονοπάτι.....	31
1.4.1.γ Μονοπάτι εαρινοποίησης.....	32
1.4.1.δ Μονοπάτι γιββερελλινών .....	33
1.4.2 Το μοντέλο ABCε .....	34
1.4.3 Το γονίδιο <i>RABBIT EARS (RBE)</i> .....	36
1.4.4 Η ομάδα Polycomb (PcG)-Το γονίδιο <i>TERMINAL FLOWER2 (TFL2)</i> .....	39
1.4.4.α Συμπύκνωση της χρωματίνης και γονιδιακή ρύθμιση-Η ομάδα Polycomb (PcG) .....	39
1.4.4.β Το γονίδιο <i>TERMINAL FLOWER2 (TFL2)</i> .....	40
<b>1.5 Το γονίδιο <i>WUSCHEL (WUS)</i> και η εμπλοκή του στην λειτουργία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού (AMB)</b> .....	<b>43</b>
1.5.1 Το ακραίο μερίστωμα του βλαστού (AMB).....	43
1.5.2 Το γονίδιο <i>WUSCHEL (WUS)</i> .....	45
<b>2. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού</b> .....	<b>51</b>
2.1.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS Murashige And Skoog) .....	51
2.1.2 Εγκατάσταση και ανάπτυξη φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> και <i>Nicotiana tabacum</i> .....	51
<b>2.2 Τύποι φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω εργασία</b> .....	<b>51</b>
<b>2.3 Βακτηριακά στελέχη</b> .....	<b>51</b>
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	51
2.3.1.α Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων για μετασηματισμό.....	52
2.3.1.β Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	52
2.3.1.γ Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασηματισμού (Transform efficiency) .....	52
2.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	53
2.3.2.α Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με τη μέθοδο freeze – thaw.....	54
2.3.3 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα .....	54

<b>2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....</b>	<b>54</b>
2.4.1 Αλκαλική λύση πλασμιδιακού DNA (Alkaline miniprep).....	54
<b>2.5 Πέψη Νουκλεϊνικών Οξέων με Ένζυμα Περιορισμού .....</b>	<b>55</b>
<b>2.6 Ανάλυση Νουκλεϊνικών Οξέων σε Πηκτή Αγαρόζης.....</b>	<b>56</b>
<b>2.7 Απομόνωση και Καθαρισμός Κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....</b>	<b>56</b>
<b>2.8 Ενοποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα .....</b>	<b>56</b>
2.8.1 Διαδικασία A-tailing .....	56
2.8.2 Αντίδραση Ενοποίησης.....	57
<b>2.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....</b>	<b>57</b>
<b>2.10 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)-Split GFP σε φύλλα καπνού (<i>Nicotiana tabacum</i>).....</b>	<b>59</b>
2.10.1 Πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) .....	59
2.10.2 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).....	61
2.10.3 Split GFP σε φύλλα καπνού ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) .....	62
<b>2.11 Στερέωση και χρώση GUS σε φυτικούς ιστούς .....</b>	<b>62</b>
<b>2.12 Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν.....</b>	<b>63</b>
2.12.1 ρSPYNE/ρSPYCE .....	63
2.12.2 ρGEM-T Easy .....	64
2.12.3 ρGBKT7 .....	64
<b>2.13 Διαλύματα και Θρεπτικά Μέσα.....</b>	<b>65</b>
2.13.1 Θρεπτικά διαλύματα φυτών .....	65
2.13.2 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης .....	65
2.13.3 Διαλύματα μετασχηματισμού και καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων.....	65
2.13.4 Διαλύματα χειρισμού και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.....	66
2.13.5 Διαλύματα αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) .....	66
2.13.6 Διάλυμα αεροδιήθησης (Infiltration media) .....	66
2.13.7 Διαλύματα στερέωσης και χρώσης ιστών.....	66
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.....</b>	<b>68</b>
3.1.1 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών <i>in planta</i> .....	68
3.1.1.α Κατασκευές για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυτταροπλασματικών HSP90 με πρωτεΐνες άνθησης, με το σύστημα SPLIT-GFP .....	69
3.1.1.β Έλεγχος αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 με τις πρωτεΐνες TFL2 και RBE .....	70
3.1.2 Κλωνοποιήσεις του γονιδίου <i>TFL2</i> .....	74
3.1.2.α Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>TFL2</i> στον φορέα ρGBKT7 .....	74
3.1.2.β Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>TFL2</i> στον φορέα ρGEM-T Easy .....	78
<b>3.2 Ιστοχημική ανάλυση με την χρήση του συστήματος αναφοράς GUS.....</b>	<b>79</b>
3.2.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου <i>WUSCHEL (WUS)</i> σε φυτάρια της αποσιωπημένης σειράς RacRNAi 10H .....	80
3.2.2 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου <i>WUSCHEL (WUS)</i> σε έμβρυα αποσιωπημένων σειρών <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	85
3.2.3 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου <i>CYCLINB1:1</i> σε φυτάρια της αποσιωπημένης σειράς RacRNAi 10H.....	88
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>95</b>
<b>4.1 Οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TFL2.....</b>	<b>96</b>
<b>4.2 Οι HSP90 πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RBE .....</b>	<b>97</b>

<b>4.3 Ιστοχημική μελέτη έκφρασης γονιδίων με την χρήση του συστήματος αναφοράς GUS.....</b>	<b>98</b>
4.3.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου <i>WUSCHEL</i> ( <i>WUS</i> ) .....	98
4.3.1.α Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου <i>WUS</i> σε έμβρυα LFY/RNAi .....	100
4.3.2 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου <i>CYCLINB1:1</i> ..	100
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>102</b>
<b>6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>120</b>



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones)

Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο ευέλικτα και δομικά πολύπλοκα βιολογικά μακρομόρια τα οποία συμμετέχουν σχεδόν σε κάθε βιολογική διαδικασία. Τα κύτταρα εκφράζουν πολλές χιλιάδες διαφορετικά είδη πρωτεϊνών, τα οποία βιοσυντίθενται από τα ριβοσώματα, ως γραμμικές αλυσίδες από αρκετές χιλιάδες αμινοξέα. Για να είναι βιολογικά λειτουργικές, αυτές οι αλυσίδες πρέπει να αναδιπλωθούν στην «φυσική τους διαμόρφωση», ένα σύνολο μερικών στενά συνδεδεμένων τρισδιάστατων δομών (Dobson et al., 1998; Bartlett and Radford, 2009).

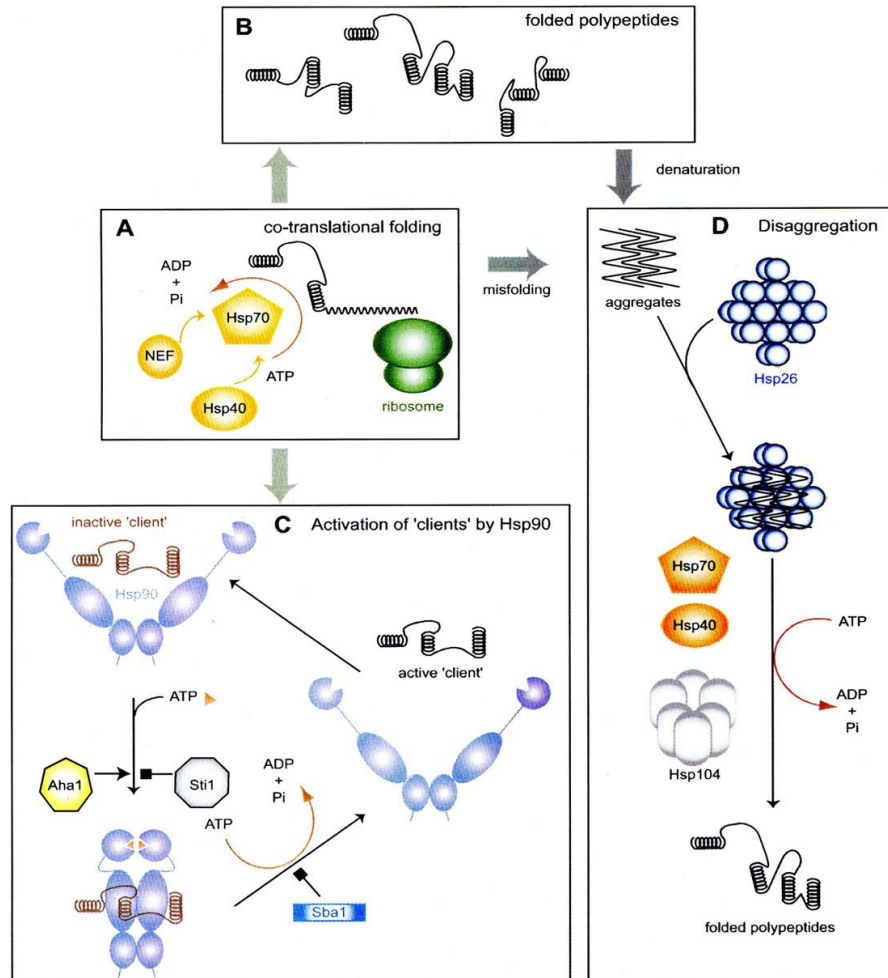
Το πώς οι πρωτεΐνες αποκτούν τις σύνθετες και δυναμικές δομές που απαιτούνται για τη λειτουργία τους είναι ένα από τα θεμελιώδη ερωτήματα της βιολογίας. Οι πληροφορίες για την τελική τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών εμπεριέχονται μέσα στα γραμμικά πολυπεπτίδια που συντίθενται από το mRNA στα ριβοσώματα. Η απόκτηση της τεταρτοταγούς δομής μπορεί να γίνεται χωρίς βοήθεια *in vitro*, όμως στα ζωντανά κύτταρα η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη καθώς το ενδοκυτταρικό περιβάλλον παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων μακρομορίων. Μολονότι, η αλληλουχία των αμινοξέων και οι νόμοι της θερμοδυναμικής καθορίζουν την φυσική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης, το συνωστισμένο κυτταρικό περιβάλλον επηρεάζει σημαντικά την αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Ως αποτέλεσμα αυτού του συνωστισμού των μακρομορίων, τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια και οι πρωτεΐνες με χαμηλή σταθερότητα που έχουν χάσει την αναδίπλωσή τους εκθέτουν τις υδρόφοβες περιοχές τους, διακινδυνεύοντας διαρκώς να αναδιπλωθούν λανθασμένα και να σχηματίσουν συσσωματώματα (Zou et al., 2008). Τόσο η λανθασμένη αναδίπλωση όσο και η δημιουργία συσσωματωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε πολλά προβλήματα σε ένα κύτταρο. Προκειμένου τα κύτταρα να αποφύγουν τον κίνδυνο της συσσωμάτωσης και κατακρήμνισης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών τους, έχουν αναπτύξει ένα σύνθετο σύστημα μοριακών συνοδών, το οποίο βοηθά στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων καθώς αυτά βγαίνουν από το ριβόσωμα (Εικόνα 1.1) (Morimoto, 1994; Young et al., 2004).

Ως μοριακοί συνοδοί ορίζονται οι πρωτεΐνες, οι οποίες μέσω ελεγχόμενης δέσμευσης και απελευθέρωσης αλληλεπιδρούν, σταθεροποιούν ή βοηθούν μια μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη να αποκτήσει μια τριτοταγή δομή, ώστε να είναι βιολογικά ενεργή. Οι πρωτεΐνες μοριακές συνοδοί συμμετέχουν σε μια πλειάδα ενδοκυτταρικών λειτουργιών όπως η *de novo* αναδίπλωση, η επαναδίπλωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, η μεταφορά πρωτεϊνών σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα και η πρωτεολυτική αποδόμηση των πρωτεϊνών (Εικόνα 1.1) (Katschinski, 2004).

Κατά την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια ανέρχονται από το ριβόσωμα έχοντας τις υδρόφοβες περιοχές τους εκτεθειμένες οι οποίες τελικά θα προστατευτούν στο εσωτερικό της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν τις εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές των αρτιγενών πολυπεπτιδίων δεσμεύοντας τις προσωρινά ενώ στην συνέχεια τις απελευθερώνουν, Έτσι αποτρέπουν τις μη κατάλληλες αλληλεπιδράσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη δημιουργία συσσωματωμάτων (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Αυτός ο κύκλος δράσης των μοριακών συνοδών συνήθως οδηγείται από την υδρόλυση του ATP, Κατά την μετάφραση, οι μοριακοί συνοδοί συνεισφέρουν στην ωρίμανση των αρτιγενών αλυσίδων είτε με το να βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση, συγκροτώντας έτσι πολυμερή σύμπλοκα, είτε με την μετατόπιση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων στα διάφορα ενδοκυτταρικά οργανίδια (Voisine et al., 2010).

Οι μοριακοί συνοδοί δεν προσδένονται στα υποστρώματά τους μόνο για να εμποδίσουν άμεσα τη διαμοριακή συσσωμάτωση με το να προστατεύουν τις περιοχές των μη-διαλυτών πολυπεπτιδικών αλυσίδων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Επιπλέον αποτρέπουν ή αντιστρέφουν την ενδομοριακή αναδίπλωση (Doyle et al., 2007). Συγκεκριμένοι μοριακοί συνοδοί, όπως οι οικογένειες των HSP100 και Clp έχουν τη ικανότητα να "ξετυλίγουν" πρωτεΐνες ή να διαταράσσουν μικρά πρωτεϊνικά

συσσωματώματα με έναν ATP-εξαρτώμενο μηχανισμό (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Εκτός από τις γενικών καθηκόντων μοριακές συνοδούς, πολλές μοριακές συνοδοί εμπλέκονται στην εξαιρετικά ειδική αναδίπλωση μεμονωμένων πρωτεϊνών ή την συναρμολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλοκών.



**Εικόνα 1.1:** Απλουστευμένη απεικόνιση ενός τμήματος των μηχανισμών των μοριακών συνοδών που λειτουργούν στο κυτταρόπλασμα. (A) Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών μέσω της Hsp70 πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την μετάφραση, παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEFs) και η Hsp40 διευκολύνουν αυτή τη διαδικασία. (B) Μετά την πρωτεϊνοσύνθεση είναι τα ομόλογα της Hsp70 προωθούν την αναδίπλωση σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα. (C) Ορισμένες πρωτεΐνες παρουσιάζονται σε μεγάλο βαθμό αναδιπλωμένες αν και σε ανενεργή κατάσταση, το σύμπλοκο της Hsp90, η ATP-εξαρτώμενη δράση του οποίου οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης-υποστρώματος. συν-συνοδοί ενεργούν ως προσαρμογείς μεταξύ των Hsp70 και Hsp90, με συγκεκριμένες συν-συνοδοί να ενεργούν ως αναστολείς (π.χ. Sti1) ή παράγοντες διέγερσης (π.χ. Aha1) της Hsp90 ATPασης. (D) Η λανθασμένη αναδίπλωση και το κυτταρικό στρες οδηγούν σε παρεκκλίνουσες πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε συσσωμάτωση. Η Hsp104 καταλύει την αποσυσσωμάτωση μια διαδικασία που διευκολύνεται από τις Hsp 70, 40 και 26.

Οι μοριακοί συνοδοί δεν καθορίζουν την τεταρτοταγή δομή των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών αλλά τις βοηθούν να βρουν τη δομή τους πιο αποτελεσματικά. Ωστόσο, μόνο λίγες συμπεριφέρονται ως αληθινοί καταλύτες αυξάνοντας το ρυθμό της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών οι οποίες και καλούνται «καταλύτες αναδίπλωσης» (folding catalysts). Η

πλειοψηφία των μοριακών συνοδών αποτρέπει τις μη σωστές αλληλεπιδράσεις των νεο-συντιθέμενων πρωτεϊνών και τους επιτρέπει την αυθόρμητη αναδίπλωση. Ο μηχανισμός αυτός αυξάνει την απόδοση, αλλά όχι το ρυθμό της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (Hartl, 1996).

Ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών και η διατήρηση της ομοιόστασης του πρωτεώματος (πρωτεόσταση) είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία των κυττάρων ενός οργανισμού (Powers, 2009). Ο όρος αυτός αναφέρεται σε ένα πολύπλοκο δίκτυο βιολογικών μονοπατιών με σκοπό να διατηρεί τη δυναμική ισορροπία και την διαμορφωτική ακεραιότητα του πρωτεώματος, και να παρέχει προσαρμογή στις περιβαλλοντικές μεταβολές (Balch et al., 2008). Το δίκτυο αυτό περιλαμβάνει αρκετές εκατοντάδες πρωτεΐνες, όπως, κυρίως, μοριακές συνοδούς και ρυθμιστές τους, οι οποίες βοηθούν στην *de novo* αναδίπλωση ή επαναδίπλωση, καθώς και το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) και το σύστημα αυτοφαγίας, που διαμεσολαβούν για την έγκαιρη απομάκρυνση των συσσωματωμένων και των μη αναστρέψιμα λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Ανεπάρκειες στην πρωτεόσταση έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν στην εκδήλωση πολλών προβλημάτων στα κύτταρα κι ολόκληρο τον οργανισμό (Hartl et al., 2011).

Οι δύο τύποι μοριακών συνοδών που έχουν εκτενώς μελετηθεί είναι: α) οι HSP70 μοριακοί συνοδοί που εμπλέκονται σε μια ποικιλία διαδικασιών του κυττάρου όπως στη σωστή αναδίπλωση και συναρμολόγηση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, στον έλεγχο πρωτεϊνών που φέρουν λάθος στην αναδίπλωση, αλλά και πολυπεπτιδίων που έχουν δημιουργήσει συσσωματώματα, καθώς και στη μετακίνηση πρωτεϊνών δια μέσω μεμβρανών. Η δράση των HSP70 βασίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με υδρόφοβες πρωτεϊνικές περιοχές και απαιτείται η παρουσία/υδρόλυση του ATP (Mayer and Bukau, 1999), 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 (Hendrick and Hartl, 1993).

Τα μόρια κλειδιά του συστήματος των μοριακών συνοδών έχουν διατηρηθεί από τους προκαρυωτικούς έως τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εντούτοις, σε σύγκριση με τα βακτήρια, οι πρωτεΐνες που απαιτούν αναδίπλωση σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο είναι περισσότερες και πιο πολύπλοκες. Για να ανταποκριθούν στις αυξημένες και πολύπλοκότερες απαιτήσεις αναδίπλωσης των πρωτεϊνών τους, τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν διευρύνει το σύστημα μοριακών συνοδών που υπάρχει στα βακτήρια. Εντούτοις, οι βασικές αρχές των συστημάτων των μοριακών συνοδών είναι οι ίδιες τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Αν και ο ακριβής αριθμός των διαφόρων μοριακών συνοδών στο κύτταρο είναι άγνωστος, είναι σαφές ότι ένα σημαντικό μέρος των συνολικών επιπέδων των κυτταρικών πρωτεϊνών είναι αφιερωμένο στην διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (Taipale et al., 2010).

## **1.2 Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSPs) και απόκριση στο θερμικό στρες**

Τα κύτταρα όλων των οργανισμών συνεχώς υφίστανται μια σειρά από βλάβες που οφείλονται είτε σε εσωτερικούς, είτε σε εξωτερικούς φυσικο-χημικούς και βιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες. Για το λόγο αυτό, τα ζωντανά συστήματα έχουν αναπτύξει μια σειρά από στρατηγικές για την επιδιόρθωση αυτών των βλαβών και/ή για την εξάλειψη των παραγόντων υπεύθυνων για τη βλάβη (Vabulas et al., 2010).

Ως κυτταρικό στρες ορίζεται η οποιαδήποτε διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου. Ένας ιδιαίτερα μελετημένος μηχανισμός προσαρμογής κυτταρικού στρες είναι αυτός που επάγεται από το θερμικό σοκ (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. Οι πρωτεΐνες είναι δυναμικά

πολυμερή που μπορούν να αφήσουν την διαλυτή διαμόρφωσή τους στο χώρο και να σχηματίσουν δομές που βρίσκονται οριακά μεταξύ της διαλυτής κατάστασης και αυτής των συσσωματωμάτων. Με την αλλαγή της θερμοκρασίας προσφέρεται στο σύστημα η κατάλληλη ενέργεια για την μετατόπιση της παραπάνω ισορροπίας σε μία κατάσταση σχεδόν πλήρους διαταραχής της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα είναι ο αυξημένος κίνδυνος συσσωμάτωσης τους μέσω της έκθεσης των υδρόφοβων περιοχών τους (Vabulas et al., 2010).

Η απόκριση στο θερμικό στρες αποτελεί έναν σηματοδοτικό μηχανισμό που βοηθά στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης κάτω από συνθήκες στρες. Ανάμεσα στις αλλαγές που παρατηρούνται στην κυτταρική δραστηριότητα και φυσιολογία, το πιο σημαντικό γεγονός είναι η συσσώρευση των άκρως συντηρημένων πρωτεϊνών, που ονομάζονται θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins, HSPs) (Schelesinger et al., 1982; Argy et al., 2007). Πειράματα σε διαφορετικά είδη έχουν δείξει ότι η αυξημένη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να προστατεύσει τους οργανισμούς ενάντια στις απαγορευτικές για την επιβίωσή τους θερμοκρασίες και την επαγόμενη από το στρες βλάβη καθώς επάγουν τη θερμοανθεκτικότητα εξισορροπώντας την ομοιόσταση των κυττάρων. Η επαγωγή της έκφρασής τους κάτω από δυσμενείς συνθήκες, οι οποίες προκαλούν αλλοιώσεις (μετουσίωση) στις ανώτερες δομές των πρωτεϊνών, οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες προστατεύουν το κύτταρο από τις τοξικές επιδράσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως κατέχουν έναν εξαιρετικά διατηρημένο ρόλο στην ομοιόσταση μεταξύ όλων των ειδών Lindquist and Craig, 1988).

Η σύνθεση ειδικών πρωτεϊνών μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες αναφέρθηκε πρώτα σε κύτταρα της *Drosophila* (Tissieres et al., 1974), αλλά δεν άργησε να διαπιστωθεί ότι η κυτταρική αυτή απόκριση είναι κοινή σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια έως και τους ανώτερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς (Nover and Scharf, 1997). Η απόκριση αυτή συνίσταται στην επιλεκτική μεταγραφή των θερμοεπαγόμενων γονιδίων (*HSP genes*), τα οποία πριν ήταν ανενεργά ή είχαν μικρή ενεργότητα και στην ταυτόχρονη καταστολή της μεταγραφής των υπολοίπων γονιδίων. Η μείωση αυτή της μεταφραστικής δραστηριότητας οδηγεί σε μία σημαντική εξοικονόμηση ενέργειας, η οποία κατά κύριο λόγο καταναλώνεται στη μετάφραση και εκτιμάται ότι είναι μεγαλύτερη του 50% της συνολικής ενέργειας του κυττάρου. Τα νέα mRNAs που συντίθενται μετά το θερμικό στρες μεταφράζονται σε θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες. Όταν η θερμοκρασία επανέλθει στα φυσιολογικά για τον οργανισμό επίπεδα, τα *HSP* γονίδια είτε σταματούν να μεταγράφονται είτε τα επίπεδα της έκφρασής τους μειώνονται, ενώ αρχίζουν να μεταγράφονται και πάλι τα υπόλοιπα γονίδια των κυττάρων. Η θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται μέγιστη επαγωγή της σύνθεσης των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών εξαρτάται από τη φυσιολογική θερμοκρασία του κάθε οργανισμού (Holcik and Sonenberg, 2005).

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες δεν εμφανίζονται στα κύτταρα μόνο λόγω αύξησης της θερμοκρασίας. Η σύνθεσή τους επάγεται και από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα βαρέα μέταλλα, αφυδάτωση, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και η ανοξία, καθώς επίσης και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε περιπτώσεις μόλυνσεων και τραυματισμού των ιστών. Επιπλέον, πολλά από τα μέλη της οικογένειας των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται συγγενείς θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat shock cognates – HSCs), εκφράζονται και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αύξησης και παίζουν ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως ο κυτταρικός κύκλος και η κυτταρική διαφοροποίηση (Feige and Polla, 1994; Nollen and Morimoto, 2002).

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες είναι άφθονες στα κύτταρα. Το ποσοστό των πρωτεϊνών αυτών φτάνει έως και 5-10% των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων, ανάλογα με τη στρεσογόνο κατάστασή τους. Εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και σε

διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Οι HSPs μπορούν να συμβάλλουν με δυο τρόπους στην αντιμετώπιση των στρεσογόνων καταστάσεων: Πρώτον, μερικές από αυτές είτε διαθέτουν πρωτεολυτική ικανότητα είτε εμπλέκονται στη διαδικασία της πρωτεόλυσης, προάγοντας 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 σοκ. Δεύτερον, οι HSPs λειτουργούν και ως μοριακοί συνοδοί, προάγοντας τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και παρεμποδίζοντας την κατακρήμνιση τους (Parsell and Lindquist, 1993; Ellis, 2007). Έτσι είναι υπεύθυνες τόσο για τη διατήρηση των ανωτέρων δομών άλλων πρωτεϊνών, όσο και για τη σωστή διαμόρφωσή τους κατά τη βιοσύνθεσή τους και τη μεταφορά τους στα οργανίδια. Η δράση τους ως μοριακοί συνοδοί οφείλεται στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών οι οποίες, είτε κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσής τους, είτε λόγω άλλων παραγόντων, βρίσκονται εκτεθειμένες (Hartl and Hayer-Hartl 2002; Ellis and van der Vies, 1991).

Η πρωταρχική όμως λειτουργία των HSPs είναι η δράση τους ως μοριακές συνοδοί (π.χ., Hsp70 και HSP90) συνεπώς είναι ικανές να αναγνωρίζουν και δεσμεύουν εκκολλαπτόμενη πολυπεπτιδικές αλυσίδες και μερικώς διπλωμένα ενδιάμεσα των πρωτεϊνών, αποτρέποντας έτσι την συσσωμάτωση και λανθασμένης αναδίπλωσής τους, ή ως τσαπερονίνες (HSP60), που διευκολύνουν άμεσα την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Pratt and Toft, 2003; Riggs et al., 2003).

Με βάση τις λειτουργίες αυτές συνεπάγεται ότι οι HSPs αλληλεπιδρούν με μία πολύ μεγάλη ποικιλία κυτταρικών πρωτεϊνών και συνεπώς είναι σημαντικά συστατικά των κυτταρικών δικτύων (Csermely 2004). Αυτό αντικατοπτρίζεται επίσης από τον ρόλο τους, ιδίως της HSP90, στην εξέλιξη (Rutherford και Lindquist 1998).

Μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα θερμοεπαγόμενα γονίδια εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης κατά την διάρκεια της εξέλιξης, όχι μόνο σε ότι αφορά την κωδική αλληλουχία των πρωτεϊνών τους αλλά και στις ρυθμιστικές τους αλληλουχίες (Lindquist, 1986). Το γεγονός αυτό, καθώς και το ότι οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες απαντώνται στα κύτταρα κάτω από ποικίλες συνθήκες, υποδηλώνουν τη σημασία των πρωτεϊνών αυτών (Becker and Craig, 1994).

Σύμφωνα με το παραπάνω, οι HSPs έχουν κάποιες κοινές λειτουργικές περιοχές: μία περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων αδενίνης που δεσμεύει και υδρολύει ATP και μία περιοχή δέσμευσης πεπτιδίων που δεσμεύει εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα των πρωτεϊνών-υποστρώματων (Fink, 1999; Jaattela, 1999). Η δέσμευση του ATP πυροδοτεί μια κρίσιμη διαμορφωτική αλλαγή που οδηγεί στην απελευθέρωση της δεσμευμένης πρωτεΐνης-υποστρώματος (Tsan and Gao, 2009; McCarty et al., 1995). Όπως η αναδίπλωση των περισσότερων νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο κύτταρο απαιτεί αλληλεπιδράσεις με μία ή περισσότερες μοριακές συνοδούς, οι θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών των HSPs είναι ευρείας εξειδίκευσης, και η δέσμευση διευκολύνεται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Grageron and Gottesman, 1994). Έτσι, είναι αναμενόμενο οι HSPs να δεσμεύουν και άλλα μη πρωτεϊνικά μόρια με εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι οι HSP60, HSP70, HSP90 και gp96 δεσμεύουν τις βακτηριακές ενδοτοζίνες LPS (Reed et al., 2003; Habich et al., 2005).

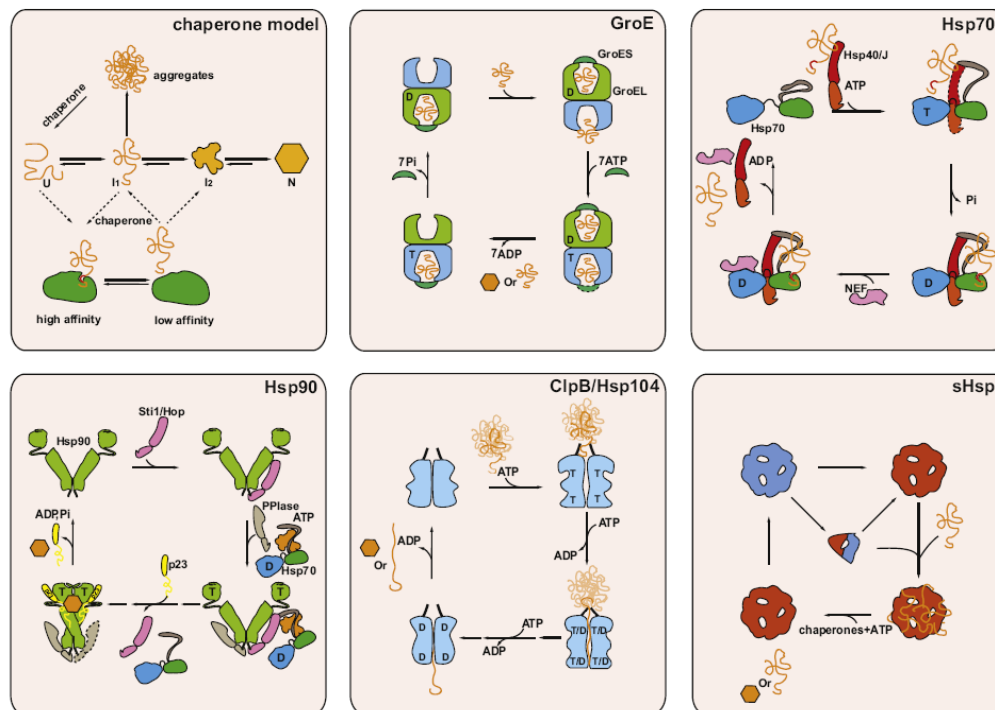
Η μεταγραφή των θερμοεπαγόμενων γονιδίων μετά από θερμικό στρες οφείλεται πρωταρχικά στη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα του θερμικού στρες (HSF) σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή τους (Pirkkala et al., 2001). Οι ρυθμιστικές αυτές αλληλουχίες ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στη θερμότητα (HSEs) οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί και εμφανίζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους (Weber et al., 1997).



Η επαγωγή των HSPs πρέπει να υφίσταται αυστηρό έλεγχο δεδομένου ότι η συνεχής παρουσία τους θα διατάραζε την πρωτεϊνική ομοιοσταση και τις ενδοκυττάρειες λειτουργίες, επιφέροντας μη φυσιολογικό έλεγχο της αύξησης και πιθανώς κυτταρικό θάνατο. Η επαγωγή της έκφρασής τους είναι ραγδαία, καθώς μετατρέπονται στο επικρατέστερο προϊόν της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσα στα 15 πρώτα λεπτά από την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες (Lindquist, 1986). Η αυξημένη έκφραση των HSPs ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα όπως η μεταγραφή, η σταθερότητα και η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης των *HSP* mRNAs. Μόνο σε δύο περιπτώσεις, στα είδη *Hydra oligactis* και *Trematomus bernacchii* δεν έχει παρατηρηθεί απόκριση στο θερμικό στρες (Katschinski, 2004).

### 1.3 Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (HSPs)

Στα κύτταρα υπάρχουν αρκετές διαφορετικές κλάσεις θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, τα οποία σχηματίζουν συνεργαζόμενα μονοπάτια και δίκτυα. Οι Heat Shock Proteins αποτελούν μία υπεροικογένεια πρωτεϊνών υψηλά συντηρημένων κατά την εξέλιξη και έχουν προταθεί αρκετές ταξινομήσεις για την κατηγοριοποίησή τους (Al-Whaibi, 2011). Στο μεγαλύτερο όμως μέρος της βιβλιογραφίας οι HSPs ταξινομούνται σε υπο-οικογένειες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, το οποίο προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδης παρουσία SDS (SDS-PAGE). Έτσι διακρίνονται σε οικογένειες των 100 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 60 kDa και των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών sHps (12-43 kDa) (Εικόνα 1.2) (Hartl et al., 2011).



Εικόνα 1.2: Οι οικογένειες των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.

#### 1.3.1 Η οικογένεια HSP100 (Clp)

Η οικογένεια HSP100 είναι μια κατηγορία μοριακών συνοδών που εμπλέκονται σε μια ευρεία ποικιλία βασικών μεταβολικών διεργασιών σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά είδη που συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση/αποσυναρμολόγηση

πρωτεϊνικών σύμπλοκων ή/και πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων χρησιμοποιώντας την ενέργεια του ATP (Burton and Baker, 2005; Sauer et al, 2004). Η οικογένεια HSP100 περιλαμβάνει μία διατηρημένη ομάδα AAA+ ATPασών με μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 78 και 100 kDa (Richter et al., 2010; Nover and Scharf, 1997). Στα βακτήρια περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX, ClpY, και άλλα. Παρόμοιες πρωτεΐνες βρίσκονται και στα φυτά, τις ζύμες και τα θηλαστικά (Barends et al., 2010). Ομόλογα των HSP100 στα θηλαστικά συμπεριλαμβάνουν και τις p97/Cdc48 (οι οποίες συμμετέχουν σε μονοπάτια ποιοτικού ελέγχου πρωτεϊνών) και ATPάσες που συσχετίζονται με το πρωτεάσωμα (Schrader et al., 2009). Επιπλέον, το *Arabidopsis thaliana* όπως και όλα τα ανώτερα φυτά περιέχουν ομόλογα των ClpB, ClpC και ClpD υποοικογενειών στο κυτταρόπλασμα, τους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, ενώ δεν υπάρχουν αναγνωρισμένα μέλη των ClpA και ClpE (Clarke et al., 2005).

Οι πρωτεΐνες HSP100 υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες με βάση τον αριθμό των περιοχών AAA+. Η κατηγορία 1 των HSP100 πρωτεϊνών, είναι εξαμερείς δομές που περιέχουν δύο θέσεις δεσμεύσεως νουκλεοτιδίων σε κάθε μονομερές. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι βακτηριακές πρωτεΐνες ClpA, ClpB, ClpC και ClpE καθώς και ομολογά τους στα φυτά (συμπεριλαμβανομένης της ClpD) και στη ζύμη (HSP104). Οι πρωτεΐνες της κατηγορίας 2 των HSP100 περιέχουν μόνο μία μονάδα σύνδεσης νουκλεοτιδίων, και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Clp X και ClpY (Lee et al., 2007; Martin et al., 2005).

Οι πρωτεΐνες HSP100 πιστεύεται πως τραβούν τις λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μέσα από τον κεντρικό πόρο του εξαμερούς δακτυλίου σε μια ξεδιπλωμένη κατάσταση, επιτρέποντας στις πρωτεΐνες να επαναδιπλωθούν (Doyle et al, 2007; Schaurp et al., 2007). Ο ακριβής μηχανισμός αναδίπλωσης μέσω των HSP100 είναι ακόμα ασαφής. Επιπλέον, οι HSP100 της κατηγορίας 1 συνεισφέρουν στην αποσυσσωμάτωση των πρωτεϊνών (Goloubinoff et al., 1999).

### 1.3.2 Η οικογένεια HSP70

Μία από τις υψηλότερα συντηρημένες μοριακές συνοδούς είναι οι πρωτεΐνες HSP70. Όλες οι HSP70 έχουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους. Η προκαρυωτική, που ονομάζεται DnaK, εμφανίζει περίπου 60% ομολογία με την αλληλουχία της ευκαρυωτικής HSP70, οι οποίες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στο οργανίδια, όπως το ER, τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (Richter et al., 2010).

Οι HSP70 αποτελούνται από δύο διακριτές περιοχές, μία πολύ συντηρημένη αμινοτελική περιοχή περίπου 44 kDa στην οποία υπάρχει μία θέση δέσμευσης για ATP και έχει ασθενή ενεργότητα ATPάσης και μια λιγότερο συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή 27 kDa περίπου μέσω της οποίας οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύουν τα υποστρώματά τους (Bukau and Horwich, 1998). Η θέση δέσμευσης φιλοξενεί ένα τμήμα από επτά, υδρόφοβων κυρίως, καταλοίπων αμινοξέων (Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Zhu et al., 1996).

Ο ATP-εξαρτώμενος κύκλος αντίδρασης των HSP70 ρυθμίζεται από συμπαράγοντες. Οι μεγαλύτερες κατηγορίες των HSP70 συμπαράγοντων είναι η οικογένεια των HSP40 (επίσης γνωστή ως DnaJ) και κάποιοι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (Kamringa and Craig, 2010; Mayer, 2010).

Η οικογένεια HSP70 είναι αρκετά ποικιλόμορφη και περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες που εκφράζονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αύξησης καθώς και πρωτεΐνες που επάγονται ύστερα από στρες. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να επιτελούν επικαλυπτόμενες ή μοναδικές λειτουργίες σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και είναι βασικοί παράγοντες αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και ελέγχου της πρωτεόστασης (Fink 1999; Mayer and Bukau, 2005). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής εμπλέκονται σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διεργασιών. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι HSP70s εμπλέκονται στην de novo αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στη μεταφορά πρωτεϊνών από και

προς τον πυρήνα και στη συγκρότηση των ριβοσωμάτων. Σε συνθήκες καταπόνησης εμποδίζουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που έχουν χάσει την αναδίπλωσή τους ενώ μπορούν ακόμη και να αναδιπλώσουν τις συσσωματωμένες πρωτεΐνες (Su and Li, 2008; Mayer and Bukau, 2005).

### 1.3.3 Η οικογένεια HSP60

Η οικογένεια HSP60s, που ονομάζονται επίσης τσαπερονίνες, περιλαμβάνει δύο ομάδες μορίων (Kaufman, 1999): Οι τσαπερονίνες της ομάδας I (γνωστές ως HSP60s στους ευκαρυώτες και GroEL στα βακτήρια) έχουν επταμελείς δακτυλίους, απαντώνται στα βακτήρια, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, και συνεργάζονται με ομοεπταμερές συμπαράγοντες της οικογένειας πρωτεϊνών Hsp10 (GroES στα βακτήρια) (Horwich and Fenton, 2009; Spiess et al., 2004). Οι τσαπερονίνες της ομάδας II (TRiC, επίσης γνωστή ως CCT) βρίσκονται στα αρχαία και στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτών έχουν συνήθως οκταμελείς δακτυλίους και είναι ανεξάρτητοι από τους Hsp10 παράγοντες (Munoz et al., 2011; Douglas et al., 2011).

Οι τσαπερονίνες συγκροτούν μεγάλα σύμπλοκα διπλών δακτυλίων των 800 kDa που περικλείουν μία κεντρική κοιλότητα. Κάθε δακτύλιος περιέχει μία κεντρική κοιλότητα στην οποία εγκλείονται πρωτεΐνες με λανθασμένη διαμόρφωση με μία διαδικασία που απαιτεί την παρουσία ATP (Horwich et al., 2007). Οι HSP60s δεσμεύουν αρχικά τις πρωτεΐνες με λανθασμένη διαμόρφωση μέσω των υδρόφοβων επαφών και στη συνέχεια τα υποστρώματα αυτά μετατοπίζονται εντός της κεντρικής κοιλότητας όπου αναδιπλώνονται και προστατεύονται από τη συσσωμάτωση με άλλες πρωτεΐνες. Η GroEL περικλείει ένα πρωτεϊνικό μόριο ανά κοιλότητα και εν συνεχεία, η κοιλότητα κλείνει από τη σύνδεση του συμπαράγοντα GroES παρουσία ATP (Todd et al, 1994; Horwich et al., 2006)

Έχει αποδειχθεί πως οι τσαπερονίνες είναι σημαντικές στην παροχή βοήθειας σε πρωτεΐνες πλαστιδίων όπως η Rubisco (Wang et al., 2004). Ορισμένες μελέτες επισημαίνουν ότι αυτή η κατηγορία πρωτεϊνών θα μπορούσε να εμπλέκεται στην αναδίπλωση και την συσσωμάτωση πολλών πρωτεϊνών που μεταφέρονται σε οργανίδια, όπως οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια (Lubben et al., 1989). Συγκεκριμένα, οι HSP60 δεσμεύονται με διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών μετά τη μεταγραφή τους και πριν από την αναδίπλωσή τους για την αποτροπή της συσσωμάτωσής (Parsell και Lindquist, 1993). Από λειτουργικής άποψης, οι τσαπερονίνες είναι περιορισμένες στα φυτά όπου οι τσαπερονίνες του στρώματος δρουν για την επίτευξη της λειτουργικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών που έχουν εισαχθεί πρόσφατα στους χλωροπλάστες (Jackson-Constan et al., 2001).

### 1.3.4 Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (sHSPs)

Οι sHps παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην άμυνα των οργανισμών κατά τη διάρκεια στρεσογόνων καταστάσεων ενώ προστατεύουν τις πρωτεΐνες από τη μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση. Οι sHps απαντώνται σε αρκετά υποκυτταρικά οργανίδια όπου η ικανότητά τους να προσδένονται στις πρωτεΐνες και να τις προστατεύουν είναι μείζονος σημασίας για το δίκτυο των μοριακών συνοδών. Το μοριακό τους βάρος ποικίλει από 12-43 kDa ενώ συγκροτούν δυναμικά ολιγομερή. Τα sHps μονομερή έχουν μια κοινή περιοχή α-κρυστάλλινης στο C-τελικό άκρο η οποία περιέχει 80-100 κατάλοιπα αμινοξέων και είναι πλούσια σε β-φύλλα που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των διμερών (Seo et al., 2006; Sun and MacRae, 2005).

Τα ολιγομερή των sHSPs μπορούν να φτάσουν και τα 800 kDa και είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης των επικρατειών α-κρυστάλλινης δύο μονομερών σχηματίζοντας ένα διμερές. Οι sHSPs φωσφορυλιώνονται και αυτό οδηγεί σε μια αλλαγή της κατάστασης των

συγκροτημένων ολιγομερών τους και κατ' επέκταση της βιολογικής τους δράσης. Ο ολιγομερισμός των sHSPs είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδραση τους με το υπόστρωμα και την δράση μοριακού συνοδού, αν και ο ρόλος κάθε ολιγομερούς διαφέρει ανάμεσα στις sHSPs. (Acunzo et al., 2012).

Μία από τις χαρακτηριστικές λειτουργίες αυτής της τάξης είναι η αποδόμηση των πρωτεϊνών που έχουν ακατάλληλη αναδίπλωση. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που διακρίνει τις sHSPs από άλλες κατηγορίες μοριακών συνοδών είναι ότι η δράση τους είναι ανεξάρτητη από το ATP (Miernyk, 1999).

Οι sHSPs δεν μπορούν να ξανααναδιπλώσουν τις λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, αλλά μπορούν να δεσμεύουν τις μερικά διπλωμένες ή αποδιαταγμένες πρωτεΐνες υποστρώματα, αποτρέποντας την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών (Haslbeck et al., 2005; McHaouab et al., 2009). Οι πρωτεΐνες υποστρώματα πιστεύεται ότι είναι σε τηγμένη σφαιρική φάση, η αποδιάταξη τους είναι ημιτελής και η δευτεροταγή τους δομή παραμένει. Η εξαιρετικά αργού ρυθμού απελευθέρωση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν, έχει οδηγήσει στην διαπίστωση ότι λειτουργούν ως δεξαμενές μη διπλωμένων πολυπεπτιδίων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι, μετά την απομάκρυνση του στρες οι sHSPs συνεργάζονται με μοριακές συνοδούς, όπως οι HSP70 και HSP100 πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πεπτιδίου στόχου και την ATP-εξαρτώμενη αναδίπλωσή του (Mogk et al., 2003; Lee et al., 1997).

Αν και ο τρόπος δράσης τους δεν έχει καθοριστεί πλήρως, οι sHSPs προσδίδουν στα κύτταρα μία διαδοχικά αυξανόμενη ανθεκτικότητα στη θερμότητα καθώς και σε άλλες καταστάσεις στρες. Το αποτέλεσμα είναι ότι η επιβίωση κάτω από συνθήκες στρες ενισχύεται, πιθανότατα επειδή αποτρέπεται η μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών. (MacRae, 2000).

### 1.3.5 Η οικογένεια HSP90

Η θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη 90 (HSP90) είναι μια υψηλά συντηρημένη μοριακή συνοδός η οποία διευκολύνει την ωρίμανση ενός πλήθους πρωτεϊνών (γνωστές ως πελάτες) όταν βρίσκονται κοντά στην απόκτηση της ώριμης διαμόρφωσής τους. Τα υποστρώματα αυτά αποτελούνται κατά κύριο λόγο από μεταφορείς μοριακών σινιάλων, όπως πρωτεϊνικές κινάσες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών που καταλαμβάνουν κεντρικές θέσεις σε πολλά βιολογικά δίκτυα καθώς εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής ομοιόστασης, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση (Εικόνα 1.5) (Pearl and Prodromou, 2006; Richter and Buchner, 2006). Ως εκ τούτου, η HSP90 αποτελεί μόριο κλειδί για την ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών, ουσιαστικών για την επιβίωση ενός οργανισμού και ασκεί ισχυρές επιδράσεις στην βιολογία των οργανισμών, τις ασθένειες καθώς και τις εξελικτικές διαδικασίες.

Η HSP90 είναι μία από τις πιο συντηρημένες HSPs. Ομόλογα γονίδια *HSP90* συναντώνται από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο, ενώ η πρωτεΐνη HSP90 αποτελεί το 1-2% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ενός κυττάρου σε φυσιολογικές συνθήκες, με το ποσοστό να ανεβαίνει σε συνθήκες στρες, όπως η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας καθώς αποτελεί βασικό συστατικό της απόκρισης στο θερμικό σοκ. Σε συνθήκες στρες παρατηρείται υπερέκφραση των *HSP90* γονιδίων καθώς απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις της HSP90 για τη σωστή επαναδίπλωση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών, ενώ σε κανονικές συνθήκες η HSP90 είναι αναγκαία για τη ρύθμιση της αναδίπλωσης ενός μεγάλου συνόλου πρωτεϊνικών υποστρωμάτων καθώς ο ρόλος της εκτείνεται πολύ πέρα από την ανοχή του στρες (Krukenberg et al. 2011; Welch and Feramisco, 1982). Αυτή η αφθονία καθώς και το γεγονός ότι στους περισσότερους οργανισμούς είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητά τους, υποδηλώνουν το σημαντικό βιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής.

Η μοριακή αυτή συνοδός είναι ιδιαίτερη με διάφορους τρόπους. Πρώτον, δεν κατέχει τόσο ετερόκλητο φάσμα υποστρωμάτων όπως η GroE ή η HSP70 (Picard, 2002; Pratt and Toft, 2003; Smith, 1998). Δεύτερον, δεν δεσμεύει ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, αλλά πρωτεΐνες με σχεδόν ώριμη διαμόρφωση (Jakob et al., 1995) γεγονός που υποδηλώνει ότι ωριμάζει ένα περιορισμένο σύνολο πρωτεϊνών που καταλαμβάνουν μετασταθείς διαμορφώσεις κατά τα τελευταία στάδια αναδίπλωσής τους. Τρίτον, φαίνεται να έχει εξελιχθεί από ένα απλοϊκό σύστημα στους προκαρυώτες στον πιο εξελιγμένο μηχανισμό μοριακών συνοδών στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο οποίος συνεργάζεται με μια μεγάλη σειρά από βοηθητικά μόρια που συνδέονται με μια καθορισμένη διάταξη κατά τη διάρκεια του κύκλου δράσης της μοριακής συνοδού (Εικόνα 1.5) (Li et al, 2011; Wandinger et al, 2008; Taipale et al, 2010; Pearl and Prodromou, 2006).

Η HSP90 αποτελεί ένα κομβικό στοιχείο της πρωτεϊνικής ομοιοστάσης (πρωτεόστασης) η οποία ελέγχει πολλά σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Taipale et al, 2010). Κατά συνέπεια, η HSP90 εμπλέκεται μεταξύ άλλων στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τη συντήρηση των τελομερών, την απόπτωση, την μεταγωγή σήματος της μίτωσης, την μεταφορά μέσω κυστιδίων, την ενδογενή ανοσία και την στοχευμένη πρωτεϊνική αποδόμηση. Πράγματι, η εξέλιξη και η συντήρηση αυτών των λειτουργικών δικτύων θεωρείται ότι εξαρτώνται από την ικανότητα της HSP90 στην ρύθμιση των επιπτώσεων των μεταλλάξεων οι οποίες αποσταθεροποιούν δομικά τα υποκείμενα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, επιτρέποντας έτσι την απόκτηση νέων χαρακτηριστικών. Ως εκ τούτου, η HSP90 ενέχεται στον φαινοτυπικό καθορισμό, όπως έχουν δείξει μελέτες στην *D. melanogaster* (Rutherford και Lindquist 1998, Specchia et al. 2010), ενώ παράλληλα ανοίγει νέους ορίζοντες για την θεραπεία του καρκίνου, αποτελώντας η ίδια η πρωτεΐνη φαρμακευτικό στόχο (Jhaveri et al. 2012). Άλλος ένας βιολογικός ρόλος της HSP90 είναι η σωστή σύνθεση και η διατήρηση πρωτεϊνικών συμπλόκων όπως των μικρών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (snRNPs), της RNA πολυμεράσης II, των κινασών που σχετίζονται με τις κινάσες της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIKK), του συμπλόκου των τελομερών, των συμπλόκων RISC και του πρωτεασώματος. Ως εκ τούτου, η HSP90 συμμετέχει και σε πληθώρα άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως είναι αυτό της RNA σίγησης και της αποδόμησης των πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος (Makhnevych and Houry 2012).

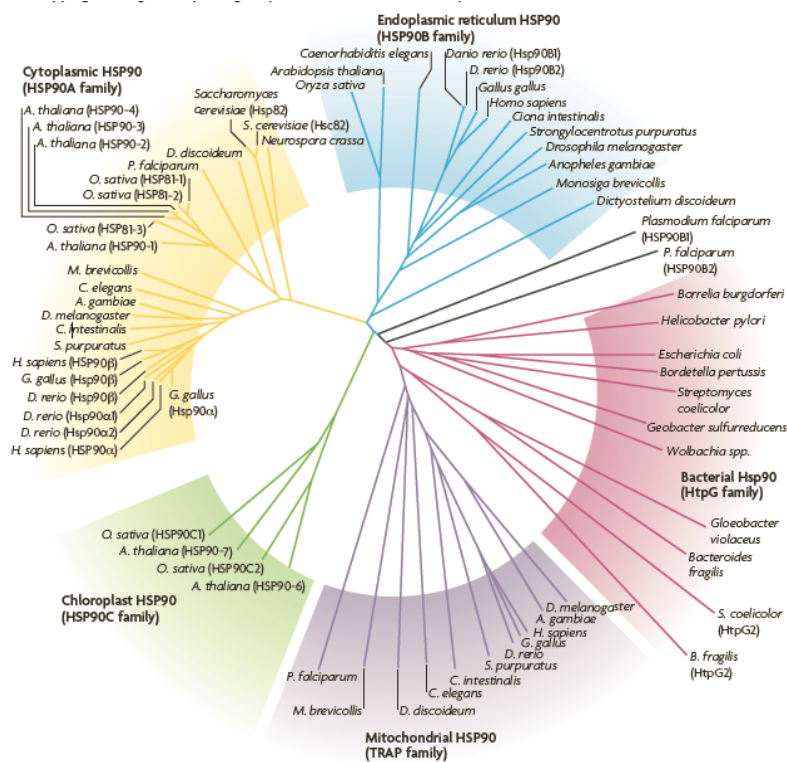
Οι διάφοροι μοριακοί συνοδοί ακολουθούν ξεχωριστές στρατηγικές αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Έτσι και η πρωτεΐνη HSP90 ως μοριακή συνοδός ακολουθεί τη δική της. Πιο συγκεκριμένα η HSP90 προσδένεται στα υποστρώματά της που δεν είναι άλλα από πρωτεΐνες που είναι κοντά στο να αποκτήσουν τη φυσιολογική στερεοδιαμόρφωσή τους. Παράλληλα με αυτήν την στρατηγική η κυτταροπλασματική HSP90 λειτουργεί ως μέρος ενός συμπλόκου αναδίπλωσης όπου η HSP90 δρα μετά την HSP70 και χρησιμοποιεί την ενέργεια που παράγεται από την δέσμευση και την υδρόλυση του ATP για την δομική ωρίμανση και διαμορφωτική ρύθμιση πολυάριθμων πρωτεϊνών και την εγκαθίδρυση της ενδογενούς και προσαρμοστικής ανοσίας (McClellan, et al. 2007). Για τον λόγο αυτό, η HSP90 αλληλεπιδρά με πολλούς ρυθμιστές και με περισσότερες από 20 συν-τσαπερόνες πολλές από τις οποίες περιέχουν περιοχές επαναλήψεων τετρατρικοπεπτιδίων (TPR) για να δεσμεύονται επάνω στην HSP90, καθοδηγούν την αναγνώριση των πρωτεϊνών-πελατών και ρυθμίζουν τις βιοχημικές δραστηριότητές της. Αυτές οι δραστηριότητες συνδέονται στενά με τις περιβαλλοντικές διαταραχές.

Η HSP90 υπόκειται σε σημαντικό βαθμό βιοχημικής ρύθμισης. Εκτός από την δέσμευση και υδρόλυση του ATP, οι αλληλεπιδράσεις της με διαφορετικούς βοηθητικούς παράγοντες διευθύνουν τον κύκλο δράσης της. Επιπλέον, τόσο η HSP90 όσο και οι συν-τσαπερόνες ρυθμίζονται περαιτέρω από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτές είναι: η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η S-νιτροσιλίωση, η οξειδωση και η ουβικιτινίωση. Η HSP90 θεωρείται ότι είναι μία φωσφοπρωτεΐνη, αφού μέχρι στιγμής έχει βρεθεί ότι

φωσφορυλιώνονται 12 κατάλοιπα της HSP90β και 14 της HSP90α ισομορφής του ανθρώπου (Mollapour and Neckers 2012).

### 1.3.5.α Φυλογένεση της HSP90

Η οικογένεια θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών HSP90 είναι εξαιρετικά συντηρημένη. Με εξαίρεση τα αρχαία, οργανισμοί σε όλα τα βασίλεια της ζωής έχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν την HSP90. Η οικογένεια HSP90 μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε υποοικογένειες: τις κυτταροπλασματικές HSP90A, τις HSP90B που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τις HSP90C των χλωροπλαστών, τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες TRAP που σχετίζονται με τις TNFR και τις βακτηριακές πρωτεΐνες G υψηλής θερμοκρασίας (HtpG) (Εικόνα 1.3, η κλίμακα αντιπροσωπεύει γενετική απόσταση) (Chen et al., 2006). Η HtpG βρίσκεται στα περισσότερα βακτηριακά είδη, αλλά, σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά ομολόγά της, δεν είναι απαραίτητο γονίδιο σε μη στρεσογόνες συνθήκες και έχει μέτριες μόνο επιδράσεις στην ανάπτυξη του οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 1.3: Φυλογενετική εξέλιξη της HSP90 υπεροικογένειας.

Οι τέσσερις ευκαρυωτικές HSP90 υποοικογένειες εξελίχθηκαν από μια HtpG ομοιάζουσα ομάδα. Η οικογένεια TRAP των μιτοχονδριακών HSP90 είναι πιο στενά συνδεδεμένη με την βακτηριακή ομάδα HtpG, ωστόσο, είναι απίθανο να είναι να έχει προκύψει από ενδοσυμβίωση. Αντ' αυτού, φαίνεται να έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα από τις οικογένειες HSP90A, HSP90B και HSP90C κατά τις αρχές της εξέλιξης των ευκαρυωτών. Η λειτουργία της TRAP είναι ελάχιστα κατανοητή, αλλά η ανθρώπινη TRAP έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την απόπτωση (Pridgeon et al., 2007).



Οι πρωτεΐνες HSP90B που εντοπίζονται στο ER, γνωστές ως GRP94 στον άνθρωπο, παίζουν ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών ER. Όλα τα γνωστά υποστρώματα των GRP94 δρουν σε μονοπάτια εκκρίσεως ή βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια (Yang et al., 2005). Η GRP94 επάγεται ισχυρά από διαταραχές της πρωτεϊνικής ομοιόστασης στο ER. Επιπλέον, φαίνεται πως οι οικογένειες HSP90A του κυτταροπλάσματος και οι HSP90C των χλωροπλαστών προέκυψαν από την ομάδα HSP90B του ER.

Η ομάδα HSP90A είναι η μεγαλύτερη, η πιο διαδεδομένη και η πιο καλά μελετημένη από τις υποοικογένειες των HSP90. Εξελικτικά πρόσφατα πανομοιότυπα γεγονότα έχουν οδηγήσει σε πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές HSP90 σε πολλούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, τα περισσότερα σπονδυλωτά έχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν την HSP90: τα HSP90AA/1 και HSP90AB/1. Οι λειτουργίες αυτών των παραλόγων είναι εξαιρετικά επικαλυπτόμενες, αν και έχουν αναφερθεί μερικές λειτουργίες που επιτελούνται από εξειδικευμένα παράλογα (Eustace et al., 2004).

### **1.3.5.β Κυτταρική τοποθέτηση**

Η HSP90 είναι μια μεγάλη διμερής πρωτεΐνη που βρίσκεται σχεδόν σε κάθε διαμέρισμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Πράγματι, τα περισσότεροι ευκαρυωτικά γονιδιώματα κωδικοποιούν πολλαπλές πρωτεΐνες HSP90 ειδικές για συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα, που προέκυψαν νωρίς στην πορεία της εξέλιξης (Εικόνα 1.3). Μολονότι είναι δομικά παρόμοιες με τις κυτταροπλασματικές HSP90, έχουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες και είναι πιθανό να παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία των οργανισμών.

Η HSP90 είναι μία από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα. Ορισμένες HSP90 μετατοπίζονται στον πυρήνα σε απόκριση στο στρες και άλλα ερεθίσματα αν και δεν υπάρχει κάποιο ομόλογο της ειδικά εντοπισμένο στον πυρήνα (Pratt and Toft, 1997; Akner et al., 1992; Biggiogera et al., 1996; Langer et al., 2003). Οι κυτταροπλασματικές HSP90 μπορούν επίσης να μεταφερθούν σε υποκυτταρικά οργανίδια (πχ μιτοχόνδρια) ή άλλα μέρη του κυττάρου. Για παράδειγμα, έχουν ανιχνευθεί στον εξωκυττάριο χώρο, όπου ενεργούν για την διαμορφωτική ωρίμανση της μεταλλοπρωτεΐνης 2, μεσολαβώντας στην διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων.

### **1.3.5.γ Δομή της HSP90 πρωτεΐνης**

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποσαφηνίσει τις δομές της HSP90 των βακτηρίων (Shiau et al., 2006; Ali et al., 2006), της ζύμης και των θηλαστικών (Dollins et al., 2007). Η γενική αρχιτεκτονική των δομικών περιοχών της είναι παρόμοια, αλλά υπάρχουν κάποιες επί μέρους διαφοροποιήσεις όσον αφορά τις υποπεριοχές που τις απαρτίζουν.

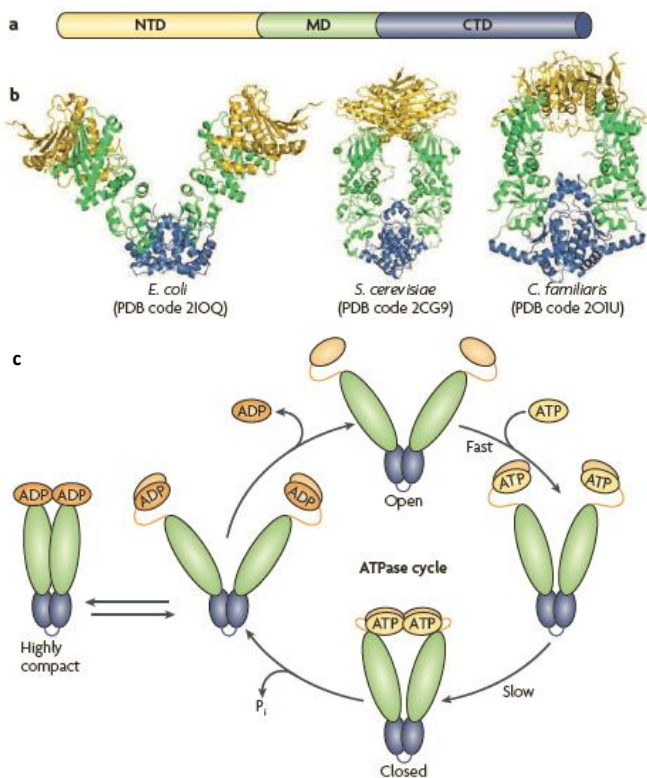
Η HSP90 παρουσιάζει δομική ομολογία με άλλες ATPάσες της GHKI υπεροικογένειας. Στην ενεργό της μορφή η HSP90 είναι διμερές. Η HSP90 αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές: κάθε μονομερές του HSP90 διμερούς έχει μία άκρως συντηρημένη N-τελική περιοχή με ενεργότητα ATPάσης (NTD) συνδεδεμένη με μια μεσαία περιοχή (MD) η οποία εμπλέκεται στην υδρόλυση του ATP και την δέσμευση του υποστρώματος και των βοηθητικών μορίων 41, που ακολουθείται από μια C-τελική περιοχή διμερισμού (CTD) (Εικόνα 1.4) (Carlan, 1999; Pearl and Prodromou, 2000).

Η ενδογενής ενεργότητα ATPάσης της HSP90 βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης με τα κατάλοιπα Asp79 και Glu33 να έχουν κύριο ρόλο στην πρόσδεση του ATP και στην υδρόλυσή του αντίστοιχα (Panaretou et al., 1998). Έτσι, η HSP90 δεσμεύει ATP στο NTD, το οποίο υδρολύεται στην συνέχεια έπειτα από την αλληλεπίδρασή της με τους πελάτες και με ορισμένες συν-συντσαπερόνες. Δομικά μη σχετιζόμενοι φυσικοί αναστολείς της HSP90 μπορούν να εκτοπίσουν το ATP και να εμποδίσουν την λειτουργία της HSP90 με

υψηλή εξειδίκευση (Dollins et al., 2007). Η υψηλή συντήρηση της θέσης σύνδεσης του ATP επιτρέπει σε αυτούς τους αναστολείς να χρησιμεύσουν ως εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία για την ανίχνευση της λειτουργίας της HSP90 από τα φυτά μέχρι τα ζώα και τους μύκητες. Επιπλέον, στο HSP90 διμερές, μια σταθεροποιητική αλληλεπίδραση με το N-τελικό άκρο του απέναντι μονομερούς προάγει την δραστηριότητα (Cunningham et al., 2008)..

Η μεσαία περιοχή πιστεύεται ότι έχει έναν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και την δέσμευση των υποστρωμάτων. Η μεσαία περιοχή είναι συνδεδεμένη με το NTD από έναν φορτισμένο συνδέσμο, ο οποίος κατέχει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της HSP90 (Hainzl et al., 2009; Tsutsumi et al., 2009). Αυτή η περιοχή απουσιάζει από τη βακτηριακή HtrG καθώς και από το μιτοχονδριακό ομόλογο των θηλαστικών Trap1.

Η καρβοξυτελική επικράτεια είναι λιγότερο συντηρημένη στην ακολουθία από την υπόλοιπη πρωτεΐνη και χρησιμεύει στον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης (Harrist et al., 2004; Minami et al., 1994), με τη συμμετοχή της αμινοτελικής επικράτειας (επικράτεια "καπάκι", lid domain) σε ορισμένες συνθήκες (Krukenberg et al., 2011). Τα πέντε κατάλοιπα της C-τελικής περιοχής (Met-Glu-Glu-Val-Asp, το μοτίβο MEEVD) συνθέτουν μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή δέσμευσης (TPR), η οποία μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με πολλά βοηθητικά συνοδά μόρια που έχουν TPR μοτίβα (Young et al., 1998).



**Εικόνα 1.4: Οι δομικές περιοχές της HSP90 και του κύκλου μοριακού συνοδού.** (a) Οι δομικές περιοχές της HSP90, που αποτελείται από μια αμινο-τελική περιοχή (NTD), μια μεσαία περιοχή (MD) και μία καρβοξυ-τελική περιοχή (CTD). (b) Δομή του πλήρους μήκους HSP90 διμερούς από την *Escherichia coli*, την *Saccharomyces cerevisiae* (κυτταροπλασματικές αμφότερες) και το *Canis familiaris* (GRP94 μια HSP90 ενδοπλασματικού δικτύου). Τα χρώματα υποδεικνύουν περιοχές από το μέρος a. (c) Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου διαμορφωτικού κύκλου της HSP90 και του ρόλου της νουκλεοτιδικής υδρόλυσης. Δέσμευση της ATP οδηγεί σε μία κλειστή διαμόρφωση της HSP90. Υδρόλυση του ATP σε ADP οδηγεί σε μια δεύτερη κατάσταση που είναι δομικά ασαφής. Η απομάκρυνση του ADP αποκαθιστά την HSP90 στην ανοικτή της διαμόρφωση.

### 1.3.5.δ Βοηθητικά συνοδά μόρια της HSP90

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 20 συν-σαπερόνες (Εικόνα 1.5). Σε πολλές περιπτώσεις, ο βιολογικός τους ρόλος παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Επιπλέον, ορισμένες συν-σαπερόνες (για παράδειγμα η Cdc37) είναι ζωτικής σημασίας σε ορισμένους οργανισμούς, αλλά απουσιάζουν σε άλλους (Johnson and Brown, 2009).

Τα βοηθητικά συνοδά μόρια ρυθμίζουν την λειτουργία της HSP90 με τέσσερις τρόπους: 1) συντονίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της HSP90 και άλλων συστημάτων

μοριακών συνοδών, όπως η HSP70, 2) ενδυναμώνουν ή αναστέλλουν την δραστικότητα ATPάσης της HSP90, 3) προσλαμβάνουν συγκεκριμένες κατηγορίες πελατών για την HSP90 και 4) μέσα από τις ενζυμικές τους δραστηριότητες, συμβάλουν σε διάφορες πτυχές του κύκλου δράσης της μοριακής συνοδού (Tairale et al, 2010).

Το μεγαλύτερο υποσύνολο συν-τσαπερονών είναι αυτές που περιέχουν περιοχές TPR (πχ HOP, CHIP) που δεσμεύονται στα μοτίβα MEEVD της HSP90 (Scheufler et al., 2000). Αυτή η κατηγορία βοηθητικών μορίων είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφη, παρά το γεγονός ότι έχει ένα κοινό μηχανισμό δέσμευσης με την HSP90. Ένας ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος των συν-τσαπερονών που περιέχουν περιοχές TPR είναι να διευκολύνουν την συνεργατική, διαδοχική δράση των HSP40, HSP70 και HSP90 ώστε να επιτευχθεί ωρίμανση πρωτεϊνών πελατών. Υπάρχουν όμως και βοηθητικά συνοδά μόρια τα οποία δεν περιέχουν TPR μοτίβα, όπως είναι η p23 (SBA1 στη ζύμη), η CDC37 και η AHA1 (Dittmar et al., 1997; Mayer et al., 2002; Roe et al., 2004), τα οποία συνδέονται σε άλλες θέσεις με την HSP90.

Πολλές συν-τσαπερόνες είτε αναστέλλουν την δραστικότητα ATPάσης της HSP90 (για παράδειγμα η HOP, η Cdc37 και η p23) (Siligardi et al. 2002; Prodromou et al. (1999). είτε την ενισχύουν (για παράδειγμα η AHA1 και η Cpr6) (Panaretou et al. 2002; McLaughlin et al., 2002), αντανακλώντας πιθανώς τα διαφορετικά στάδια του κύκλου δράσης της HSP90 στα οποία δρουν.

#### **1.3.5.ε Πρωτεΐνες-υποστρώματα της HSP90 (client proteins)**

Για να θεωρηθεί μία πρωτεΐνη ως υπόστρωμα της HSP90 θα πρέπει να πληρεί δύο βασικά κριτήρια. Πρώτον, θα πρέπει να αλληλεπιδρά φυσικά με την HSP90. Δεύτερον, η αναστολή της λειτουργίας της HSP90 θα πρέπει να οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας της πρωτεΐνης-πελάτη. Συνηθέστερα, το τελευταίο οδηγεί σε αποδόμηση μέσω του πρωτεασώματος, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει σε συσσωμάτωση (Xu et al., 2005).

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες πελατών της HSP90: οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Εικόνα 1.5). Πράγματι, η HSP90 ανακαλύφθηκε αρχικά κατά τον χρωματογραφία συγγένειας του πρώτου μοριακά χαρακτηρισμένου ογκογονιδίου, της πρωτεΐνης Tyr κινάση v-Src (Tairale et al, 2010).

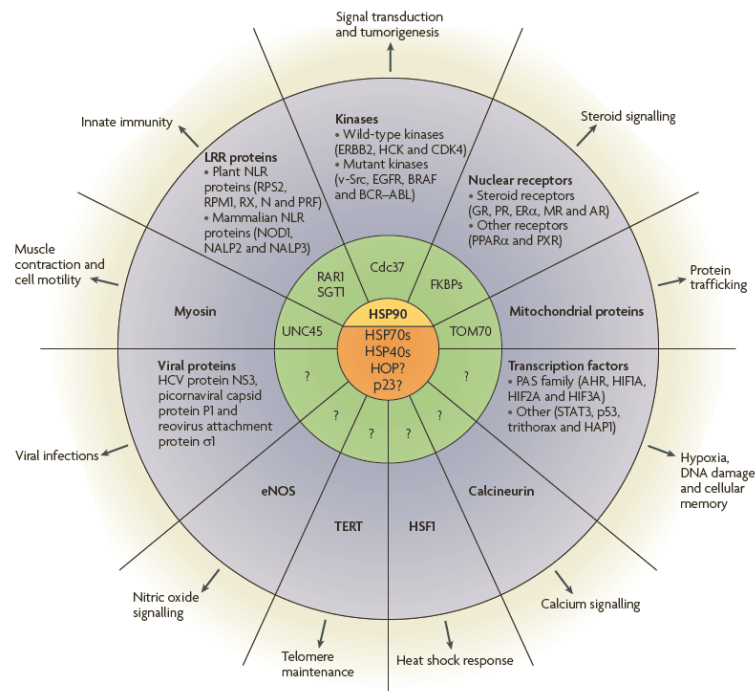
Το καλύτερα μελετημένο υπόστρωμα της HSP90 είναι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών (Steroid Hormone Receptors, SHRs). Ο μονομερής υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και ο υποδοχέας της προγεστερόνης αλληλεπιδρούν με την HSP90, ενώ είναι προσδεμένοι με την HSP70/Hop, και αποκτούν την τελική δομή στην οποία θα προσδεθεί η στεροειδής ορμόνη ύστερα από την αλληλεπίδρασή τους με την HSP90 (Young et al., 2001), και υδρόλυση του ATP από αυτήν (Grenert et al., 1999). Όταν το μόριο του υποδοχέα αναδιπλωθεί, τότε απελευθερώνεται από την HSP90, και είτε προσδένει τη στεροειδή ορμόνη με απόρροια τον ομοδιμερισμό του και την ενεργοποίησή του, ή παραμένει ασταθής και αναγνωρίζεται ξανά από τον μηχανισμό των μοριακών συνοδών (Young et al., 2001).

Επίσης, αρκετά καλά μελετημένος είναι και ο μηχανισμός ωρίμανσης μιας άλλης ομάδας υποστρωμάτων της HSP90 που αποτελείται από ρυθμιστικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης. Το βοηθητικό συνοδό μόριο CDC37, το οποίο είναι συντηρημένο από το σακχαρομύκητα ως τα θηλαστικά, συνεργάζεται με την HSP90 στην αναδίπλωση ενός ολοένα αυξανόμενου αριθμού τέτοιων κινασών (Richter and Buchner, 2001) όπως η πρωτεϊνική κινάση B/AKT, η MAP κινάση και πολλές άλλες (Basso et al., 2002; Chen et al., 2002; Tatebe and Shiozaki, 2003).

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι μελετημένοι πελάτες είναι οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών και οι πρωτεϊνικές κινάσες, πολλοί άλλοι έχουν ανακαλυφθεί, όπως ο eNOS (García-Cardena. et al., 1998), η αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT)

(Holt et al., 1999), μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες χρωματίνης (όπως η οικογένεια PAS μεταγραφικών παραγόντων, οι p53, STAT3 και TRITHORAX) (Sato et al., 2003; Tariq et al., 2009). Όλα τα παραπάνω, τοποθετούν την HSP90 σε πολλούς ζωτικούς ρυθμιστικούς κόμβους.

Στα φυτά, η HSP90 και η συν-τσαπερόνη SGT1 συσχετίζονται με πολλές πρωτεΐνες NLR (nucleotide-binding, leu-rich repeat (LRR)), οι οποίες είναι κυτταροπλασματικοί πρωτεϊνικοί αισθητήρες που απαιτούνται για την ενδογενή ανοσία. Οι LRR περιοχές τους αναγνωρίζουν μόρια σχετιζόμενα με παθογόνα, κάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης. Η HSP90 και η SGT1 απαιτούνται για την σταθερότητα του συμπλόκου του αισθητήρα. Συνεπώς, μεταλλάξεις της HSP90 ή της SGT1, ή αναστολή της HSP90, μειώνουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών NLR και θέτουν σε κίνδυνο την ανοσοποιητική απόκριση ενάντια σε πολλά παθογόνα (Takahashi et al., 2003; Lu et al., 2003).



**Εικόνα 1.5: Η HSP90 ρυθμίζει ποικίλες κυτταρικές διεργασίες μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες-πελάτες της.** Συνεργάζεται με βασικές συν-συνοδούς (όπως οι p23, HOP και το σύστημα συνοδών HSP40-HSP70) (πορτοκαλί) και με άλλες συν-συνοδούς (πράσινο). Προσαρμογείς συν-συνοδοί, όπως οι Cdc37 και SGT1 συνεργάζονται με έναν περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών περιοχών (μπλε). Ωστόσο, για τα περισσότερα υποστρώματα της HSP90, δεν είναι γνωστό το ποιές συν-συνοδοί, εάν υπάρχουν, συνδέονται στο σύμπλοκο (υποδεικνύονται με ερωτηματικό).

Η γνώση σχετικά με τους πελάτες της HSP90 έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, χάρη κυρίως σε μελέτες στην ζύμη, στην οποία 1.232 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν φυσικά ή γενετικά με την Hsp90 (Breitkreutz et al., 2008). Με άλλα λόγια, ~ 20% των πρωτεϊνών της ζύμης επηρεάζονται από την λειτουργία της HSP90, καθιστώντας την την πρωτεΐνη με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις στο γονιδίωμα της ζύμης. Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με την άποψη ότι η HSP90 έχει περιορισμένη γκάμα υποστρωμάτων σε σχέση με άλλες κατηγορίες μοριακών συνοδών όπως η GroEL και η GroES, οι οποία διαμεσολαβούν για την αναδίπλωση του ~ 10% των πρωτεϊνών στην *E. coli* (Kerner et al., 2005).

Το πώς η HSP90 προσλαμβάνει διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών-υποστρωμάτων με την βοήθεια των διαφόρων συν-τσαπερώνων παραμένει ακόμα ασαφές. Η HSP90

φαίνεται να έχει αρκετές περιοχές αλληλεπίδρασης με τα υποστρώματα, και η ισχύς της δέσμευσης φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την δομική ευελιξία του υποστρώματος (Wandinger et al., 2008). Ίσως η ισχυρότερη απόδειξη ότι η αναγνώριση του υποστρώματος από την HSP90 σχετίζεται με την διαμόρφωση ή την σταθερότητα του πελάτη, παρά με την πρωτοταγή του αλληλουχία, προέρχεται από μελέτες με ογκογόνες κινάσες (Brugge, 1986; Xu et al., 1999).

### 1.3.5.στ HSP90 και εξέλιξη

Στους ευκαρυώτες, η HSP90, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη φαινοτυπική εκδήλωση της γενετικής διακύμανσης. Η δεξαμενή της λειτουργίας της HSP90 μπορεί να καλύψει την ποικιλομορφία, έτσι ώστε όταν το περιβαλλοντικό στρες εξαντλεί αυτή την δεξαμενή, εμφανίζονται σε ορισμένα άτομα νέα χαρακτηριστικά. Στην *Drosophila melanogaster*, στο *Arabidopsis thaliana* και στο *Danio rerio* (Zebrafish), τα ειδικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν μετά την εξάντληση της HSP90 εξαρτώνταν σε μεγάλο βαθμό από το γενετικό υπόβαθρο (Cowen and Lindquist, 2005; Rutherford and Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002; Yeyati et al., 2007; Sangster et al., 2008b). Με την επέκταση των μηχανισμών με τους οποίους η HSP90 μπορεί να συμβάλει στην παραγωγή νέων κληρονομήσιμων φαινοτύπων, μπορεί να επηρεάσει την κληρονομικότητα επιγενετικών χαρακτηριστικών, την επαγωγή νέων μεταλλάξεων και ακόμη και να προκαλέσει μεταλλαξιγένεση προκαλούμενη από τρανσποζόνια (Sollars et al., 2003; Tokuriki and Tawfik, 2009; Specchia et al., 2010).

Η HSP90 μπορεί επίσης να ενισχύσει τη γενετική παραλλακτικότητα, επιτρέποντας της να έχει άμεσα αποτελέσματα. Τα καλύτερα παραδείγματα είναι τα μεταλλαγμένα ογκογονίδια, η δράση των οποίων ενεργοποιείται άμεσα από την HSP90 (Whitesell and Lindquist, 2005).

Τα χαρακτηριστικά που εξαρτώνται από την HSP90 μπορούν να καταστούν ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές αλλαγές μέσω της επιλογής. Αυτό μπορεί να συμβεί με την απόκτηση νέων, ισχυρών μεταλλάξεων ή με την εκ νέου συλλογή και τον εμπλουτισμό της αρχικής παραλλαγής (Cowen and Lindquist, 2005; Rutherford and Lindquist, 1998). Προσαρμοσμένες παραλλαγές των πρωτεϊνών με τροποποιημένη εξάρτηση από τις μοριακές συνοδούς μπορεί να δημιουργηθούν κατά την διάρκεια της πειραματικής εξέλιξης, αλλά παραδείγματα τέτοιων παραλλαγών στην φύση δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί (Xu et al., 2005; Stephanou and Latchman, 1999).

### 1.4. Άνθηση

Το γενικό δομικό σχέδιο των φυτών εγκαθιδρύεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όταν οι αδιαφοροποίητες μεριστωματικές περιοχές της ρίζας και του βλαστού διαχωρίζονται. Ωστόσο, μεγάλο μέρος της φυτικής ανάπτυξης λαμβάνει χώρα μετά την εμβρυογένεση, μέσω της επαναληπτικής παραγωγής καταβολών οργάνων στο κορυφαίο μερίστωμα του βλαστού (AMB). Στα περισσότερα είδη το AMB αρχικά δημιουργεί τα βλαστικά όργανα όπως τα φύλλα αλλά σε κάποιο χρονικό σημείο το AMB κάνει τη μετάβαση στην αναπαραγωγική ανάπτυξη και στην παραγωγή των ανθέων (Levy and Dean, 1998).

Αυτή η αλλαγή στην αναπτυξιακή μοίρα των καταβολών που ξεκίνησε στο AMB ελέγχεται από περιβαλλοντικά και ενδογενή σήματα (Bernier, 1988; McDaniel et al., 1992). Πάντως, σε αντίθεση με πολλές αναπτυξιακές μεταβάσεις στα ζώα, το AMB των φυτών δεν είναι μη αντιστρεπτά δεσμευμένο στην αναπαραγωγική ανάπτυξη από την στιγμή που θα ξεκινήσει η άνθηση. Σε ορισμένα είδη και γονοτύπους, υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, οι βλαστοί των φύλλων σχηματίζονται μετά τα άνθη με ένα φαινόμενο γνωστό

ως αντιστροφή της άνθησης (inflorescence reversion) (Battey and R.F. Lyndon, 1990; Routeau et al., 1997). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι τα γονίδια και οι διαδικασίες που εμπλέκονται στη μετάβαση στην άνθηση απαιτούνται τόσο στην έναρξη όσο και στην διατήρηση της αναπαραγωγικής ανάπτυξης (Εικόνα 1.6).

Επειδή πολλά είδη πρέπει να φτάσουν μία ορισμένη ηλικία ή μέγεθος πριν να μπορέσουν να ανθίσουν, το βλαστικό μερίστωμα θεωρείται ότι πρώτα διέρχεται από μία νεανική φάση στην οποία είναι ανίκανο να αποκρίνεται σε ενδογενή ή εξωγενή σήματα που θα προκαλούσαν την άνθηση σε ένα ώριμο μερίστωμα (Lawson and Roethig, 1995). Η πλειοψηφία των φυτών χρησιμοποιούν περιβαλλοντικά ερεθίσματα για τη ρύθμιση της μετάβασης στην άνθηση, επειδή όλα τα άτομα ενός είδους πρέπει να ανθίσουν συγχρονισμένα για επιτυχή ετερομιξία και επειδή όλα τα είδη πρέπει να συμπληρώσουν την αναπαραγωγή τους υπό ευνοϊκές συνθήκες. Οποιοσδήποτε περιβαλλοντικές μεταβλητές παρουσιάζουν τακτικές εποχιακές αλλαγές αποτελούν δυνητικούς παράγοντες που ελέγχουν τη μετάβαση στην άνθηση (Εικόνα 1.7). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες γίνονται αντιληπτοί από διάφορα μέρη του φυτού και σημαντικότεροι είναι η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα του νερού. Άλλα είδη είναι λιγότερο ευαίσθητα στις περιβαλλοντικές μεταβλητές και φαίνεται να ανθίζουν ως απόκριση σε ενδογενή συνθήματα όπως το φυτικό μέγεθος ή ο αριθμός των βλαστικών κόμβων. Η άνθηση μπορεί επίσης να επάγεται από το στρες όπως η έλλειψη θρεπτικών, η ξηρασία και ο συνωστισμός (Levy and Dean, 1998).

Υπάρχουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των διαφορετικών παραγόντων, έτσι ώστε κάθε παράγοντας μπορεί να αλλάξει την οριακή τιμή για την αποτελεσματικότητα των άλλων. Τα φυτά οπότε, θα προβούν στη χρήση διαφορετικού κρίσιμου παράγοντα σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Σαφώς, υπάρχουν εναλλακτικά μονοπάτια για την άνθηση στα περισσότερα, αν όχι σε όλα, τα φυτά. Επειδή οι διάφοροι παράγοντες προώθησης της άνθησης γίνονται αντιληπτοί από διαφορετικά μέρη του φυτού, αυτό συνεπάγεται ότι τα μέρη αυτά αλληλεπιδρούν και ότι η τύχη του κορυφαίου μεριστώματος, αν παραμένει βλαστικό ή αν γίνεται αναπαραγωγικό, ελέγχεται από μια σειρά από σήματα μεγάλων αποστάσεων σε ολόκληρο το φυτό. Πάραυτα, ορισμένες περιβαλλοντικές επιδράσεις στην άνθηση δεν έχουν τοποθετηθεί εντός των μονοπατιών της άνθησης. Π.χ., δεν είναι σαφές εάν οι επιδράσεις της διαθεσιμότητας θρεπτικών ή της ποιότητας του φωτός στην άνθηση δρουν μέσω των μονοπατιών που έχουν ήδη χαρακτηριστεί ή μέσω περαιτέρω μονοπατιών (Ohto et al., 2001).

Τα φυτά αναπτύσσονται μέσα από τη συνεχή δράση των μεριστωμάτων. Κατά την αντίληψη των κατάλληλων περιβαλλοντικών συνθημάτων, το AMB μετατρέπεται σε ένα αναπαραγωγικά καθοριστικό μερίστωμα ταξιανθίας. Στο *Arabidopsis thaliana*, το μερίστωμα της ταξιανθίας παράγει πρόσθετα δευτερεύοντα μεριστώματα ταξιανθίας, καθώς και ανθικά μεριστώματα στα πλάγια του, για να δημιουργήσουν τη χαρακτηριστική αρχιτεκτονική των ώριμων φυτών (Amasino, 2010). Το ανθικό μερίστωμα αναδύεται ως μια πλευρική απόφυση, ή διόγκωση, στην περιφέρεια του μεριστώματος της ταξιανθίας. Σε αυτό το στάδιο μπορούν να ανιχνευθούν ορισμένα από τα πρώτα σημάδια έκφρασης των ειδικών γονιδίων της άνθησης (Grandjean et al., 2004; Reddy et al., 2004; Heisler et al., 2005). Μόλις το ανθικό μερίστωμα έχει εγκαθιδρυθεί, υποβάλλεται σε ένα στερεότυπο πρότυπο αύξησης μέσα από μια σειρά καλά-καθορισμένων σταδίων (Smyth et al., 1990). Τα ορόσημα στάδια περιλαμβάνουν: στάδιο 1, που αντιστοιχεί στην πρώτη μορφολογική εμφάνιση μιας απόφυσης στα πλευρικά του μεριστώματος της ταξιανθίας, στάδιο 3, όταν πρωτοεμφανίζονται οι καταβολές των σεπάλων, στάδιο 5, όταν οι καταβολές των πετάλων και των στημόνων γίνονται άμεσα ορατές και το στάδιο 13, όταν ο μπουμπούκι ανοίγει και επέρχεται η άνθηση.

Ένα ανθικό μερίστωμα διαφέρει από τα άλλα μεριστώματα με πολλούς και σημαντικούς τρόπους. Συγκεκριμένα, το ανθικό μερίστωμα παράγει διαδοχικά ανθικά



όργανα: τα σέπαλα, τα πέταλα, τους στήμονες και τα καρπόφυλλα. Αυτά τα όργανα αναπτύσσονται σε ομόκεντρους δακτυλίους, ή σπείρες (Steeves and Sussex, 1989; Smyth et al., 1990). Ως εκ τούτου, τα άνθη έχουν μια πολύ στερεότυπη αρχιτεκτονική, που αποτελείται από σπείρες στείρων οργάνων (περιάνθιο) γύρω από τις σπείρες των αναπαραγωγικών δομών. Στο *Arabidopsis*, τέσσερα σέπαλα προκύπτουν στην εξωτερική, ή πρώτη, σπείρα. Αυτά τα φυλλώδη όργανα περικλείουν το μπουμπούκι του άνθους καθώς αυτό αναπτύσσεται. Τέσσερα άσπρα πέταλα προκύπτουν στη δεύτερη σπείρα, σε θέσεις που εναλλάσσονται με τα σέπαλα. Έξι στήμονες, οι οποίοι αποτελούνται από ένα νήμα και ένα ανθήρα στο άκρο του που παράγει τη γύρη, προκύπτουν στην τρίτη σπείρα. Η κεντρική τέταρτη σπείρα παράγει την θηλυκή αναπαραγωγική δομή, το γυναικείο, το οποίο αποτελείται από δύο συμπυκνωμένα καρπόφυλλα. Το γυναικείο περιέχει τα ωάρια, τα οποία, μετά από τη γονιμοποίηση, θα προχωρήσουν στο να παράγουν τους σπόρους. Σε αντίθεση με το AMB που συνεχίζει να παράγει φύλλα και μασχαλιαία μπουμπούκια ουσιαστικά επ' αόριστον, το ανθικό μερίστωμα είναι καθορισμένο, δεδομένου ότι τελικά καταναλώνεται για την παραγωγή του άνθους, τερματίζοντας την ανάπτυξή του (Irish, 2010).

Η γενετική ανάλυση του χρόνου άνθησης στον αρακά, στα σιτηρά και στο *Arabidopsis* υποστηρίζει την υπόθεση ότι η μετάβαση στην άνθηση πραγματοποιείται υπό πολυπαραγοντικό έλεγχο (Snape et al., 1996; Weller et al., 1997; Koornneef et al., 1998b). Όντως, πολλαπλά γονίδια που ελέγχουν τον χρόνο άνθησης έχουν ταυτοποιηθεί και στα τρία από τα παραπάνω είδη. Επιπλέον, μερικά από αυτά τα γονίδια δρουν για να προωθήσουν την άνθηση και άλλα για να την καταστείλουν. Κάποια αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικές μεταβλητές και άλλα φαίνεται να δρουν αυτόνομα. Η άνθηση περιλαμβάνει την διαδοχική δράση δύο ομάδων γονιδίων: αυτών που αλλάζουν την μοίρα του μεριστώματος από βλαστικό σε ανθικό, τα γονίδια της ταυτότητας των ανθικών μεριστωμάτων (floral meristem identity genes) και αυτά τα οποία κατευθύνουν τον σχηματισμό των ποικίλων τμημάτων του άνθους, τα γονίδια της ταυτότητας των ανθικών οργάνων (organ identity genes). Συνεπώς, γονίδια που ελέγχουν τον χρόνο άνθησης μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα γονίδια της ταυτότητας των ανθικών μεριστωμάτων, όπου στο *Arabidopsis* περιλαμβάνονται τα: *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)*, *APETALA2 (AP2)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, και *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* (Εικόνα 1.6). Τα γονίδια μεριστωματικής ταυτότητας είναι από μόνα τους ικανά να επηρεάζουν τον χρόνο άνθησης (Mandel and Yanofsky, 1995; Weigel and Nilsson, 1995).

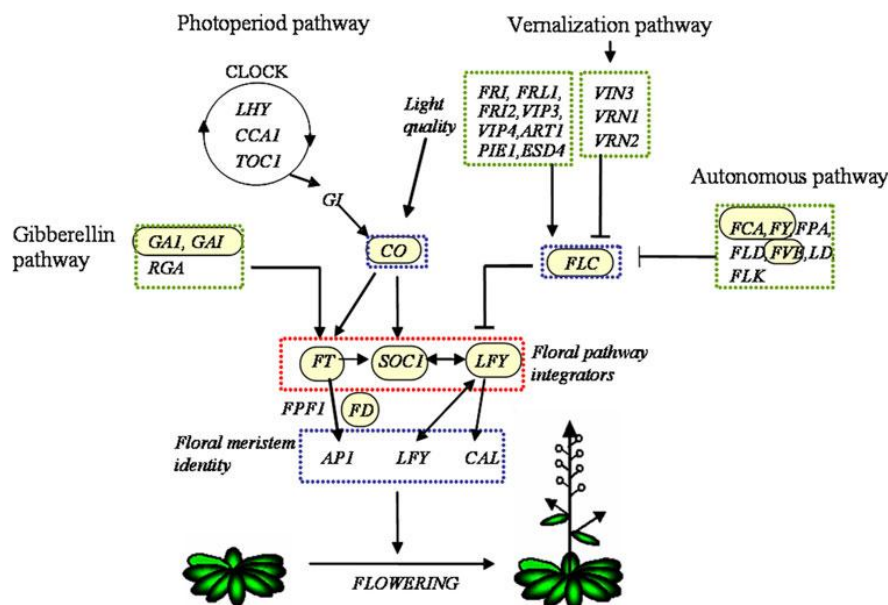
Συγκεντρωτικά μπορούμε να διακρίνουμε τις αναπτυξιακές διαδικασίες που οδηγούν στον σχηματισμό των ανθέων σε τέσσερα διαδοχικά στάδια (Payer, 1957; Sattler, 1973). Το πρώτο είναι η επαγωγή της άνθησης. Αυτή είναι η διαδικασία με την οποία το AMB, το οποίο είναι το σύνολο των διαιρούμενων κυττάρων που δημιουργεί τα περισσότερα από τα μέρη του φυτού που βρίσκονται πάνω από τις ρίζες, αποφασίζει ότι ήρθε η ώρα να σταματήσει να παράγει φύλλα, και να ξεκινήσει να παράγει άνθη (Bernier, 1988). Η επαγωγή γίνεται με διαφορετικούς τρόπους σε διαφορετικά φυτά. Στο *Arabidopsis* ο συνδυασμός εσωτερικών και περιβαλλοντικών σημάτων, όπως η ηλικία του φυτού, η διατροφική του κατάσταση, η διάρκεια της ημέρας, και σε ορισμένες ποικιλίες η θερμοκρασία, προσδιορίζει ότι το κορυφαίο μερίστωμα θα αλλάξει τη μοίρα του από βλαστικό σε ανθικό. Έπειτα ξεκινά το δεύτερο στάδιο όπου καθορίζεται η μοίρα του ανθικού μεριστώματος μέσω της δραστηριότητας των γονιδίων της ταυτότητας των ανθικών μεριστωμάτων καθώς γίνεται η παραγωγή των μεμονωμένων ανθέων πλευρικά του AMB. Αυτές οι ανθικές καταβολές προκύπτουν, από πρότυπες κυτταρικές διαιρέσεις, σε ένα καθορισμένο χρονικό και χωρικό πρότυπο. Το τρίτο στάδιο είναι ο σχηματισμός των καταβολών των οργάνων σε κάθε ανθική καταβολή μέσω της δραστηριότητας των γονιδίων της ταυτότητας των ανθικών οργάνων που ενεργοποιούνται από τα γονίδια της ταυτότητας των ανθικών μεριστωμάτων. Στο *Arabidopsis*, το τρίτο στάδιο της ανάπτυξης του άνθους είναι επομένως ο σχηματισμός των 15 αδιαφοροποίητων καταβολών των οργάνων, σε



μονοπατιών άνθησης. Το *Arabidopsis* αποτελεί ένα εξαιρετικό σύστημα-μοντέλο για να γίνει η προσέγγιση αυτής της πολυπλοκότητας. Ως εκ τούτου, οι γενετικές αλληλεπιδράσεις που ελέγχουν την ανθική μετάβαση στο *Arabidopsis* έχουν περιγραφεί με ένα μοντέλο που συνεχώς εκσυγχρονίζεται και αναθεωρείται καθώς νέα δεδομένα γίνονται διαθέσιμα. Μελέτες στο φυτό αυτό έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση των συστατικών εντός των σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν την άνθηση και στην τοποθέτησή τους εντός των μοριακών ιεραρχιών. Επιπλέον, διακριτά μονοπάτια σήμανσης είναι γνωστό ότι συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των ίδιων γονιδίων χρόνου άνθησης. Αυτή η σύγκλιση των μονοπατιών σε μία κοινή ομάδα γονιδίων μπορεί να εξαναγκάσει την ενσωμάτωση διαφορετικών αποκρίσεων, έτσι ώστε το φυτό να μπορεί να παράγει μία συνδιοργανωμένη απόκριση άνθησης υπό συνθήκες στις οποίες πολλαπλές περιβαλλοντικές παράμετροι μεταβάλλονται παράλληλα (Mouradov et al., 2002).

#### 1.4.1 Μονοπάτια άνθησης

Στα φυτά, η επιτυχής αναπαραγωγή και η επακόλουθη ανάπτυξη των σπόρων και των καρπών εξαρτώνται από την ανθοφορία στη σωστή στιγμή. Αυτό περιλαμβάνει το συντονισμό της ανθοφορίας με την κατάλληλη εποχή και με την αναπτυξιακή ιστορία του φυτού. Η γενετική και μοριακή ανάλυση στο *Arabidopsis*, αποκάλυψε διαφορετικά αλλά συνδεδεμένα μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για την ανίχνευση των κύριων εποχιακών συνθημάτων, την διάρκεια της ημέρας και την χαμηλή θερμοκρασία, καθώς και άλλων τοπικών περιβαλλοντικών και εσωτερικών σημάτων (Εικόνα 1.7). Η εξισορρόπηση των σημάτων από αυτές τις πορείες συμπληρώνεται από ένα κοινό σύνολο γονιδίων ώστε να καθορισθεί το πότε επέρχεται η ανθοφορία. Η συντέλεση της άνθησης την κατάλληλη στιγμή απαιτεί την αντίληψη και επεξεργασία ενός ευρέως φάσματος περιβαλλοντικών και εσωτερικών σημάτων. Αυτά πρέπει να ενταχθούν σε μια ενιαία απόφαση, για το αν η άνθηση θα λάβει χώρα ή όχι (Putterill et al., 2004).



**Εικόνα 1.7: Μονοπάτια ελέγχου του χρόνου άνθησης στο *Arabidopsis*.** Οι θετικές ρυθμιστικές σχέσεις υποδεικνύονται με βέλη, ενώ οι αρνητικές με γραμμές με τυφλά άκρα.

Μέσω της μοριακής γενετικής του *Arabidopsis* έχει διερευνηθεί το πώς αυτά τα διαφορετικά σήματα εντοπίζονται και επεξεργάζονται. Αρκετά διαφορετικά, πλην όμως

συνδεόμενα, γενετικά μονοπάτια χρόνου άνθησης έχουν εντοπιστεί. Τα εν λόγω μονοπάτια ρυθμίζουν την απόκριση του χρόνου άνθησης στα ερεθίσματα φωτός και θερμοκρασίας ή σε εσωτερικά σήματα (ορμόνη γιββερελλίνη και αυτόνομο μονοπάτι) (Blazquez et al., 2003; Mouradov et al., 2002; Halliday et al., 2003; Simpson and Dean, 2002; Cerdan and Chory, 2003; Moon et al., 2003; Sung et al., 2003). Χάρη στην ολοκλήρωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *Arabidopsis* έχουν διεξαχθεί εκτεταμένα πειράματα μεταλλαξιγένεσης με σκοπό να ανακαλυφθούν τα γονίδια που ρυθμίζουν τον χρόνο άνθησης και έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση πολλών μεταλλαγμάτων του *Arabidopsis*. Η απόκριση των μεταλλαγμάτων αυτών ως προς τον χρόνο άνθησης στις περιβαλλοντικές μεταχειρίσεις, όπως η εαρινοποίηση και η φωτοπερίοδος, συνδυαζόμενη με γενετικές αναλύσεις της επίστασης, έχουν εγκαθιδρύσει την ύπαρξη τουλάχιστον τεσσάρων μονοπατιών που ελέγχουν τον χρόνο άνθησης στο *Arabidopsis*.

#### 1.4.1.α Μονοπάτι φωτοπεριόδου μακράς ημέρας

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που ελέγχουν τον χρόνο άνθησης στις εύκρατες περιοχές είναι η διάρκεια της καθημερινής περιόδου φωτός ή φωτοπεριόδου. Τα φυτά που ανθίζουν ως απόκριση της φωτοπεριόδου είναι κατηγοριοποιημένα σε μικρής ημέρας, μεγάλης ημέρας ή ουδέτερα ως προς τη μέρα. Το *Arabidopsis* είναι ένα φυτό προαιρετικά μεγάλης ημέρας που αν και μπορεί να ανθίσει σε μικρές ημέρες, ανθίζει πολύ πιο γρήγορα σε μεγάλες ημέρες της άνοιξης και του καλοκαιριού (16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Μοριακές-γενετικές προσεγγίσεις έχουν υποδείξει ένα μονοπάτι υπεύθυνο για πρώιμη άνθηση ως απόκριση σε επαγόμενες μακρές φωτοπεριόδους και ένα GA-μεσολαβούμενο μονοπάτι που προάγει την άνθηση υπό μικρές ημέρες. Παράλληλα οι εν λόγω έρευνες, μέσω μεταλλάξεων στο *Arabidopsis*, έχουν ταυτοποιήσει γονίδια που απαιτούνται για την απόκριση στο μήκος της ημέρας και ορισμένα από αυτά κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες εξειδικευμένα εμπλεκόμενες στην ρύθμιση της άνθησης, ενώ άλλα κωδικοποιούν συστατικά των μονοπατιών μετάδοσης σήματος φωτός ή εμπλέκονται στην λειτουργία του κίρκαδικού ρολογιού. Τα μεταλλάγματα καθυστερημένης άνθησης καθορίζουν τα γονίδια που προάγουν την ανθοφορία, ενώ τα μεταλλάγματα πρόωρης άνθησης καθορίζουν τα γονίδια που αναστέλλουν τη μετάβαση στην άνθηση (Huang, et al., 2005; Mouradov et al., 2002; Koornneef et al., 1998b; Levy and Dean, 1998).

Το σήμα του μήκους της ημέρας γίνεται αντιληπτό στο φύλλο, μεταφέρεται μέσω των στοιχείων του φλοιώματος και καταλήγει στην κορυφή του βλαστού, όπου ξεκινά η ανθοφορία. Αυτό το σήμα μερικές φορές αναφέρεται ως ανθικό ερέθισμα ή ανθογόνο (florigen) (Corbesier and Coupland, 2006; Colasanti and Sundaresan, 2000). Τα φυτά ανιχνεύουν το φως από τουλάχιστον πέντε περιοχές του ορατού φάσματος με τη χρήση τουλάχιστον τριών τάξεων φωτοϋποδοχέων. Το μπλε φως και το υπεριώδες-A ανιχνεύονται από τα κρυπτοχρώματα, το κόκκινο (R) και το υπέρυθρο (FR) από τα φυτοχρώματα ενώ το υπεριώδες-B από έναν ακόμη μη χαρακτηρισμένο φωτοϋποδοχέα. Στο *Arabidopsis*, υπάρχουν τουλάχιστον πέντε φυτοχρώματα (PHYA έως PHYE) και δύο κρυπτοχρώματα (CRY1 και CRY2). Αυτοί οι φωτοϋποδοχείς έχουν χαρακτηριστεί από την επίδραση που έχουν στην μορφογένεση των φυταρίων υπό διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (Thomas and Vince-Prue, 1997).

Το μονοπάτι μακράς ημέρας ξεκινά με τους φωτοϋποδοχείς (όπως οι PHYA και CRY2), οι οποίοι ξεκινούν σήματα που αλληλεπιδρούν με ένα κίρκαδικό ρολόι και εισέρχονται στον κίρκαδικό ρυθμό. Κατά κάποιον τρόπο, το μήκος της ημέρας υπολογίζεται και όταν το μήκος της σκοτεινής περιόδου μειωθεί κάτω από ένα κρίσιμο σημείο, γονίδια που προάγουν την άνθηση, (όπως το *CO*) ενεργοποιούνται. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί με τη σειρά της σε ανοδική ρύθμιση των γονιδίων ταυτοποίησης ανθικού μεριστώματος και συνεπώς στην άνθηση. Τα *CONSTANS (CO)*, *CRYPTOCHROME2/FHA (CRY2)*, *GIGANTEA (GI)*,

*FLOWERING LOCUS T (FT)* και *FWA* αποτελούν τμήμα αυτού του μονοπατιού προώθησης μακράς ημέρας (Koornneef et al., 1991). Το *CO* είναι το τελευταίο που δρα από τα γνωστά γονίδια που εξειδικεύονται σε αυτό το μονοπάτι. Επίσης όλα τα άλλα γονίδια δρουν και σε άλλα μονοπάτια ή έχουν πιο γενικές επιδράσεις. Τα *FT* και *FWA* δρουν καθοδικά του *CO*, ενώ τα *GI* και *CRY2* δρουν ανοδικά του *CO* (Suarez-Lopez et al., 2001; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Onouchi et al., 2000; Guo et al., 1998).

Έχει δειχτεί ότι το επίπεδο της δραστηριότητας *CO* στο *Arabidopsis* είναι κατά άμεσο τρόπο συνδεδεμένο με τον χρόνο άνθησης (M. Piñeiro and G. Coupland, 1998). Η επαγωγή της δραστηριότητας του *CO* είναι επαρκής ώστε να προκαλέσει γρήγορα την άνθηση υπό μικρές ημέρες και να ξεκινήσει την μεταγραφή των *LEAFY (LFY)* και *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* τόσο σύντομα όσο αυτά τα γονίδια επάγονται για μεταφορά σε επαγωγικές φωτοπεριόδους (Simon et al., 1996). Το *CO* φαίνεται ότι προωθεί την άνθηση με την άμεση ανοδική ρύθμιση της έκφραση των γονιδίων *FT* και *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)* (Hayam and Coupland, 2003). Πάντως, τα επίπεδα του *AP1* mRNA αυξάνονται πιο αργά μετά την ενεργοποίηση του *CO* συγκριτικά με την απόκριση σε επαγωγικές φωτοπεριόδους (Simon et al., 1996). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το *CO* δρα σε ένα μονοπάτι που είναι επαρκές για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των *LFY* και *TFL1* αλλά αυτή η γρήγορη ενεργοποίηση του *AP1* απαιτεί ένα επιπρόσθετο μονοπάτι. Συμπερασματικά, το *CO* φαίνεται να μεσολαβεί μεταξύ του κερκαδικού ρολογιού και του γονιδίου του χρόνου άνθησης *FT* (Suarez-Lopez et al., 2001). Αυτό το μοντέλο υποδηλώνει ότι το κερκαδικό ρολόι δρα εντός του μονοπατιού μεγάλης ημέρας για να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων όπως το *CO* και το *FT*.

Στο *Arabidopsis*, η ποιότητα του φωτός επηρεάζει τον χρόνο άνθησης με το R φως να εμποδίζει και το FR φως να επάγει την άνθηση (Martínez-Zapater et al., 1994). Το μπλε φως από μόνο του προάγει την άνθηση στο *Arabidopsis* μέσω των *CRY2* και *CO*, και το προϊόν του γονιδίου *FHA* έχει δειχτεί να κωδικοποιεί το *CRY2* (Guo et al., 1998). Το *CRY1* εμπλέκεται στην προώθηση της άνθησης, αλλά η αλληλεπίδρασή του με τα μονοπάτια ανθικής προώθησης είναι ασαφής. Στο κόκκινο φως, το *PHYB* λειτουργεί υπό το καταστολή της λειτουργίας *CO* (Putterill et al., 1995). Στο μπλε φως, το *CRY2* αναστέλλει το *PHYB* και επάγει την άνθηση (Lin et al., 1998).

Αρκετά γονίδια που επηρεάζουν την φωτοπεριοδική ευαισθησία και που μπορεί να κωδικοποιούν συστατικά του κερκαδικού ρολογιού έχουν ταυτοποιηθεί. Τα *TOC1*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* και *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* μπορεί να δρουν σε μία αρνητική ανατροφοδοτούμενη λούπα, στην οποία η έκφραση των *LHY* και *CCA1* αυξάνεται το πρωί και καταστέλλεται η έκφραση του *TOC1*. Με βάση αυτό το μοντέλο, τα *LHY* και *CCA1* ανατροφοδοτούνται για να καταστείλουν την ίδια τους την έκφραση, και καθώς τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα πέφτουν, η έκφραση του *TOC1* αυξάνεται. Το *TOC1*, με τη σειρά του, προάγει την έκφραση των *LHY* και *CCA1*, ξεκινώντας έτσι έναν άλλο κύκλο (Alabadi et al., 2001; Kim et al., 2003). Αυτή η ανατροφοδοτούμενη λούπα μπορεί να ρυθμίζει τον χρόνο άνθησης καθορίζοντας την στιγμή της ημέρας όπου τα γονίδια του χρόνου άνθησης στο μονοπάτι μεγάλης ημέρας, όπως τα *CO* και *GI*, εκφράζονται.

Το γονίδιο *GI* προάγει την έκφραση του *CO* ενώ το *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* καταστέλλει την έκφραση του *CO* και είναι αναγκαίο για την εισαγωγή του ρολογιού σε μεγάλες ημέρες καθώς είναι ένας καταστολέας της σήμανσης του φωτός που καταστέλλει την είσοδο του φωτός στο ρολόι κατά τη διάρκεια της νύχτας. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το *ELF3* δεσμεύει το *PHYB* αναστέλλοντας έτσι τη δραστηριότητα αυτού του φωτοϋποδοχέα (Millar, 2003). Συνοπτικά οι λειτουργίες των γονιδίων *LHY*, *CCA1*, *ELF3* και *TOC1* επεξεργάζονται το φυσικό σήμα. Το επεξεργασμένο σήμα διαβιβάζεται στο γονίδιο *GI* και το σήμα που προκύπτει ενεργοποιεί το γονίδιο *CO*.

### 1.4.1.β Αυτόνομο μονοπάτι

Το αυτόνομο μονοπάτι ταυτοποιήθηκε μέσω μίας ομάδας μεταλλάγματων που καθυστερούν την άνθηση υπό όλες τις φωτοπεριόδους και είναι υψηλά ανταποκρινόμενα στην εαρινοποίηση. Αυτά τα μεταλλάγματα περιλαμβάνουν τα *fca*, *fy*, *fpa*, *ld* και *five*. Επειδή τα προϊόντα των αντίστοιχων αγρίου τύπου γονιδίων φαίνονται να προάγουν την άνθηση ανεξάρτητα της φωτοπεριόδου, αυτά τα γονίδια θεωρείται ότι δρουν στο αυτόνομο μονοπάτι προώθησης. Επιπλέον, το γεγονός ότι αυτά τα μεταλλάγματα αποκρίνονται στην εαρινοποίηση δείχνει ότι το προωθητικό μονοπάτι εαρινοποίησης δρα σε πλεονασμό με το αυτόνομο μονοπάτι προώθησης (Martinez-Zapater and Somerville, 1990; Koornneef et al., 1991, 1998a; Mouradov et al., 2002). Τα μεταλλάγματα αυτά περιέχουν πολύ υψηλότερα επίπεδα του *FLOWERING LOCUS C (FLC)* mRNA από ότι τα αγρίου τύπου φυτά ή τα καθυστερημένης άνθησης μεταλλάγματα που επηρεάζονται από τα μονοπάτια μακράς ημέρας ή GA (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999). Έτσι, στα μεταλλάγματα του αυτόνομου μονοπατιού φαίνεται να καθυστερεί η άνθηση προκαλώντας αυξημένη έκφραση του *FLC*, και συνεπώς σε αγρίου τύπου φυτά αυτό το μονοπάτι μπορεί να θεωρηθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του *FLC*.

Ο κύριος στόχος των γονιδίων του αυτόνομου μονοπατιού, κατά συνέπεια είναι το *FLC* ένας *MADS*-τομέας παράγοντας μεταγραφής που καταστέλλει την άνθηση. Είναι ενδιαφέρον ότι, τα γονίδια αυτά καταστέλλουν την έκφραση του *FLC* χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς (Simpson, 2004; Michaels and Amasino, 2001).

Αρκετά από τα γονίδια εντός του αυτόνομου μονοπατιού έχουν κλωνοποιηθεί. Δύο από αυτά τα γονίδια, το *LD* και το *FCA*, κωδικοποιούν πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργία μπορεί να είναι η ρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων. Η πρωτεΐνη *LD* μπορεί να κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα ενώ η *FCA* δείχθηκε να δεσμεύεται στο RNA *in vitro* (Lee et al., 1994). Εντυπωσιακά, το *FPA* επίσης κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη δέσμησης RNA, υποδηλώνοντας ότι η μετα-μεταγραφική ρύθμιση μπορεί να παίζει έναν γενικό ρόλο στο μονοπάτι (Schomburg et al., 2001). Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του *FCA* με τα γονίδια μεριστωματικής ταυτότητας δείχνει ότι η λειτουργία του *FCA* είναι απαραίτητη τόσο για την ενεργοποίηση όσο και την ικανότητα απόκρισης στα γονίδια *LFY* και *AP1*. Υπερέκφραση του *FPA* προκαλεί σοβαρή πρόωπη άνθηση υπό μικρές μέρες, ενώ αυξημένη έκφραση του *FCA* είχε σχετικά μικρές επιδράσεις στον χρόνο άνθησης (Macknight et al., 1997; Schomburg et al., 2001). Και τα τρία γονίδια εκφράζονται με ένα παρόμοιο πρότυπο, με μέγιστη έκφραση στην κορυφή των φυτών και της ταξιανθίας και χαμηλά επίπεδα στα ώριμα φύλλα και τις ρίζες. Επιπροσθέτως, το *ID1* δρα ως ένας μεταγραφικός ρυθμιστής και απαιτείται για να παράγει και/ή να ρυθμίσει ένα σήμα που δημιουργείται σε ανώριμα φύλλα και επηρεάζει την αναπαραγωγική ανάπτυξη στο *AMB*.

Το αυτόνομο μονοπάτι, πιθανώς δρα διαμορφώνοντας το μονοπάτι μακράς ημέρας και το μονοπάτι των γιββερελλινών καθώς το *FLC* ανταγωνίζεται την δραστηριότητα αυτών των μονοπατιών που προωθούν την ανθοφορία, με την καταστολή του συνόλου των γονιδίων-στόχων που ενεργοποιούνται από αυτά (Simpson and Dean, 2002; Blazquez and Weigel, 2000; Herpworth et al., 2002). Αυτή η επίδραση του *FLC* είναι δόσοεξαρτώμενη, και ως εκ τούτου το *FLC* λειτουργεί ως ένας ροοστάτης που καθορίζει την ικανότητα του μονοπατιών άνθησης του *Arabidopsis* να ανταποκριθούν στα επαγωγικά συνθήματα. Ελέγχοντας το *FLC*, η αυτόνομη πορεία καθορίζει το επίπεδο στο οποίο δρα αυτός ο ροοστάτης. Το αυτόνομο μονοπάτι, ως εκ τούτου, προάγει την άνθηση έμμεσα, με τη διευκόλυνση της ανταπόκρισης στα συνθήματα που προωθούν ενεργά την ανθοφορία (Simpson, 2004).

Παρότι όλες οι μεταλλάξεις του αυτόνομου μονοπατιού δρουν αυξάνοντας την έκφραση του *FLC*, γενετικές αποδείξεις υποδηλώνουν ότι μπορεί να μην δρουν όλες σε ένα απλό γραμμικό μονοπάτι, δείχνοντας έναν πολύ ευρύτερο ρόλο αυτών των γονιδίων στην φυτική ανάπτυξη από την απλή ρύθμιση του χρόνου άνθησης (Koornneef et al., 1998a).

#### 1.4.1.γ Μονοπάτι εαρινοποίησης

Η έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες για αρκετές εβδομάδες (εαρινοποίηση) συχνά επιταχύνει την άνθηση. Η ευερεθιστότητα σε αυτή τη μεταχείριση μπορεί να διαφέρει διακριτά μεταξύ των ποικιλιών ενός είδους. Πολλοί οικότυποι του *Arabidopsis* για να ανθίσουν απαιτούν έκθεση σε μία περίοδο ψυχρής θερμοκρασίας για 4 έως 8 εβδομάδες αλλά θα ανθίσουν πολύ αργά εάν δεν εκτεθούν σε μεταχείριση εαρινοποίησης (Michaels and Amasino, 2000). Το πεδίο αντίληψης της εαρινοποίησης είναι η βλαστική κορυφή αλλά όλα τα ενεργά διαχωριζόμενα κύτταρα, όχι μόνο αυτά της βλαστικής κορυφής, μπορεί να είναι ικανά να αποκρίνονται στην εαρινοποίηση (Curtis and Chang, 1930; Metzger, 1988; Wellensiek, 1964). Σε αντίθεση με την φωτοπεριοδική επαγωγή, η εαρινοποίηση προετοιμάζει το φυτό να ανθίσει αλλά δεν προκαλεί από μόνη της την άνθηση οδηγώντας το μερίστωμα να απαντήσει στα περιβαλλοντικά και αναπτυξιακά σήματα άνθησης (Michaels and Amasino, 2001). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει σαφής χρονικός διαχωρισμός μεταξύ της ψυχρής μεταχείρισης και της άνθησης, που συνήθως λαμβάνει χώρα μετά από μία περίοδο αύξησης σε θερμότερες θερμοκρασίες.

Το FLC κωδικοποιεί έναν MADS-box μεταγραφικό παράγοντα που δρα ως καταστολέας της άνθησης και η υψηλού επιπέδου έκφραση του *FLC* σχετίζεται με την απαίτηση για εαρινοποίηση των ετήσιων χειμερινών ποικιλιών (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999; 2000). Ο βασικός ρόλος του FLC είναι να καταστέλλει την άνθηση, αναστέλλοντας την έκφραση των *FT* και *SOC1* (Mouradon et al., 2002). Αυτό είναι αντίθετο με την λειτουργία του *CO*, που προωθεί την άνθηση σε μεγάλες ημέρες, και το οποίο ενεργοποιεί αυτά τα γονίδια. Η σύνδεση μεταξύ του *FLC* και της εαρινοποίησης ισχυροποιήθηκε από την επίδειξη ότι η αφθονία του *FLC* mRNA πέφτει όταν τα φυτά εκτίθενται στο κρύο και ότι αυτή η ελάττωση λαμβάνει χώρα σταδιακά με έναν τρόπο που είναι σύμφωνος με την σταδιακή επίδραση στον χρόνο άνθησης. Επομένως, το αυτόνομο μονοπάτι και το μονοπάτι εαρινοποίησης διασταυρώνονται εν μέρει καθώς συσχετίζονται με το *FLC* (Komeda, 2004).

Παρότι το FLC παίζει κεντρικό ρόλο στην εαρινοποίηση, αυτό πιθανώς δεν εξηγεί όλη την απόκριση στην εαρινοποίηση καθότι τα μεταλλάγματα που φέρουν σιωπηλούς αλληλομόρφους του FLC δείχνουν απόκριση στην εαρινοποίηση (Michaels and Amasino, 2001). Υπάρχει μία ομάδα MADS-box μεταγραφικών παραγόντων στενά συσχετισμένη με το *FLC* και μερική μείωση μεταξύ αυτών μπορεί να εξηγήσει την ικανότητα των μεταλλαγμάτων *flc* για απόκριση στην εαρινοποίηση (Ratcliffe et al., 2001; Scortecchi et al., 2001). Αδράνεια τουλάχιστον ενός από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες, *FLM*, προκαλεί πρόωρη άνθηση ενώ η υπερέκφρασή του καθυστερεί την άνθηση (Scortecchi et al., 2001). Εντούτοις κανένα από αυτά τα γονίδια δεν ρυθμίζεται από την εαρινοποίηση κατά παρόμοιο τρόπο με το *FLC*. Υπάρχουν επίσης αποδείξεις ότι η εαρινοποίηση δεν δρα απλά για να μειώσει την έκφραση ενός παρεμποδιστή της άνθησης όπως του *FLC*, αλλά προάγει πιο ενεργά την άνθηση (Michaels and Amasino, 2001; Reeves and Coupland, 2001).

Το προϊόν του γονιδίου FRIGIDA (*FRI*) κατά κάποιον τρόπο αυξάνει την αφθονία του *FLC* mRNA (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999). Διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια, *FLC* και *FRI*, δρουν συνεργατικά για την απόκτηση της απαίτησης για εαρινοποίηση. Η μοριακή γενετική ανάλυση των *FRI/FLC* υποδεικνύει ότι η εαρινοποίηση δρα με μείωση της έκφρασης του *FLC* ως απόκριση σε εκτεταμένη έκθεση στο κρύο. Η έκφραση του *FLC* δείχνει κοινά χαρακτηριστικά με την κατάσταση εαρινοποίησης. Αυτά τα χαρακτηριστικά της εαρινοποίησης δείχνουν ομοιότητες στον επιγενετικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και οδήγησαν στην άποψη ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από την μεθυλίωση μπορεί να αποτελεί τη βάση της εαρινοποίησης. Ως εκ τούτου, ένας επιγενετικός μηχανισμός πιθανώς να είναι υπεύθυνος για την εγκαθίδρυση, διατήρηση και επαναρύθμιση των εκάστοτε αυτοδαιωνιζόμενων αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια ή μεταγενέστερα της έκθεσης στο κρύο.



Τα μεταλλάγματα εαρινοποίησης στο *Arabidopsis (vrn)* εμποδίζουν την καταστολή της έκφρασης του FLC με έκθεση στο κρύο και μπορεί να είναι ελαττωματικά είτε στην αντίληψη της χαμηλής θερμοκρασίας είτε στην μετάδοση του ψυχρού σήματος από το μονοπάτι προώθησης της εαρινοποίησης (Chandler et al., 1996). Εντοπίστηκαν δύο γονίδια αρμόδια για τη διαδικασία της εαρινοποίησης, τα *VRN1* και *VRN2*. Το γονίδιο *VRN2* ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση με την τροποποίηση της δομής της χρωματίνης (Birve et al., 2001; Gendall et al., 2001). Ο ρόλος του είναι η διατήρηση της εαρινοποιημένης κατάστασης διατηρώντας την καταστολή της έκφρασης *FLC* ενώ δεν απαιτείται για την αρχική απόκριση στο κρύο. Ένα γονίδιο που εμφανίζεται να ρυθμίζει την απόκριση στο κρύο είναι το *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1)* (Lee et al., 2001; Ishitani et al., 1998).

#### 1.4.1.6 Μονοπάτι γιββερελλινών

Ο αυξητικός ρυθμιστής GA (γιββερελλινικό οξύ) προάγει την άνθηση στο *Arabidopsis* (Wilson et al., 1992; Putterill, et al., 1995; Blazquez et al., 1998). Αυτό αρχικά δείχθηκε από εφαρμογές εξωγενούς GA, που προκάλεσαν πρόωρη άνθηση των αγρίου τύπου φυτών, και μελετήθηκε αργότερα μέσω μεταλλάξεων που διακόπτουν είτε την βιοσύνθεση είτε τη σηματοδότηση του GA (Wilson et al., 1992). Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν επίσης επιδράσεις σε πολλές άλλες πλευρές της φυτικής αύξησης και ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένων της επιμήκυνσης του μίσχου, της γονιμοποίησης και της ανθικής ανάπτυξης.

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την βιοσύνθεση του GA στο *Arabidopsis* και τα μεταλλαγμένα γονίδια κλωνοποιήθηκαν. Μερικά από αυτά είναι τα γονίδια *GA1*, *GA4* και *GA5* και φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στην ρύθμιση του χρόνου άνθησης. Το *GA1* κωδικοποιεί ένα ένζυμο που καταλύει το πρώτο βήμα που συντελείται στην βιοσύνθεση του GA (Sun and Kamiya, 1994). Το αντίστοιχο μετάλλαγμα, είναι ανίκανο να ανθίσει σε μικρές ημέρες και ανθίζει πιο καθυστερημένα από ότι ο άγριος τύπος σε μεγάλες ημέρες (Wilson et al., 1992). Αυτά τα φυτά επίσης εμφανίζουν σοβαρό νανισμό, Σε αντίθεση με τα *ga1*, τα μεταλλάγματα *ga4* και *ga5*, έχουν λιγότερο σοβαρές επιδράσεις, αναπτύσσοντας ημιανάνα φυτά που παράγουν γόνιμα άνθη με φυσιολογικά *siliques* (Koorneef and van der Veen, 1980). Τα *ga4* και *ga5* μεταλλάγματα είναι ελαττωματικά στην δραστηριότητα ενζύμων που ενδεχομένως είναι εμπλεκόμενα σε ένα ρυθμιστικό βήμα στην βιοσύνθεση του GA (Talon et al., 1990; Xu et al., 1995).

Ο ρόλος του GA στον έλεγχο της άνθησης επίσης υποδηλώνεται και από γονίδια που εμπλέκονται στην σηματοδότηση του GA. Τρία συνδεδεμένα γονίδια με ρόλους-κλειδί στην σηματοδότηση του GA, τα *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)* και *RGA-LIKE 1 (RGL1)* έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες. Τα παραπάνω γονίδια πιστεύεται ότι παρεμποδίζουν τις αποκρίσεις στο GA απουσία ενεργού GA, και ότι το GA καταστέλλει αυτή την παρεμπόδιση. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο οι αποκρίσεις στο GA λαμβάνουν χώρα απουσία GA εάν τα *GAI*, *RGA*, και *RGL1* είναι αδρανοποιημένα. Παράλληλα, το *RGL1* μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των σεπάλων και των πετάλων. Επιπλέον η ακολουθία DELLA φαίνεται να παίζει έναν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό μέσω του οποίου το GA παρεμποδίζει την λειτουργία των *GAI*, *RGA* και *RGL1* (Mouradov et al., 2002).

Το γονίδιο *SPY* κωδικοποιεί άλλον έναν αρνητικό ρυθμιστή των αποκρίσεων GA που επηρεάζει τον χρόνο άνθησης (Jacobsen and Olszewski, 1993). Ο τρόπος με τον οποίο το γονίδιο αυτό δρα για να ρυθμίσει τις αποκρίσεις στο GA δεν είναι γνωστός, αλλά γενικώς δρα ανοδικά του *GAI*, και μπορεί να απαιτείται για την δραστηριότητα των *GAI/RGA*. Άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι σήμανσης του GA και στην ρύθμιση του χρόνου άνθησης είναι τα *PHOTOPERIOD RESPONSIVE 1 (PHOR1)*, *FPF1*, και *SHI*. Το *PHOR1* αρχικά

ταυτοποιήθηκε στην πατάτα και δεν ενσωματώθηκε εντός του μονοπατιού μετάδοσης σήματος του *Arabidopsis* (Amador et al., 2001). Ίσως δρα ανοδικά του RGA και θα μπορούσε να εμπλέκεται στην αποσύνθεσή του ως απόκριση στο GA, παρότι δεν υπάρχει άμεση απόδειξη για αυτό. Το *FPF1* προτάθηκε ότι προάγει την άνθηση μέσω του μονοπατιού GA. Τέλος, η κυρίαρχη μετάλλαξη *shi* προκαλεί έναν φαινότυπο παρόμοιο με το μετάλλαγμα που είναι ελλειπτικό σε GA, συμπεριλαμβανομένης της καθυστερημένης άνθησης (Fridborg et al., 1999; 2001).

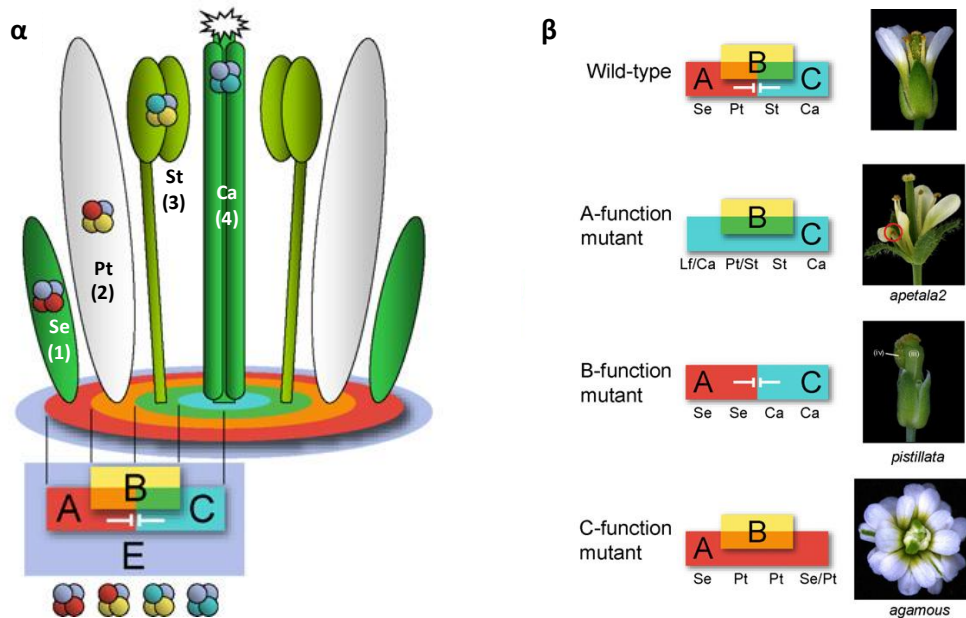
Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει γενετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μονοπατιού GA και άλλων μονοπατιών χρόνου άνθησης. Επί παραδείγματι, το μονοπάτι GA θεωρείται ότι πιθανώς δρα παράλληλα στο μονοπάτι μακράς ημέρας επειδή υπάρχει πλεονασμός μεταξύ των μεταλλάξεων που επηρεάζουν τα δύο αυτά μονοπάτια. Η επίδραση των μεταλλάξεων που επιφέρουν βλάβες στο μονοπάτι GA είναι μεγαλύτερη υπό μικρές ημέρες (Putterill et al., 1995; Reeves and Coupland, 2001). Αυτό υποδηλώνει ότι σε μικρές ημέρες, όπου το μονοπάτι μακράς ημέρας δεν είναι ενεργό, το GA είναι το κυρίαρχο μονοπάτι άνθησης και απώλεια της λειτουργίας αυτού του μονοπατιού μπορεί να αποτρέπει την άνθηση. Υπό μεγάλες ημέρες, η επίδραση της αδρανοποίησης του μονοπατιού GA είναι λιγότερο σοβαρή εξαιτίας της δραστηριότητας του μονοπατιού μακράς ημέρας. Σειρές πειραμάτων έχουν δείξει ότι το μονοπάτι του GA ρυθμίζει τα ίδια γονίδια χρόνου άνθησης όπως τα άλλα μονοπάτια του χρόνου άνθησης (Borner et al., 2000; Lee et al., 2000; Samach et al., 2000). Ένας τρόπος με τον οποίο οι GAs προάγουν την άνθηση είναι αυξάνοντας την μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου ταυτότητας του ανθικού μεριστώματος *LEAFY (LFY)* (Blazquez et al., 1998; Melzer et al., 1999).

#### 1.4.2 Το μοντέλο ABCE

Η σύγχρονη έρευνα στην ανθική εξέλιξη και την ανθική ανάπτυξη έχει ως υποκείμενο πλαίσιο της το μοντέλο που διατυπώθηκε με την ανακάλυψη μιας σειράς γονιδίων. Τα γονίδια αυτά δρουν από κοινού, σε ένα φαινομενικά απλό συνδυαστικό μοντέλο, με σκοπό να καθοριστεί η ταυτότητα των τεσσάρων τύπων οργάνων που συνθέτουν ένα τέλειο άνθος. Είναι ευρέως γνωστό ως το μοντέλο ABC και βασίζεται σε μια σειρά από ομοιοτικές μεταλλάξεις σε δύο είδη μοντέλα, το *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) και το *Antirrhinum majus* (*Plantaginaceae*) (Coen and Meyerowitz, 1991; Weigel and Meyerowitz, 1994; Bowman et al., 1989).

Το μοντέλο ABC πρότεινε ότι τρεις γονιδιακές λειτουργίες, A, B και C, που ενεργούν σε συνδυασμό, καθορίζουν τα όργανα που διαμορφώνουν τις τέσσερις σπείρες του άνθους (Εικόνα 1.8). Έκαστη εκ των A, B και C λειτουργιών θεωρείται ότι καταλαμβάνει δύο γειτονικές σπείρες, που επικαλύπτονται μεταξύ τους έτσι ώστε κάθε σπείρα ορίζεται από την έκφραση μιας μοναδικής λειτουργίας ή από τον συνδυασμό των λειτουργιών. Η έκφραση μόνο της C λειτουργίας στην σπείρα 4 προκαλεί τον σχηματισμό των καρπόφυλλων. Στη σπείρα 3 εκφράζονται οι B και C λειτουργίες, οι οποίες καθορίζουν τους στήμονες. Τα πέταλα σχηματίζονται στην σπείρα 2 λόγω της ταυτόχρονης έκφρασης των A και B λειτουργιών και η έκφραση μόνο της A λειτουργίας στην σπείρα 1 οδηγεί στα σέπαλα. Στο μοντέλο ABC είναι ενσωματωμένη η αμοιβαία καταστολή μεταξύ των A και C λειτουργιών για να εξηγήσει γιατί η C λειτουργία επεκτείνεται στις εξωτερικές σπείρες στις μεταλλάξεις της A λειτουργίας, που προκαλούν την ανάπτυξη αναπαραγωγικών οργάνων στις πρώτες σπείρες. Είναι σημαντικό ότι, παρόμοιες κατηγορίες μεταλλαγμάτων περιγράφηκαν και στο *Arabidopsis* και στο *Antirrhinum*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της ταυτότητας των οργάνων είναι ιδιαίτερα διατηρημένη στην εξέλιξη. Δεδομένου ότι το μοντέλο βασίστηκε σε ομοιοτικές μεταλλάξεις στα δύο αυτά πρότυπα είδη, θεωρείται ότι το μοντέλο ABC παρέχει ένα ενιαίο πλαίσιο για να εξηγήσει την ανάπτυξη του άνθους (Irish, 2010; Causier et al., 2010; Soltis et al., 2007).

Πολλά γονίδια έχουν αναγνωρισθεί ότι δρουν ως ρυθμιστές κλειδιά στον καθορισμό της ταυτότητας των ανθικών οργάνων στα *Arabidopsis* και *Antirrhinum*. Στο *Arabidopsis*, τα *APETALA1* (*AP1*) και *AP2* είναι τα γονίδια της A λειτουργίας, τα *AP3* και *PISTILLATA* (*PI*) είναι τα γονίδια της B λειτουργίας, και το *AGAMOUS* (*AG*) είναι το γονίδιο της C λειτουργίας (Keck et al., 2003).



**Εικόνα 1.8: Το μοντέλο ABCE και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν την ταυτότητα των οργάνων.** (α) Το μοντέλο ABCE. Διάγραμμα ενός μοντέλου άνθους με σέπαλα (Se) στην εξωτερική σπείρα (1), πέταλα (Pt) στην σπείρα 2, στήμονες (St) στην σπείρα 3, και καρπόφυλλα (Ca) στην σπείρα 4. Κάτω από το άνθος είναι το μοντέλο ABC. Στην πρώτη σπείρα εκφράζονται τα γονίδια της A λειτουργίας (κόκκινο). Στην σπείρα 2 συν-εκφράζονται (πορτοκαλί) τα γονίδια των A και B λειτουργιών (κίτρινο). Στην τρίτη σπείρα οι B και C (μπλε) λειτουργίες δρουν μαζί (πράσινο), ενώ στην τέταρτη σπείρα η C λειτουργία δρα μόνη της. Το μοντέλο ABC προβλέπει την αμοιβαία καταστολή μεταξύ των A και C-λειτουργιών, όπως υποδεικνύεται από τις γραμμές με τα τυφλά άκρα. Η λειτουργία E (μωβ), καθορίζει το ανθικό πλαίσιο στο οποίο λειτουργούν τα γονίδια ABC. Οι πρωτεΐνες της E λειτουργίας σχηματίζουν σύμπλοκα με τους κατάλληλους παράγοντες ABC ώστε να κατευθύνουν την ταυτότητα των ανθικών οργάνων. Κάθε σύμπλοκο αποτελείται από μία τετράδα MADS-box παραγόντων που αλληλεπιδρούν μέσω της αλληλουχίας του C-τελικού άκρου των πρωτεϊνών. (β) Μεταλλάγματα *Arabidopsis* από τα οποία προτάθηκε το μοντέλο ABC. Στην κορυφή είναι το άνθος άγριου τύπου. Κάτω από αυτό απεικονίζεται ένα μετάλλαγμα της A λειτουργίας όπου η απώλεια των γονιδίων A οδηγεί στην επέκταση της C λειτουργίας στις σπείρες 1 και 2. Στο *apetala2* μετάλλαγμα της A λειτουργίας που απεικονίζεται εδώ, τα σέπαλα μετατρέπονται σε δομές που ομοιάζουν με καρπόφυλλο ή φύλλα (ανάλογα με τον αλληλόμορφο), και τα πέταλα σε όργανα που ομοιάζουν με στήμονες (κυκλωμένος ανθήρας στην σπείρα 2). Στα μεταλλάγματα του *Arabidopsis* της B λειτουργίας όπως το *pistillata*, οι δύο πρώτες σπείρες έχουν ταυτότητα σέπαλων, και η τρίτη σπείρα μετατρέπεται σε ένα καρπόφυλλο. Στο κάτω μέρος απεικονίζεται το μετάλλαγμα *Arabidopsis* της C λειτουργίας, το *agamous*. Σύμφωνα με το ABC μοντέλο απώλεια της δράσης του C γονιδίου οδηγεί στην επέκταση της A-λειτουργίας σε όλες τις σπείρες του άνθους. Το αποτέλεσμα είναι η μετατροπή των αναπαραγωγικών οργάνων (στήμονες και καρπόφυλλα) σε όργανα του περιανθίου (σέπαλα και πέταλα) και η απώλεια του καθορισμού των ανθέων, δίνοντας φαινότυπο που μοιάζει με τριαντάφυλλο.

Πολλά από τα γονίδια ABC από διάφορα είδη, έχουν εντοπισθεί και με εξαίρεση το γονίδιο *APETALA2* (*AP2*) του *Arabidopsis* (και τα ομόλογά του), είναι MADS-box γονίδια, μια

μεγάλη οικογένεια ευκαρυωτικών γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που περιέχουν μία περιοχή δέσμησης DNA υψηλά συντηρημένη (MADS περιοχή) (Theissen et al., 2000; Jofuku et al., 1994). Οι MADS-box παράγοντες αποδεικνύονται καθοριστικοί ρυθμιστές των φυτικών αναπτυξιακών διαδικασιών, και στο *Arabidopsis* έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον 107 MADS-box γονίδια. Οι φυτικές MADS-box πρωτεΐνες ανήκουν σε δύο μεγάλες οικογένειες: την κατηγορία τύπου I και την κατηγορία τύπου II (Parenicova et al., 2003; Alvarez-Buylla et al., 2000). Τα ABC MADS-box γονίδια ανήκουν στην κατηγορία τύπου II, και χαρακτηρίζονται από τέσσερις διακριτούς τομείς. Το AP2 κωδικοποιεί ένα μέλος της AP2/EREBP οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, πράγμα που σημαίνει ότι ένα μεταγραφικό ρυθμιστικό δίκτυο έχει κεντρική σημασία για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των οργάνων (Weigel, 1995; Ditta et al., 2004)

Τα γονίδια *SEPALLATA* (*SEP1*, *2*, *3*, *4*) είναι λειτουργικά πλεονάζοντα στον καθορισμό της ταυτότητας των ανθικών οργάνων. Με βάση τις μελέτες στο *Arabidopsis*, οι A+E λειτουργίες είναι απαραίτητες για τα σέπαλα, οι A+B+E λειτουργίες για τα πέταλα, οι B+C+E λειτουργίες για τους στήμονες, και οι C+E λειτουργίες για τα καρπόφυλλα. Ως εκ τούτου, μια πιο κατάλληλη συντομογραφία για το σημερινό μοντέλο της ταυτότητας των ανθικών οργάνων στο *Arabidopsis* και το *Antirrhinum* είναι το μοντέλο ABCE (Εικόνα 1.8). Το «μοντέλο κουαρτέτο» εξηγεί πώς τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων των λειτουργιών ABCE μπορούν να αλληλεπιδράσουν για τον έλεγχο της ταυτότητας των ανθικών οργάνων (Honma and Goto, 2000; Theissen and Saedler, 2001). Οι πρωτεΐνες SEP σχηματίζουν τετραμερή σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες ABC και στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτά τα συγκροτήματα πρωτεϊνών αποτελείται από μία ή περισσότερες ABC πρωτεΐνες σε συνδυασμό με μια πρωτεΐνη SEP (Fan et al., 1997; Immink et al., 2009).

Το μοντέλο ABCE με την θέσπιση μιας περαιτέρω κατηγορίας MADS-box μεταγραφικών παραγόντων που απαιτούνται για τη δημιουργία του ανθικού πλαισίου, εξηγεί την ανικανότητα των γονιδίων ABC να προσδώσουν από μόνα τους ταυτότητα ανθικού οργάνου σε φύλλα. Όμως η συνδυασμένη εκτοπική έκφραση των γονιδίων SEP και ABC είναι αρκετή για να μετατρέψει φύλλα σε ανθικά όργανα (Honma and Goto, 2001; Pelaz et al., 2001). Τέλος είναι πιθανό να υπάρχει σημαντική αλληλεπικάλυψη στις διαδικασίες ελέγχου της λειτουργίας του ανθικού μεριστώματος και της ταυτότητας των οργάνων δεδομένου ότι έχει αποδειχτεί πως τα γονίδια *AP1*, *SEP3* και *AG* έχουν επιπλέον ρόλους στην εγκαθίδρυση του ανθικού μεριστώματος.

#### 1.4.3 Το γονίδιο *RABBIT EARS* (*RBE*)

Το γονίδιο *RABBIT EARS* (*RBE*) έχει αναγνωριστεί ως ρυθμιστής της ανάπτυξης των πετάλων στο *Arabidopsis thaliana*. Το *RBE* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη SUPERMAN (*SUP*)-like zinc-finger που εκφράζεται στα κύτταρα της δεύτερης σειράς κατά τα στάδια 3-6 της άνθησης. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στον πυρήνα και είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας. Περιέχει μία Cys2His2 zinc-finger περιοχή σύνδεσης DNA και μία ethylene-responsive element binding factor (ERF)-associated amphiphilic repression (*EAR*)-like περιοχή (Takeda et al., 2004). Η συναφής πρωτεΐνη SUPERMAN (*SUP*), η οποία περιέχει μία παρόμοια διατεταγμένη περιοχή zinc-finger και *EAR*-like μοτίβο, έχει δειχθεί ότι διαθέτει ικανότητες δέσμησης DNA και μεταγραφικής καταστολής (Dathan et al., 2002; Hiratsu et al., 2002)..

Το *RBE* εκφράζεται στις καταβολές των πετάλων και τα πρόδρομα κύτταρα τους, και η έκφραση αυτή εξαφανίζεται στα μεταγενέστερα στάδια. Συγκεκριμένα, η έκφραση του *RBE* ξεκινά από τα πρόδρομα κύτταρα των καταβολών των πετάλων στο στάδιο 3 της άνθησης και συνεχίζει στις αναπτυσσόμενες καταβολές των πετάλων μέχρι το στάδιο 6. Αυτά τα χαρακτηριστικά υποδηλώνουν πως το *RBE* απαιτείται για την έγκαιρη έναρξη και

ανάπτυξη των καταβολών των οργάνων της δεύτερης σπείρας κατά τα πρώιμα στάδια (Takeda et al., 2004).

Τα μεταλλάγματα *rbe* παρουσιάζουν παραμορφώσεις στα όργανα της δεύτερης σπείρας, όπως μεταβολές στη μορφολογία των πετάλων, τα πέταλα μπορεί να αντικατασταθούν με όργανα που μοιάζουν με στήμονες, ή νήματα ενώ ορισμένα άνθη *rbe* έχουν αυξημένο αριθμό σεπάλων ή παρουσιάζουν σύντηξη σεπάλων (Takeda et al., 2004). Το γονίδιο *AGAMOUS (AG)* δρα ως καταστολέας της ανάπτυξης στην δεύτερη σπείρα (Bowman et al., 1991; 1993) ενώ μελέτες δείχνουν ότι αυτές οι παραμορφώσεις των φυτών *rbe* οφείλονται στην εκτοπική του έκφραση στα κύτταρα της δεύτερης σπείρας και ότι το *RBE* δρα ως ένας καταστολέας της έκφρασης του *AG* στα άνθη του *Arabidopsis* (Krizek et al., 2006).

Επιπρόσθετα από τον προσδιορισμό της ταυτότητας των οργάνων της δεύτερης σπείρας, τα *AP1* και *AP2* απαιτούνται επίσης για την έναρξη των εν λόγω οργάνων. Άλλα γονίδια που προάγουν την έναρξη και την ανάπτυξη των καταβολών των οργάνων της δεύτερης σπείρας είναι τα *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*, *PETAL LOSS (PTL)*, *RABBIT EARS (RBE)* και *ROXY1*. Στο *Arabidopsis*, το *PTL* λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής στην πρώτη σπείρα, όπου περιορίζει το μέγεθος της ζώνης μεταξύ των σεπάλων, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό των ορίων μεταξύ των οργάνων αυτών (Brewer et al., 2004). Το *UFO* στοχεύει για αποικοδόμηση έναν καταστολέα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της δεύτερης σπείρας (Durfee et al., 2003; Samach et al., 1999). Έχει βρεθεί ότι το *RBE* δρα έπειτα από τα γονίδια *AP1*, *PTL* και *UFO* (Irish, 2008).

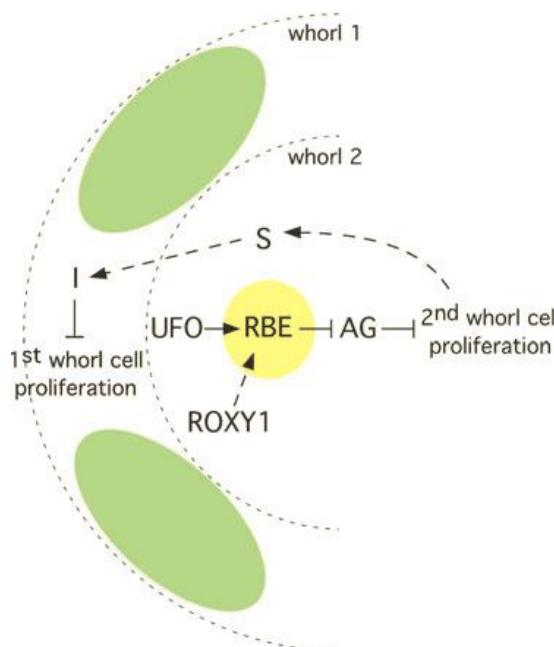
Μελέτες έχουν δείξει πως το *RBE* συμβάλλει στην δημιουργία του προτύπου των νεαρών ανθέων με την διατήρηση δύο διαφορετικών τύπων ορίων. Το *RBE* προωθεί την ανάπτυξη της δεύτερης σπείρας με τη διατήρηση ενός ορίου μεταξύ της δεύτερης και τρίτης σπείρας του άνθους, το οποίο περιορίζει την έκφραση του γονιδίου *AG* της κλάσης C στις σπείρες τρία και τέσσερα. Αν και τα αρχικά όρια της έκφρασης του *AG* μπορεί να δημιουργήθηκαν ανεξάρτητα από το *RBE*, η διατήρηση της ύπαρξης τους απαιτεί το *RBE*. Τέτοιοι ειδικοί καταστολείς στο περιάνθιο, συμπεριλαμβανομένου και του *RBE*, εξασφαλίζουν ότι η C περιοχή περιορίζεται στο κέντρο του άνθους (Cartolano et al., 2009). Το *RBE* δρα επίσης για να διατηρήσει ένα δεύτερο τύπο ορίων, τα οποία διαχωρίζουν τις καταβολές των μεμονωμένων σεπάλων εντός της πρώτης σπείρας. Μοριακά και γενετικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα *UFO* και *RBE* λειτουργούν στο ίδιο μονοπάτι για την προώθηση της έναρξης και ανάπτυξης των οργάνων της δεύτερης σπείρας και ότι το *UFO* απαιτείται για τα κανονικά επίπεδα έκφρασης του *RBE* (Irish, 2008; Krizek et al., 2006). Μεταλλάξεις στα *UFO*, *RBE* ή *PTL* προκαλούν παρόμοια ελαττώματα στις δύο εξωτερικές σπείρες των ανθέων. (Griffith et al., 1999). Το αν το *PTL* είναι ένα συστατικό του μονοπατιού των *UFO/RBE* ή δρα σε ξεχωριστό μονοπάτι παραμένει ασαφές. Επιπλέον, έχουν ερευνηθεί τα πρότυπα έκφρασης του *RBE* κατά την ανάπτυξη των ωαρίων και δείχνουν πως το *RBE* δρα επίσης για τη ρύθμιση της ανάπτυξης του εξωτερικού τους περιβλήματος (Krizek et al., 2006).

Πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη διατήρηση των ορίων εντός των αναπτυσσόμενων ανθέων έχουν εντοπιστεί. Το γονίδιο *SUP* διατηρεί ένα όριο μεταξύ της τρίτης και τέταρτης σπείρας των ανθέων. Μπορεί να αποτρέψει την επέκταση της έκφρασης του *AP3* στην τέταρτη σπείρα με τη ρύθμιση της ισορροπίας της κυτταρικής διαίρεσης στην τρίτη και τέταρτη σπείρα (Sakai et al., 1995). Τα πρότυπα έκφρασης των *RBE* και *SUP* στα μπουμπούκια είναι διαφορετικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι λειτουργίες τους διαχωρίζονται χωροταξικά. Επιπλέον, οι λειτουργίες αυτών των δύο γονιδίων είναι πιθανόν να είναι ανταγωνιστικές, όσον αφορά την ανάπτυξη του άνθους. Το συμπέρασμα αυτό έχει εξαχθεί καθώς το *SUP* ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αρνητικά στα όρια της τρίτης και τέταρτης σπείρας (Sakai et al., 1995; Sakai et al., 2000) ενώ το *RBE* εμπλέκεται στην προσδιορισμό των κυττάρων ή την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού

των κυττάρων, και όχι στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως το *SUP*. Έτσι, σε ένα άνθος, είναι διαφορετική όχι μόνο η περιοχή δράσης, αλλά επίσης και τα γονίδια-στόχοι των *RBE* και *SUP*.

Η εγκαθίδρυση και η συντήρηση των ορίων των οργάνων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των ζώων και των φυτών. Στά άνθη του *Arabidopsis*, τρία *miR164* (miR164) γονίδια (*MIR164a*, *b* και *c*) ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά την έκφραση των *CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*) και *CUC2*, τα οποία κωδικοποιούν βασικούς ρυθμιστές μεταγραφής που απαιτούνται για τον σχηματισμό των ορίων των οργάνων, καθώς και για την καταστολή της ανάπτυξης σε μία ποικιλία ιστών (Wang et al., 2004; Mallory et al., 2004; Rhoades et al., 2002; Sieber et al., 2007). Η ακριβής ρύθμιση της συγκέντρωσης των μεταγραφημάτων *CUC1* *CUC2* είναι ζωτικής σημασίας για τον ορθό έλεγχο του αριθμού των οργάνων και του σχηματισμού των ορίων καθ' όλη την βλαστική και αναπαραγωγική ανάπτυξη (Baker et al., 2005; Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2004; Sieber et al., 2007).

Τα τρία miR164 γονίδια εκφράζονται σε ξεχωριστές χωρικές και χρονικές περιοχές που είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία τους. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα, αποδεικνύουν ότι το *RBE* ρυθμίζει την έκφραση και των τριών miR164 γονιδίων. Συγκεκριμένα, το *RBE* αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποκινητή του *MIR164c* και ρυθμίζει αρνητικά την έκφρασή του. Το *RBE* ρυθμίζει επίσης την έκφραση των *MIR164a* και *MIR164b*, αν και αυτό φαίνεται να γίνεται έμμεσα καταστέλλοντας τη μεταγραφή του *MIR164b* και ρυθμίζοντας θετικά το *MIR164a*. Επιπροσθέτως, έχει δείχθει ότι ο ρόλος του *RBE* στην ανάπτυξη των σεπάλων και πετάλων διαμεσολαβείται εν μέρει από την ταυτόχρονη ρύθμιση των γονιδιακών προϊόντων των *CUC1* και *CUC2*. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ένας ρόλος του *RBE* είναι να τελειοποιεί την έκφραση των miR164 ώστε να ρυθμίσουν τα γονίδια *CUC1* και *CUC2*, τα οποία ακολούθως ρυθμίζουν με ακρίβεια αναπτυξιακά γεγονότα που απαιτούνται για την οργανογένεση των σέπαλων και πετάλων (Huang et al., 2012).



**Εικόνα 1.9: Μοντέλο για τη λειτουργία του RBE στην ανάπτυξη της πρώτης και της δεύτερης σπείρας του άνθους.** Τα βέλη και οι μπάρες περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις που στηρίζονται σε γενετικά ή/και μοριακά δεδομένα. Τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν προτεινόμενες αλληλεπιδράσεις. Οι πράσινες ελλείψεις αντιπροσωπεύουν καταβολές σέπαλων και ο κίτρινος κύκλος αντιπροσωπεύει τις καταβολές ενός πετάλου.

Το *RBE* εκφράζεται μόνο στα κύτταρα της δεύτερης σπείρας (Takeda et al., 2004), αλλά οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό μεταβάλλουν την ανάπτυξη τόσο της πρώτης όσο και της δεύτερης σπείρας. Η μειωμένη ανάπτυξη της δεύτερης σπείρας των μεταλλαγμάτων *rbe* φαίνεται να συνοδεύεται από αυξημένη ανάπτυξη σε μία γειτονική περιοχή της πρώτης

σπείρας. Οι Krizek et al., (2006) υποδεικνύουν ότι μονοπάτια σηματοδότησης ενεργούν μεταξύ γειτονικών ομάδων κυττάρων μεταξύ της πρώτης και δεύτερης σπείρας ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στο μοντέλο που προτείνουν (Εικόνα 1.9), τα γονίδια *UFO* και *RBE* δρουν σε ένα μονοπάτι προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της δεύτερης σπείρας μέσω της καταστολής του *AG*, το οποίο δρα ως καταστολέας της ανάπτυξης όταν εκφράζεται εκτοπικά στην δεύτερη σπείρα (Bowman et al., 1991; 1993). Τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της δεύτερης σπείρας κατά τη έναρξη των πετάλων παράγουν ένα σήμα (S) που κινείται προς τα γειτονικά κύτταρα της πρώτης σπείρας, ενεργοποιώντας έναν αναστολέα της ανάπτυξης της πρώτης σπείρας (I) σε αυτές τις περιοχές. Ένα τέτοιο μονοπάτι οδηγεί στη έναρξη και ανάπτυξη των πετάλων, καθώς και στην καθιέρωση συνόρων μεταξύ των γειτονικών καταβολών των σεπάλων. Σε αυτό το μοντέλο, η ποσότητα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της δεύτερης σπείρας και επομένως η ποσότητα του S που παράγεται, ελέγχεται από τις δραστηριότητες των *UFO* και *RBE*. Το *ROXY1*, μία πρωτεΐνη γλουταρεδοξίνη (Xing et al., 2005), μπορεί επίσης να διαδραματίσει ένα ρόλο εδώ ως πιθανός μετα-μεταφραστικός ρυθμιστής του *RBE*. Σε *rbe* άνηθ, η έκφραση του *AG* στην δεύτερη σπείρα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην δεύτερη σπείρα. Αυτό οδηγεί σε μείωση ή εξάλειψη του σήματος αναστολής της ανάπτυξης στην πρώτη σπείρα, κι έτσι οδηγεί σε ενίσχυση της ανάπτυξης στην ζώνη μεταξύ των σεπάλων και κατά συνέπεια σε σύντηξη σεπάλων και τον περιστασιακό σχηματισμό επιπλέον σεπάλων. Επομένως, το *RBE* αποτελεί συστατικό ενός μονοπατιού σηματοδότησης μεταξύ των σπειρών που ρυθμίζει την ανάπτυξη στις δύο εξωτερικές σπείρες των ανθέων

Τέλος, απώλεια της λειτουργίας του *RBE* ή του *PTL* διαταράσσει την ίδια διαδικασία εισροής αυξίνης. Έτσι, η αυξίνη είναι ένα άμεσο και μεταδιδόμενο σιγνάλο έναρξης των πετάλων προωθώντας την βιοσύνθεσή της στην ζώνη μεταξύ των σεπάλων στα μεταλλαγμένα φυτά *ptl* και *rbe* αποκαθιστώντας την έναρξη των πετάλων. (Lampugnani et al., 2013).

Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω, το *RBE* ελέγχει πολλαπλές βιολογικές διεργασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σεπάλων και των πετάλων.

#### **1.4.4 Η ομάδα Polycomb (PcG)-Το γονίδιο *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)***

##### **1.4.4.α Συμπύκνωση της χρωματίνης και γονιδιακή ρύθμιση-Η ομάδα Polycomb (PcG)**

Η σταθερή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης είναι μια σημαντική πτυχή των αναπτυξιακών προγραμμάτων των ανώτερων οργανισμών. Στα φυτά και στα ζώα, το DNA οργανώνεται και συμπιέζεται μέσα στην χρωματίνη η οποία περιορίζει φυσικά την προσβασιμότητα του γονιδιώματος από ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι παράγοντες μεταγραφής (Zhang et al., 2007; Rando and Ahmad, 2007). Συστήματα-μοντέλα φυτών έχουν συμβάλει αποδεικνύοντας ότι αυτός ο περιορισμός είναι δυναμικός και αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ως απόκριση σε εξωγενή ερεθίσματα.

Η θεμελιώδης μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο σχηματίζεται με το τύλιγμα 147 bp DNA γύρω από ένα οκταμερές ιστονών (δύο αντίτυπα από κάθε μία εκ των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4) (Pfluger and Wagner, 2007). Αυτές οι πρωτεΐνες, οι ιστόνες, μπορούν να τροποποιηθούν με επιγενετικούς μηχανισμούς, για παράδειγμα με μεθυλίωση ή ακετυλίωση λυσινών ή φωσφορυλίωση σερινών. Ειδικοί συνδυασμοί των εν λόγω τροποποιήσεων των ιστονών εντοπίζονται από άλλες πρωτεΐνες της χρωματίνης και έτσι παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση (Εικόνα 1.10) (Turck et al., 2007).

Οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb (PcG) εντοπίστηκαν για πρώτη φορά ως καταστολείς του ομοιοτικών γονιδίων στην *Drosophila melanogaster* (Lewis, 1978; Jurgens, 1985). Οι πρωτεΐνες PcG στην *Drosophila* και τα θηλαστικά διακρίνονται κυρίως σε 2 λειτουργικώς διαφορετικά υποσύνπλοκα (Muller and Verrijzer, 2009): το Polycomb Repressive Complex2 (PRC2), το οποίο καταλύει την τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της



ιστόνης H3 (H3K27) σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους και το PRC1, που αναγνωρίζει με το chromodomain του την τριμεθλίωση H3K27me3 για την προαγωγή της συμπύκνωσης της χρωματίνης, διατηρώντας σταθερή την μεταγραφική καταστολή των γονιδίων-στόχων. Στο *Arabidopsis* ωστόσο, δεν υπάρχει σύμπλοκο PRC1, όμως έχει υποστηριχθεί ότι το γονίδιο *TFL2* μπορεί να εκπληρώσει μια σχετική λειτουργία. Ως εκ τούτου το *TFL2* δεσμεύει H3K27me3 για να επιτευχθεί η καταστολή της μεταγραφής σε PCG στόχους (Turck et al, 2007; Zhang et al, 2007; Xu and Shen, 2008).

#### 1.4.4.β Το γονίδιο *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)*

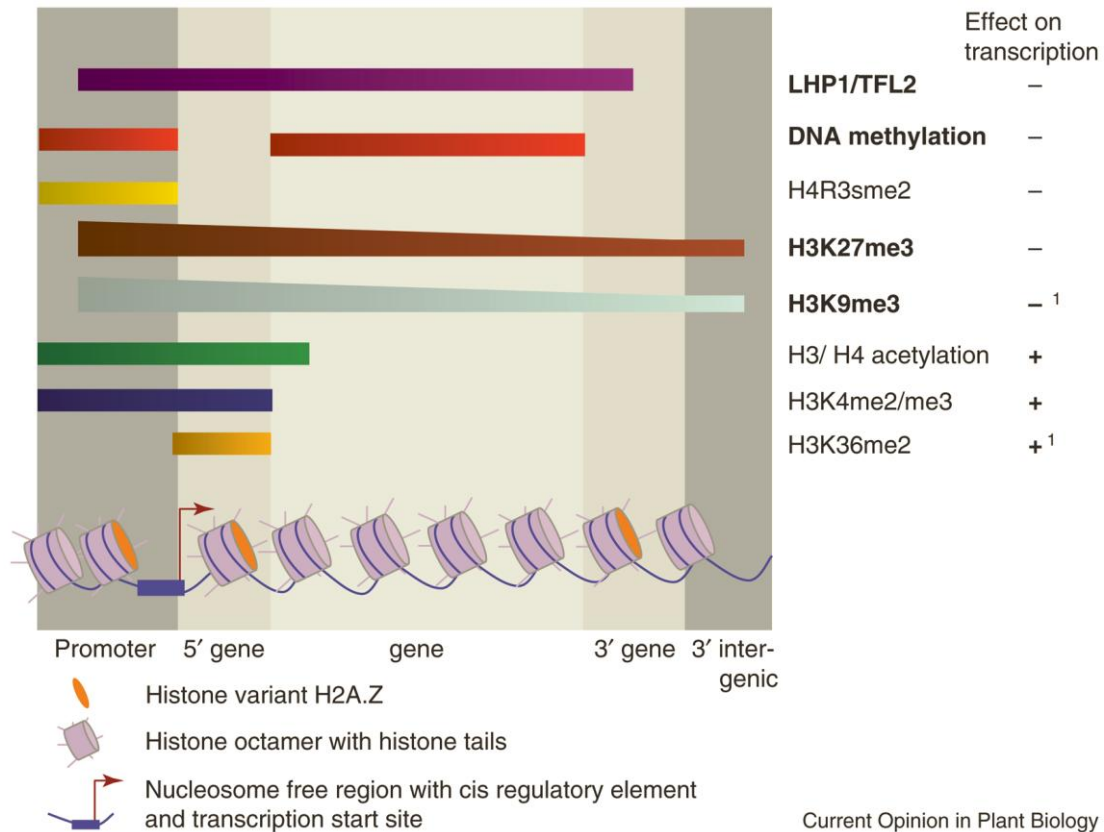
Το γονίδιο *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)*, το οποίο έχει ονομαστεί επίσης και *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1)* και *TU8* (Gaudin et al., 2001; Kim et al., 2004), κωδικοποιεί έναν παράγοντα ρύθμισης της συμπύκνωσης της χρωματίνης στα φυτά κατέχοντας έτσι έναν σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση. Το *TFL2* είναι το ομόλογο στο *Arabidopsis* του *Su(var)2-5*, το γονίδιο που κωδικοποιεί την HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (HP1), που περιγράφηκε για πρώτη φορά στην *Drosophila melanogaster* (Eissenberg et al., 1990; Zemach et al., 2006).

Η πρωτεΐνη *TFL2*, όπως όλες οι πρωτεΐνες *HP1* χαρακτηρίζονται από την N-τελική chromo περιοχή της (CD) (της τροποποίησης της οργάνωσης των χρωμοσωμάτων) (Paro and Hogness, 1991) και την εξαιρετικά συντηρημένη C-τελική chromo shadow περιοχή (CSD), οι οποίες διαχωρίζονται από μια μεταβλητού μήκους και αλληλουχίας αμινοξέων λιγότερο συντηρημένη περιοχή σύνδεσης (Eissenberg and Elgin, 2000). Η CD έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύεται στην ιστόνη H3 τριμεθυλωμένη στην λυσίνη 27, ενώ η CSD εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες καθώς και στον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης (Singh and Georgatos, 2002)

Οι Haughn et al., το 1991 απομόνωσαν έξι μεταλλάγματα *Arabidopsis* με τροποποιημένα επίπεδα γλυκοζινόλης στα φύλλα (μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που σχετίζεται με την άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων, καθώς και εντόμων). Ένα από αυτά, το οποίο ονομάστηκε *tu8*, αναφέρθηκε ότι έχει ένα ασυνήθιστο φαινότυπο: μειωμένα επίπεδα των αλειφατικών και αρωματικών γλυκοζινολών στα φύλλα. Αυτή η μειωμένη περιεκτικότητα σε γλυκοζινόλη συνοδεύεται με πρώιμη ανθοφορία και φαινοτύπους με υπανάπτυστα φύλλα ροζέτας. Γενετική χαρτογράφηση και αλληλούχηση του DNA ταυτοποίησε τη μετάλλαξη *tu8* ως το *tf12-6*, ένα νέο αλληλόμορφο του γονιδίου *TFL2*.

Μεταγενέστερη εργασία από άλλους έδειξε ότι το μεταλλάγμα *tu8/tf12* είναι ιδιαίτερα πλειοτροπικό, με μικρότερο ανάστημα (νανισμός), αυξημένη διακλάδωση, τερματισμό της ταξιανθίας και μειωμένη ευαισθησία στην φωτοπερίοδο, τροποποιημένα επίπεδα IAA, αυξημένη επίπεδα ινδόλης γλυκοζινόλης στις ρίζες, αυξημένη αντίσταση στο παθογόνο μύκητα *Plasmodiophora brassicae* (Clubroot), μειωμένη θερμοανθεκτικότητα και μειωμένη έκφραση των κυτταροπλασματικών HSP90 (Ludwig-Müller et al., 1999; 2000). Δεδομένης της ευρείας ρυθμιστικής λειτουργίας του chromodomain της πρωτεΐνης, απουσία ή μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα του *TFL2* προκαλούν τροποποιήσεις στην μεταγραφή μιας ποικιλίας γονιδίων στο *Arabidopsis*. Ως εκ τούτου, ο πλειοτροπικός φαινότυπος των μεταλλαγμάτων *tf12* μπορεί να οφείλεται σε άμεσες ή έμμεσες επιπτώσεις σε πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι το *TFL2* δρα στην ρύθμιση του χρόνου άνθησης καταστέλλοντας το γονίδιο *FLOWERING LOCUS T (FT)*, καταστέλλοντας το *FLOWERING LOCUS C (FLC)* ως απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες, ως ρυθμιστής της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων της άνθησης καταστέλλοντας τα *AGAMOUS (AG)*, *APETALA 3 (AP3)* και *PISTILLATA (PI)*, και αποτελεί συστατικό στη ρύθμιση των επιπέδων ινδόλης γλυκοζινόλης (Mylne et al., 2006; Germann et al., 2006; Sung et al., 2006).

Η ενδοκυτταρική τοποθέτηση του TFL2 έχει μελετηθεί και πολλές αναφορές αποδεικνύουν πως το TFL2 δρα κυρίως στις ευχρωματινικές περιοχές (Libault et al., 2005; Zemach et al., 2006). Εκτός από τον πυρηνικό της εντοπισμό, η ομολογία της πρωτεΐνης TFL2 με τις πρωτεΐνες HP1 από άλλους οργανισμούς υποδεικνύει μια δράση του TFL2 στις πυρηνικές διαδικασίες, πιθανότατα ως ρυθμιστής της γονιδιακής μεταγραφής μέσω της τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Το TFL2 εντοπίζεται στην ευχρωματίνη και λειτουργεί κυρίως στην καταστολή γονιδίων που βρίσκονται εντός της ευχρωματίνης, όπως αυτά που προαναφέρθηκαν (Εικόνα 1.10) (Schatlowski et al., 2008; Hennig and Derkacheva, 2009).



**Εικόνα 1.10: Διάταξη στο χώρο των τροποποιήσεων της χρωματίνης, σημαντικών για τη γονιδιακή έκφραση.** Απεικονίζεται είναι γενικό ευχρωματινικό γονίδιο του φυτού *Arabidopsis thaliana* στα πλαίσια τροποποιήσεων της χρωματίνης, οι οποίες είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων. Τα οκταμερή των ιστονών παρουσιάζονται ως μωβ κύλινδροι. Η τροποποίηση H2A.Z απεικονίζεται ως μια πορτοκαλί έλλειψη. Η κατανομή των τροποποιήσεων οι οποίες προσδιορίστηκαν από μελέτες καθολικής δέσμευσης αναφέρονται με έντονα γράμματα, για να διακρίνονται από εκείνες για τις οποίες οι πληροφορίες προέρχονται μόνο από μελέτες ενός περιορισμένου αριθμού γονιδίων. Σημειώνεται, ότι οι H3K27me3 και H3K9me3 δεν αλληλεπικαλύπτονται, γονίδια που καταστέλλονται από H3K27me3 στερούνται H3K9me3 και αντίστροφα. Επίσης, απεικονίζεται η κατανομή της μεθυλίωσης του DNA και της LHP1/TFL2.

<sup>1</sup> H3K9me3 και H3K36me2 μπορεί να έχουν διαφορετικούς ρόλους στη μεταγραφή, εξαρτάται από την θέση τους.

In vitro, η TFL2/LHP1 δεσμεύεται με την ιστόνη H3 η οποία είναι δι- ή τρι-μεθυλιωμένη στην λυσίνη 9 (H3K9me2 ή H3K9me3), τις περιοχές που αναγνωρίζονται από το HP1 και με την ιστόνη H3 τριμεθυλιωμένη στη λυσίνη 27 (H3K27me3), τις μεθυλίωσεις που δημιουργούνται από την δράση του PRC2. Ωστόσο, in vivo το TFL2/LHP1 δεσμεύεται με

την χρωματίνη σχεδόν αποκλειστικά σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από H3K27me<sub>3</sub>, αλλά όχι από H3K9me<sub>2</sub> ή -3 (Turck et al., 2007). Ως εκ τούτου, το TFL2/LHP1 θεωρείται ένα λειτουργικό ομόλογό του PRC1 επειδή in vivo αναγνωρίζει εξειδικευμένα και συνεντοπίζεται με τις περιοχές H3K27me<sub>3</sub> ως μέρος ενός μηχανισμού που καταστέλλει την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων του PRC2 (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Το πρότυπο έκφρασης του TFL2 στα φυτά αγρίου τύπου δείχνει ότι οι περιοχές όπου η μεταγραφή του TFL2 είναι υψηλή, αντιστοιχούν σε ζώνες ενεργώς διαιρούμενων κυττάρων και ως εκ τούτου, υψηλού ρυθμού γονιδιακής αντιγραφής. Το πρότυπο έκφρασης σε αυτές τις περιοχές είναι σύμφωνο με την λειτουργία του TFL2 στη γονιδιακή καταστολή πρόσφατα αντεγγραμμένου DNA. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα μέσω του σχηματισμού του πυκνών δομών χρωματίνης, μια λειτουργία που περιγράφηκε για τις πρωτεΐνες HP1 σε άλλους οργανισμούς. Τόσο το πρότυπο έκφρασης όσο και ο πλειοτροπικός φαινότυπος των μεταλλαγμάτων *tf12* είναι σύμφωνο με μια λειτουργία στην ρύθμιση διάφορων διαδικασιών καθ' όλη την ανάπτυξη των φυτών (Sundas-Larsson et al., 1998; Nilsson, 2007). Κατά αυτόν τον τρόπο, το TFL2 μπορεί να δρα ως κύριος ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης στα φυτά, για τον έλεγχο διαφόρων αναπτυξιακών μονοπατιών.

Η μειωμένη ευαισθησία στην φωτοπερίοδο στα μεταλλάγματα *tf12* δείχνει πως το TFL2 συσχετίζεται με το μονοπάτι της φωτοπεριόδου της άνθησης. Το TFL2 λειτουργεί ως ένας ειδικός καταστολέας του FCA στην αυτόνομη οδό. Τόσο το αυτόνομο όσο και το μονοπάτι της φωτοπεριόδου προωθούν την άνθηση με την ενεργοποίηση του FT. Το TFL2 λειτουργεί ως καταστολέας του FT (Kotake et al., 2003). Εκτός του ότι είναι ένας ρυθμιστής του χρόνου άνθησης επηρεάζοντας τα αυτόνομο μονοπάτι και εκείνο της φωτοπεριόδου, το TFL2 έχει δειχθεί να συμμετέχει στην ρύθμιση του χρόνου άνθησης μέσω του μονοπατιού της εαρινοποίησης (Mylne et al., 2006; Sung et al., 2006). Το TFL2 ενεργεί στην διατήρηση της κατάστασης καταστολής του FLC μετά την εαρινοποίηση. Τα παραπάνω υποδεικνύουν μια λειτουργία του TFL2 όχι ως ένας γενικός καταστολέας της άνθησης αλλά αντίθετα ως ρυθμιστής ειδικών γονιδίων κατά τη διάρκεια του καθορισμού του χρόνου άνθησης σε τουλάχιστον τρία από τα τέσσερα μονοπάτια της άνθησης (Nilsson, 2007). Επιπλέον, δρα στα αρχικά στάδια της άνθησης μαζί με τα γονίδια χρόνου άνθησης SVP, SOC1 και AGL24 σε ένα δίκτυο καταστολής του SEP3, προκειμένου να αποφευχθεί η πρόωρη διαφοροποίηση του ανθικού μεριστώματος (Liu et al., 2009).

Εκτοπική έκφραση των AP1 και AG οδηγεί στον τερματισμό του IFM (Mandel and Yanofsky, 1995; Weigel and Nilsson, 1995; Mizukami and Ma, 1997). Μελέτες έδειξαν πως το TFL2 δρα ως καταστολέας του AP1 σε διάφορους ιστούς και κατά τη διάρκεια πολλών αναπτυξιακών σταδίων ενώ θεωρείται πως η εκτοπική έκφραση του AP1 είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην πρόωμη φάση της μετάβασης και τον πρόωρη τερματισμό των IFM των φυτών *tf12*. Αυτά τα δεδομένα σε συνδυασμό δείχνουν πως το TFL2 καταστέλλει τα γονίδια ρύθμισης του μεριστώματος και ανθικής ταυτότητας AP1 και AG με σκοπό να διατηρήσει ενεργό το μερίστωμα της ταξιανθίας (Nilsson, 2007)

Τα ανθικά βλαστικά κύτταρα στα φυτά, τερματίζονται με ακρίβεια, πράγμα που σημαίνει ότι παύουν να λειτουργούν και διατηρούνται ως βλαστικά κύτταρα, σε μια διαδικασία που συντονίζεται με άλλα αναπτυξιακά γεγονότα. Ο τερματισμός της συντήρησης των βλαστικών κυττάρων των ανθέων περιλαμβάνει δύο βασικούς παράγοντες μεταγραφής, τις πρωτεΐνες AG, και WUSCHEL (WUS). Το AG είναι ένας παράγοντας μεταγραφής απαραίτητος για τον τερματισμό της ανθικής μοίρας των βλαστικών κυττάρων, καταστέλλοντας το γονίδιο διατήρησης των βλαστικών κυττάρων WUS. Το AG καταστέλλει άμεσα την έκφραση του WUS με σύνδεση στον γενετικό τόπο loci του WUS και την πρόσληψη, άμεσα ή έμμεσα, του TFL2 στο WUS που αναγνωρίζει και διατηρεί τις περιοχές H3K27me<sub>3</sub> εμποδίζοντας το να μεταγραφεί οδηγώντας στον τερματισμό της συντήρησης των ανθικών βλαστικών κυττάρων (Liu et al., 2011).

Μειωμένα επίπεδα αυξίνης ή μια αλλαγμένη απόκριση στην αυξίνη θα μπορούσε να είναι η αιτία πίσω από αρκετά από τα γνωρίσματα στον φαινότυπο των *tfl2* μεταλλάγματων. Όπως πχ το μειωμένο κυτταρικό μέγεθος (Sundas-Larsson et al., 1998). Τα μεταλλάγματα *tfl2* εμφανίζουν τροποποιημένα επίπεδα της IAA κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης (Ludwig-Müller et al., 1999). Μετά από χειρισμό με αυξίνη παρατηρείται μια μειωμένη απόκριση στα φυτά *tfl2* ενώ βρέθηκε ότι αρκετά γονίδια σχετικά με την αυξίνη έχουν μειωμένη έκφραση στα φυτά *tfl2* (Nilsson, 2007). Τα μειωμένα επίπεδα μεταγραφής ορισμένων, αλλά όχι όλων των γονιδίων της αυξίνης τα οποία ρυθμίζονται από το *TFL2*, υποδεικνύουν ότι το *TFL2* εμπλέκεται σε συγκεκριμένες διεργασίες και δεν είναι ένας γενικός καταστολέας της μεταγραφής στην απόκριση στην αυξίνη. Το συμπέρασμα αυτό είναι σύμφωνο με την δράση του *TFL2* στην ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων κατά τη διάρκεια διαφορετικών αναπτυξιακών προγραμμάτων όπως η καταστολή των *FLC* και *FT* και η καταστολή των *AP3*, *AG* και *PI* (Kotake et al, 2003; Sung et al, 2006).

Σε πρόσφατη μελέτη οι Rizzardì et al., (2011) έδειξαν ότι το μετάλλαγμα *tfl2* έχει χαμηλότερο ποσοστό βιοσύνθεσης της αυξίνης, με αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα αυξίνης. Σύμφωνα με αυτό, τα *tfl2* μεταλλάγματα έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων απόκρισης στην αυξίνη και μειωμένη απόκριση στην αυξίνη. Συγκεκριμένα, το μειωμένο ποσοστό της βιοσύνθεσης της αυξίνης στα φυτά *tfl2* συσχετίζεται με την αρνητική ρύθμιση των ειδικών γονιδίων στην βιοσύνθεση αυξίνης στο μονοπάτι που είναι εξαρτώμενο από τρυπτοφάνη, ένα υποσύνολο των γονιδίων *YUCCA*. In vivo, το *TFL2* έχει ως στόχο του έναν αριθμό γονιδίων *YUCCA* με έναν τρόπο εξαρτώμενο από αυξίνη αποκαλύπτοντας ένα ρόλο του *TFL2* στη ρύθμιση της αυξίνης, πιθανώς ως συστατικό των πρωτεϊνικών συμπλοκών που επηρεάζουν τον μεταγραφικό έλεγχο (Rizzardì et al., 2011). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν έναν άμεσο ρόλο του *TFL2* στην ρυθμιζόμενη ανάπτυξη των φυτών από την αυξίνη, ρυθμίζοντας θετικά την έκφραση ενός υπο-συνόλου των *YUCCA* γονιδίων. Ως εκ τούτου, το *TFL2* έχει ένα ρόλο στην θετική μεταγραφική ρύθμιση και ανάδρομη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της αυξίνης. Ένας τέτοιος ρόλος του *TFL2* στην θετική μεταγραφική ρύθμιση δεν έχει ξαναπαρατηρηθεί στα φυτά.

Πρόσφατα, εντοπίστηκε και μελετήθηκε ένας LHP1-Interacting Factor2 (LIF2). Η πρωτεΐνη LIF2 έχει μοτίβα αναγνώρισης RNA και ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των πρωτεϊνών hnRNP, η οποία εμπλέκεται στην επεξεργασία του RNA. Το LIF2 μπορεί είτε να ανταγωνίζεται είτε να δρα μαζί με το TFL2. Επιπλέον, εμπλέκεται στον καθορισμό της κυτταρικής ταυτότητας και μπορεί να τροποποιεί την δραστηριότητα του TFL2 σε συγκεκριμένα loci, κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών παραθύρων ή σε απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα που ελέγχουν τον καθορισμό της κυτταρικής μοίρας. Εκτιμάται, ότι τα LIF2 και TFL2 ενεργούν σε αλληλοεπικαλυπτόμενα μονοπάτια που συνδέουν τον αναπτυξιακό έλεγχο και τα περιβαλλοντικά μονοπάτια σηματοδότησης, με το LIF2 ενδεχομένως να διαμορφώνει την δράση του TFL2 σε ένα υποσύνολο των στόχων του, σε απόκριση σε αυτά τα εξωτερικά ερεθίσματα (Latrasse et al., 2011).

## **1.5 Το γονίδιο *WUSCHEL (WUS)* και η εμπλοκή του στην λειτουργία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού (AMB)**

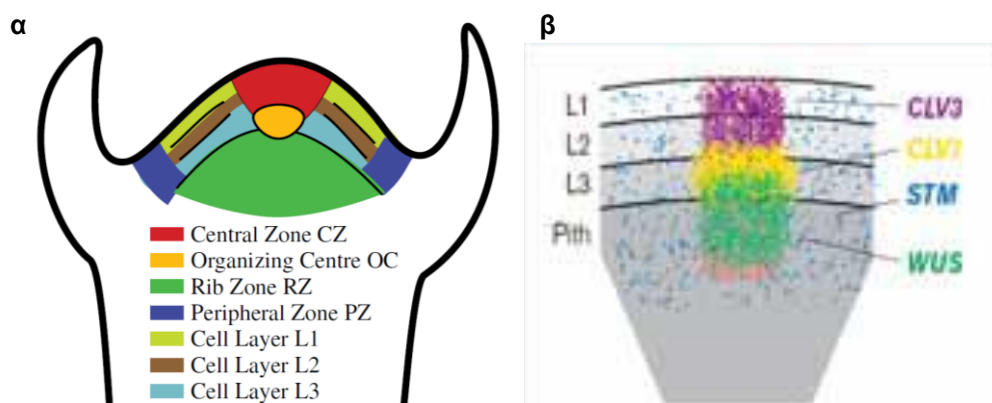
### **1.5.1 Το ακραίο μερίστωμα του βλαστού (AMB)**

Το ακραίο μερίστωμα του βλαστού (AMB) των ανώτερων φυτών είναι ένα δυναμικό σύστημα κυττάρων το οποίο ξεκινά επανειλημμένα τον σχηματισμό οργάνων κατά τη διάρκεια της μετα-εμβρυονικής ανάπτυξης. Το πρότυπο των διαιρέσεων και η εξειδίκευση των κυττάρων στο ακραίο αναπτυσσόμενο τμήμα του βλαστού, ρυθμίζεται από την παροδική και τοπολογική έκφραση μίας σειράς γονιδίων. Κυρίαρχο ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση του AMB έχει βρεθεί λοιπόν ότι παίζουν τα γονίδια *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *WUSCHEL (WUS)*, *CLAVATA1 (CLV1)*, *CLAVATA2 (CLV2)*, *CLAVATA3 (CLV3)* και *ZWILLE (ZLL)*. Το AMB όμως είναι η αρχική δομή από την οποία σχηματίζεται όχι μόνο ο κεντρικός

βλαστός του φυτού αλλά και όλα τα δευτερεύοντα όργανα, όπως τα φύλλα και τα άνθη. Τα φύλλα σχηματίζονται με διαφοροποίηση μίας ομάδας κυττάρων της περιφερειακής ζώνης, ενώ τα άνθη προκύπτουν από τα ανθικά μεριστώματα που αναπτύσσονται στα άκρα του AMB. Κατ' αυτό τον τρόπο λοιπόν η δημιουργία του AMB είναι άμεσα συνδεδεμένη τόσο με την ανάπτυξη των φύλλων όσο και με την ανάπτυξη των ανθέων (Jurgens, 2001).

Η συνεχής ανάπτυξη του βλαστού εξαρτάται από τη δράση του AMB το οποίο αποτελεί και κέντρο σχηματισμού όλων των μεταγενέστερων οργάνων του βλαστού. Μπορεί να διαιρεθεί σε περιοχές, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργίες. Σε επιμήκη προβολή, το AMB μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτά τμήματα. Η εξωτερική στιβάδα ονομάζεται μανδύας (tunica) και περιβάλλει το εσωτερικό τμήμα που ονομάζεται σώμα (corpus) (Kwiatkowska, 2004). Σε εγκάρσια προβολή, το AMB χωρίζεται στην κεντρική ζώνη (central zone-CZ) και στην περιφερειακή ζώνη (περιφερειακό μερίστωμα) (peripheral zone) (Reddy 2008; Steeves and Sussex, 1989). Η κεντρική ζώνη περιέχει έναν αριθμό σχετικά αργά διαιρούμενων κυττάρων, τα οποία είναι λίγο μεγαλύτερα και με περισσότερα κυστίδια από ότι τα περιβάλλοντα κύτταρα. Η κεντρική ζώνη που συνιστά το «θύλακα» ή «ενδιαίτημα» των βλαστικών ή αρχικών κυττάρων (stem cell niche) του αναπτυσσόμενου βλαστού, αποτελείται από τις τρεις στιβάδες L1, L2 και L3, και τον «θύλακα» κυττάρων μεταγωγής σιγνάλων (signalling niche cells) που ονομάζεται κέντρο οργάνωσης (organizing centre-OC), (Εικόνα 1.11α) (Rieu and Laux 2009; Stewart and Dermen, 1970).

Η κεντρική ζώνη του AMB περιβάλλεται από τα θυγατρικά βλαστικά κύτταρα (stem cell daughters) της περιφερειακής ζώνης τα οποία περιέχουν μικρό αριθμό κυστιδίων, διαιρούνται ταχέως και ανάλογα με τα γονίδια που εκφράζουν διαφοροποιούνται περαιτέρω (Sablowski, 2007). Έτσι, η επαγωγή οργανο-ειδικών γονιδίων οδηγεί στην ανάπτυξη και ωρίμανση των καταβολών, οι οποίες σχηματίζονται στην περιφέρεια του AMB και αποτελούν τα σημεία ανάπτυξης των μεταγενέστερων οργάνων του βλαστού. Κάτω από την κεντρική ζώνη και σε βαθύτερα κυτταρικά στρώματα βρίσκεται η τρίτη δομή του AMB, η ραβδωτή ζώνη, τα κύτταρα της οποίας περιέχουν πολυάριθμα κυστίδια και συμβάλλουν στο σχηματισμό του κυρίου σώματος του βλαστού.



**Εικόνα 1.11:** (α) Σχηματική απεικόνιση των στιβάδων και περιοχών του ακραίου μεριστώματος του βλαστού (AMB). Κεντρική ζώνη (CZ), κέντρο οργάνωσης (OC), ραβδωτή ζώνη (RZ), περιφερειακή ζώνη (PZ), κυτταρικές στιβάδες L1, L2 και L3. Ο πληθυσμός των βλαστικών κυττάρων του AMB είναι εντοπισμένος στις στιβάδες 1-3 της κεντρικής ζώνης. (β) Διαγραμματική απεικόνιση της συσσώρευσης των *CLV1*, *CLV3*, *STM* και *WUS* mRNAs στα μεριστώματα φυτών άγριου τύπου. Για την διατήρηση της ομοιόστασης του AMB, το *WUS*-εξαρτώμενο σιγνάλο πρέπει να μεταφερθεί από τα *WUS*-εκφράζοντα κύτταρα σε υψηλότερες κυτταρικές στιβάδες.

Πειράματα ανάλυσης χημικών AMB υποδηλώνουν ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης η κεντρική ζώνη είναι αυτή που τροφοδοτεί με νέα κύτταρα τόσο την περιφερειακή ζώνη, όσο και το μερίστωμα της εντεριώνης, καθώς αποτελεί το σημείο δημιουργίας νέων αρχικών μεριστωματικών κυττάρων (Steeves and Sussex, 1989). Η περιφερειακή ζώνη και το μερίστωμα της εντεριώνης τροφοδοτούν με τη σειρά τους με κύτταρα τις νέες δομές και καταβολές των οργάνων που σχηματίζονται. Κατ' αυτό τον τρόπο, σε κάθε αναπτυσσόμενο φυτομερές, η κεντρική και περιφερειακή ζώνη καθώς και το μερίστωμα της εντεριώνης του AMB διατηρούν το μέγεθος του με συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις. Το AMB εκτός από την ικανότητα να διατηρεί το μέγεθος και την οργάνωση του, έχει και την δυνατότητα αναγέννησης. Όταν για παράδειγμα η κεντρική ζώνη του AMB καταστραφεί, ορισμένα κύτταρα της περιφερειακής ζώνης αλλάζουν κυτταρική μοίρα και μετατρέπονται σε κύτταρα κεντρικής ζώνης δημιουργώντας ένα ή περισσότερα νέα λειτουργικά AMB. Παρόμοια, μία διχοτόμηση του αρχικού AMB οδηγεί στην αναγέννηση δύο ξεχωριστών μεριστωμάτων με κανονικό μέγεθος.

Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, έχει προταθεί το παρακάτω μοντέλο δράσης των εμπλεκόμενων γονιδίων για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του AMB. Ο καθορισμός της ταυτότητας των βλαστικών κυττάρων εξαρτάται από τη δράση δύο τουλάχιστον γονιδίων, του *WUS* και του *STM*. Τα γονίδια αυτά ενώ αρχικά εκφράζονται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης το ένα ανεξάρτητα από το άλλο, στη συνέχεια της ανάπτυξης η διατήρηση της έκφρασης του ενός απαιτεί την ύπαρξη του άλλου (Lenhard et al. 2002). Παρ' όλα αυτά, τα δύο αυτά γονίδια δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο αλλά ο καθορισμός του AMB απαιτεί την συνέργεια και των δύο. Η δράση του *WUS* οδηγεί στον καθορισμό ενός υποσυνόλου κυττάρων ως βλαστικά κύτταρα, ενώ η δράση του *STM* καταστέλλει την διαφοροποίηση τους προκειμένου αυτά να διαιρεθούν πριν τα θυγατρικά τους κύτταρα ενσωματωθούν στις καταβολές των πλάγιων οργάνων (Lenhard et al., 2002; Endrizzi et al., 1996; Long et al., 1996). Χωρίς όμως την παρουσία ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης (negative feedback loop), η συνεχής δράση των γονιδίων *WUS* και *STM* θα είχε σαν αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση βλαστικών κυττάρων στην κεντρική ζώνη. Τον ρόλο αυτό της αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *WUS* φαίνεται πως διαδραματίζει το CLV σύμπλοκο μεταγωγής σινιάλου, η δράση του οποίου οδηγεί στη διατήρηση ενός περιορισμένου αλλά ικανού αριθμού βλαστικών κυττάρων στο αναπτυσσόμενο AMB (Schoof et al., 2000).

Τα mRNA των επιμέρους συστατικών αυτού του CLV-WUS-STM δικτύου μεταγωγής σινιάλου συσσωρεύονται σε ξεχωριστές και σε μεγάλο βαθμό μη αλληλοεπικαλυπτόμενες δομές (περιοχές) του μεριστώματος (Εικόνα 1.11β). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο συντονισμός της ομοιόστασης των βλαστικών κυττάρων απαιτεί τη συμμετοχή όλων των στιβάδων της κεντρικής ζώνης. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η ρύθμιση αυτή, η *WUS*-εκφράζουσα δομή πρέπει να παράγει ένα σινιάλο το οποίο έχει την ικανότητα να μετακινείται από τα βαθύτερα κυτταρικά στρώματα προς τις στιβάδες L2 και L1. Πιθανολογείται ότι τα *WUS* mRNA ή η πρωτεΐνη αυτή καθ' αυτή μετακινείται και ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *CLV3*. Κατά παρόμοιο τρόπο, το σινιάλο που παράγεται από το CLV σύμπλοκο πρέπει να έχει επίσης την ικανότητα μίας μη κυτταρο-αυτόνομης δράσης (non-cell-autonomous action). Να μπορεί δηλαδή να μεταφέρεται από τις στιβάδες L1 και L2 στην L3, προκειμένου να καταστείλει την έκφραση του γονιδίου *WUS* (Yadav et al., 2011).

### 1.5.2 Το γονίδιο *WUSCHEL (WUS)*

Το πρότυπο οργάνωσης των ιστών επιτυγχάνεται χάρη στη δράση μίας σειράς γονιδίων. Όσον αφορά το βλαστό (συμπεριλαμβανομένων των φύλλων και των ανθέων), τα σημαντικότερα από αυτά είναι τα *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *WUSCHEL (WUS)*, *CLAVATA1 (CLV1)* και *CLAVATA3 (CLV3)*, *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* *LEAFY (LFY)*, *APETALA (AP)*, *AGAMOUS (AG)* και *CAULIFLOWER (CAL)*.

Το AMB αποτελεί το κέντρο σχηματισμού όλων των μεταγενέστερων οργάνων του βλαστού. Το *WUS*, η έκφραση του οποίου παρατηρείται στο κέντρο οργάνωσης είναι υπεύθυνο για την διατήρηση των βλαστικών κυττάρων σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση. Τα βλαστικά κύτταρα από την άλλη εκφράζουν το γονίδιο *CLAVATA3 (CLV3)*, το οποίο ελέγχει την έκφραση του *WUS*, περιορίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο το μέγεθος του κέντρου οργάνωσης (Williams and Fletcher, 2005).

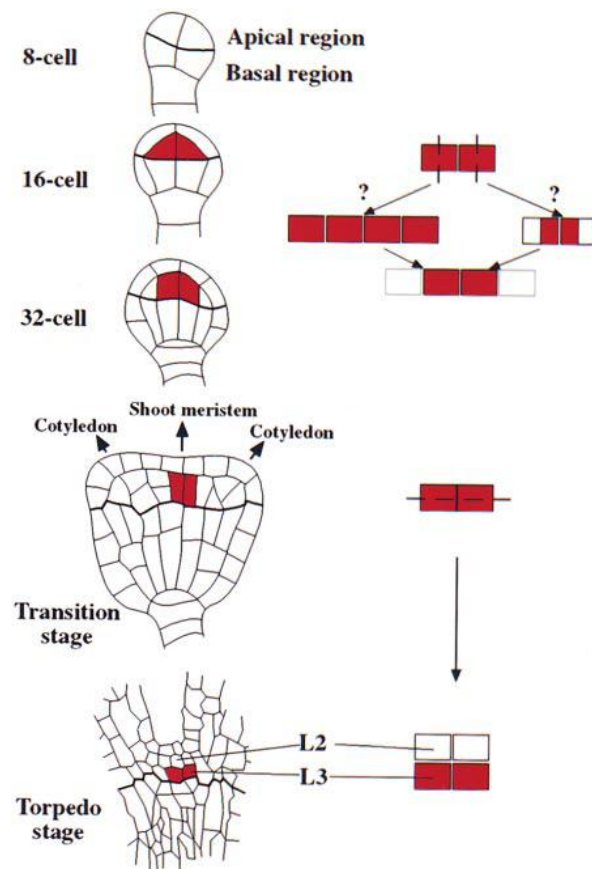
Πρώτη ένδειξη της έναρξης σχηματισμού του «θύλακα» των βλαστικών κυττάρων αποτελεί η έκφραση του γονιδίου *WUS* στα τέσσερα υποδερμικά ακραία κύτταρα (ραχιαίο τμήμα) του 16-κύτταρου προεμβρύου (Εικόνα 1.12). Τα κύτταρα αυτά διαιρούνται στη συνέχεια ασύμμετρα αρκετές φορές, προκειμένου να δημιουργήσουν τις τρεις χαρακτηριστικές στιβάδες (L1, L2 και L3) και μία «*WUS* εκφράζουσα δομή» (*WUS* expression domain) στη βάση του ραχιαίου τμήματος της αναπτυσσόμενης μεριστωματικής καταβολής (Mayer et al., 1998). Η έκφραση του γονιδίου *WUS* είναι απαραίτητη για τον κανονικό σχηματισμό του εμβρυονικού AMB και την έκφραση του *CLV3* ή *STM* στα ώριμα έμβρυα. Από την άλλη μεριά, η έκφραση του γονιδίου *CLV3* καθορίζει τη σωστή τοπολογική έκφραση του *WUS* από το στάδιο του καρδιόσχημου εμβρύου και μετά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο αλληλοεξαρτώμενος αυτός ανάδρομος μηχανισμός γονιδιακής έκφρασης (feedback loop), ο οποίος ρυθμίζει την ομοιοστάση του AMB είναι ήδη ενεργός στο στάδιο αυτό. Ο λόγος που το γονίδιο *WUS* είναι ενεργό από τα πρώτα κιάλας στάδια της εμβρυογένεσης είναι άγνωστος. Πιθανολογείται ωστόσο, ότι η δράση του αποτρέπει τα πρόδρομα κύτταρα του «θύλακα» των βλαστικών κυττάρων να εισέλθουν σε άλλα εμβρυονικά αναπτυξιακά μονοπάτια.

Το *WUS* δεν απαιτείται για την έναρξη των ανθικών μεριστωμάτων και των μεριστωμάτων του βλαστού, αλλά για τη συντήρησή τους κατά τη διάρκεια της παραγωγής των οργάνων (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Συνεπώς, η παρουσία του προϊόντος του γονιδίου *WUS* είναι απαραίτητη για την κανονική λειτουργία του AMB. Τα ολικής απώλειας λειτουργίας *wus* μεταλλάγματα αδυνατούν να δημιουργήσουν ένα λειτουργικό AMB. Στα φυτά αυτά, τα ακραία εμβρυονικά κύτταρα αντί να εγκαθιδρύσουν έναν πληθυσμό βλαστικών μεριστωματικών κυττάρων μπαίνουν σε μία πορεία διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της λειτουργίας του AMB. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα ανάπτυξης δύο μόνο ζευγών κανονικών φύλλων. Η ανάπτυξη τους στη συνέχεια σταματά καθώς το AMB διογκώνεται και καθίσταται μη λειτουργικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουμε την ανάπτυξη επιγενών AMB στο ακραίο τμήμα του βλαστού ή/και μασχαλιαίων AMB στη βάση των κοτυληδόνων. Τα μεριστώματα αυτά όμως σταματούν και πάλι την ανάπτυξη τους μετά από δραστηριότητα μικρής διάρκειας. Κατά παρόμοιο τρόπο, τα άνθη που σχηματίζονται στα στελέχη αυτά φέρουν σχεδόν κανονικούς σπονδύλους σεπάλων και πετάλων, αλλά ο πρόωρος τερματισμός της ανάπτυξης τους οδηγεί στη δημιουργία ενός άνθους με έναν μόνο κεντρικό στήμονα. Από τα άνθη αυτά απουσιάζει πλήρως ο στύλος και ο ύπερος του γυναικείου (Laux et al., 1996). Οι φαινότυποι των μεταλλαγμάτων *wus* υποδηλώνουν την σημασία του γονιδίου *WUS* στην ανάπτυξη και διατήρηση του AMB.

Το γονίδιο *WUS* κωδικοποιεί έναν ομοιοδομικό (homeodomain) μεταγραφικό παράγοντα, και ανήκει στην οικογένεια των *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN (WOX)* γονιδίων (Haecker et al., 2004). Έκφραση του *WUS* εντοπίζεται αρχικά στο στάδιο του 16-κύτταρου προεμβρύου (πρώτα στάδια του σφαιρικού προεμβρύου) στα εσωτερικά κύτταρα του ραχιαίου τμήματος. Κατά τη διάρκεια έναρξης σχηματισμού του AMB, η έκφραση του περιορίζεται βαθμιαία σε ένα υποσύνολο κυττάρων της κεντρικής ζώνης (Εικόνα 1.12). Έχει προταθεί ότι τα κύτταρα αυτά παράγουν ένα σινιάλο, το οποίο καθορίζει την ταυτότητα των κυττάρων της κεντρικής ζώνης (Mayer et al., 1998). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, στα μεταλλάγματα *wus* η απουσία του σινιάλου από τα κύτταρα της κεντρικής ζώνης έχει σαν αποτέλεσμα αυτά να υιοθετούν εξειδικευμένες πορείες διαφοροποίησης, οδηγώντας στον τερματισμό της ανάπτυξης του AMB. Το γεγονός ότι η μικρή αυτή ομάδα των *WUS*-



εκφραζόντων κυττάρων παρουσιάζει μία παρόμοια λειτουργία με το κέντρο ηρεμίας του AMP, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον (van der Graaff et al., 2009; Sarkar et al., 2007). Φαίνεται λοιπόν ότι τόσο το κέντρο ηρεμίας όσο και τα *WUS*-εκφράζοντα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την διατήρηση των αρχικών μεριστωματικών κυττάρων σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση, γεγονός που επιτρέπει την διατήρηση και συνεχή ομαλή λειτουργία των ακραίων μεριστωμάτων. Σε αντίθεση όμως με τα κύτταρα του κέντρου ηρεμίας του AMP, τα οποία διαιρούνται με πολύ αργούς ρυθμούς, τα *WUS*-εκφράζοντα κύτταρα διαιρούνται συχνά, συμβάλλοντας αφενός μεν στην διατήρηση του θύλακα των βλαστικών (μεριστωματικών) κυττάρων, αφετέρου δε στην τροφοδοσία των περιφερειακών ζωνών με νέα θυγατρικά κύτταρα. Η λειτουργία και ρυθμιστική δράση του γονιδίου *WUS* σχετίζεται άμεσα με την επαγωγή των γονιδίων *CLAVATA* (Bhalla and Singh 2006).

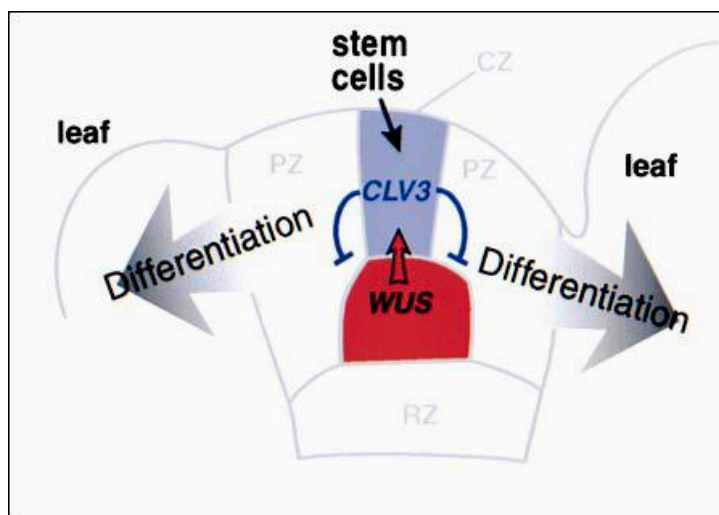


**Εικόνα 1.12: Δυναμική του προτύπου έκφρασης του *WUS* κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυογένεσης.** Σχηματική παρουσίαση του προτύπου έκφρασης του *WUS* σε διαφορετικά εμβρυονικά στάδια (αριστερή στήλη) και διάγραμμα των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που οδηγούν στον εντοπισμό της *WUS* περιοχής στη βάση των καταβολών του μεριστώματος του βλαστού. Η έκφραση του *WUS* (κόκκινο) ξεκινά στα τέσσερα υποεπιδερμικά κύτταρα της ακραίας περιοχής του εμβρύου στο στάδιο των 16 κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα διαιρούνται κατά μήκος, αλλά μόνο τα κεντρικά θυγατρικά κύτταρα συνεχίζουν την έκφραση του *WUS*. Απεικονίζονται δύο μηχανισμοί: Αρχικά όλα τα θυγατρικά κύτταρα κληρονομούν το *WUS* mRNA, το οποίο στη συνέχεια αποικοδομείται στα περιφερικά θυγατρικά κύτταρα, ενώ τα κεντρικά θυγατρικά κύτταρα διατηρούν την έκφραση του *WUS*. Εναλλακτικά, το *WUS* mRNA θα μπορούσε ήδη να κατανέμεται ασύμμετρα πριν την κυτταρική διαίρεση και ως εκ τούτου θα κληρονομηθεί από ένα μόνο θυγατρικό κύτταρο. Τα κύτταρα που εκφράζουν το *WUS* διαιρούνται τελικά

οριζοντίως, δημιουργώντας τις κυτταρικές στοιβάδες L2 και L3 στο προχωρημένο στάδιο του καρδιόσχημου εμβρύου. Σε αυτή την περίπτωση, η έκφραση του *WUS* περιορίζεται στα κάτω θυγατρικά κύτταρα. Ο προσανατολισμός του ακολουθούν οι κυτταρικές διαιρέσεις υποδεικνύονται με διακεκομμένες γραμμές.

Τα τρία *CLV* γονίδια κωδικοποιούν συστατικά ενός μονοπατιού μεταγωγής σιγιάλου, το οποίο επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών ομάδων του ακραίου και ανθικού μεριστώματος. Η επικοινωνία αυτή περιλαμβάνει τη ροή της πληροφορίας για τον καθορισμό της «τύχης» κάθε κυττάρου στο AMB. Μία σειρά βιοχημικών πειραματικών δεδομένων έχουν δείξει ότι οι *CLV1*, 2 και 3 πρωτεΐνες συνδέονται μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα μεμβρανικό σύμπλοκο μεταγωγής σιγιάλου (Yadav et al., 2011; Rojo et al., 2002).

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, το γονίδιο *WUS* προάγει το σχηματισμό του AMB, δια μέσω της επαγωγής του γονιδίου *CLV3* και της δημιουργίας του ενεργού CLV συμπλόκου. Το CLV σύμπλοκο μεταγωγής σιναύου πιθανότατα εμπλέκεται στον περιορισμό της έκφρασης του γονιδίου *WUS* (Εικόνα 1.13). Το *WUS* είναι επίσης ικανό να επάγει από μόνο του την μεταγραφή του *CLV3*, και αποτελεί βασικό συστατικό του CLV μονοπατιού μεταγωγής σιναύου. Η δράση του επιτρέπει τη διατήρηση ενός ικανού αριθμού *CLV3* μεταγραφημάτων στα ακραία μεριστωματικά κύτταρα, εξισορροπώντας την αρνητική ρύθμιση που επιφέρει στο ίδιο η μεταγωγή σιναύου του CLV συμπλόκου (Carles and Fletcher, 2003; Schoof et al., 2000). Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι το γονίδιο *WUS* αποτελεί τον στόχο της μεταγωγής σιναύου του CLV συμπλόκου. Το σινάλο που μεταβιβάζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, πιθανότατα δια μέσω μίας MAPKs, οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *WUS*. Ο μηχανισμός αυτός της αρνητικής ανάδρασης επιτρέπει τον περιορισμό της δράσης του γονιδίου *WUS* και κατά συνέπεια τη ρύθμιση της ομοιόστασης (τοπολογική και ποσοτική) των βλαστικών κυττάρων του AMB (Brand et al., 2000).



**Εικόνα 1.13: Μοντέλο συντήρησης του μεριστώματος του βλαστού.** Η ταυτότητα των βλαστικών κυττάρων καθορίζεται από τη μεταγωγή ενός σιναύου (κόκκινο βέλος) από το κέντρο οργάνωσης (κόκκινη περιοχή), το οποίο απαιτεί την έκφραση του γονιδίου *WUS*. Τα βλαστικά κύτταρα (μπλε περιοχή) περιορίζουν την έκφραση του γονιδίου *WUS* δια μέσω του CLV συμπλόκου μεταγωγής σιναύου. Τα κύτταρα που εξέρχονται της περιοχής που ελέγχεται από τη λειτουργία των γονιδίων CLV διαφοροποιούνται και ενσωματώνονται στις καταβολές των πλάγιων οργάνων.

Μελέτες έδειξαν ότι το *WUS* καταστέλλει άμεσα την μεταγραφή αρκετών γονιδίων *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR5, ARR6, ARR7 και ARR15)*, που δρουν στην αρνητική ανάδραση του σιναύου κυτοκινίνης υποδεικνύοντας πως το *WUS* προάγει την απόκριση κυτοκινίνης. Η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του CLV/*WUS* δικτύου και του σηματοδοτικού μονοπατιού της κυτοκινίνης απαιτείται για τη σωστή λειτουργία του μεριστώματος (Leibfried et al., 2005). Παράλληλα, η απόκριση κυτοκινίνης ρυθμίζει την έκφραση του *WUS* τόσο μέσω *CLV*-εξαρτώμενων όσο και *CLV*-ανεξάρτητων μηχανισμών. Τα δύο παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι το *WUS* και το σινάλο κυτοκινίνης αλληλεπιδρούν μέσω πολλαπλών μονοπατιών θετικής ανάδρασης τα οποία ελέγχουν τελικά τον αριθμό των βλαστικών κυττάρων στο AMB (Gordon et al., 2009).

Μια σειρά από επιπλέον ρυθμιστικά γονίδια ελέγχουν την θέση και τον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν το *WUS* και ως εκ τούτου έχουν επίσης ένα ρόλο στον έλεγχο της σταθερότητας του μεριστώματος. Ένα από αυτά είναι το *ULTRAPETALA (ULT)*, το οποίο

ανταγωνίζεται το *WUS* (Carles et al., 2004). Τα HD-ZIPIII γονίδια *CORONA (CNA)*, *PHABULOSA (PHAB)*, και *PHAVOLUTA (PHAV)* (τα δύο τελευταία είναι γνωστά για τον ρόλο τους στον έλεγχο της πολικότητας των οργάνων) επίσης περιορίζουν το μέγεθος της *WUS*-εκφράζουσας δομής και το μέγεθος του μεριστώματος (Prigge et al., 2005; Williams et al., 2005). Παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης συμμετέχουν στην πρόληψη της έκφρασης του *WUS* εκτός της περιοχής όπου εκφράζεται φυσιολογικά και το ενεργοποιούν άμεσα στην κανονική περιοχή του (Kwon et al., 2005; Kaya et al., 2001; Bertrand et al., 2003). Ένας άλλος γνωστός θετικός ρυθμιστής του *WUS* είναι το *STIMPY (STIP)*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της ίδιας οικογένειας με το *WUS* και απαιτείται για τη διατήρηση της έκφρασης του *WUS* στο μερίστωμα (Wu et al., 2005).

Το *WUS* αναδεικνύεται ως ένας κεντρικός ρυθμιστής της ταυτότητας και της σταθερότητας του μεριστώματος του βλαστού. Για την εξισορρόπηση της μετατόπισης των κυττάρων μακριά από το μερίστωμα με τον εφοδιασμό των νέων μεριστωματικών κυττάρων, πρέπει να διατηρείται ένα σταθερό και ακριβές πρότυπο έκφρασης του *WUS* εντός ενός πληθυσμού κυττάρων που πολλαπλασιάζεται συνεχώς. Αυτό επιτυγχάνεται με πολλαπλούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, πολλοί από τους οποίους δρουν για την καταστολή του *WUS* εκτός της κανονικής περιοχής έκφρασής του (Sablowski, 2007).

## **2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού

### 2.1.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS Murashige And Skoog)

- ◆ Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS με την κατάλληλη σύσταση.
- ◆ Αποστείρωση του διαλύματος για 20 min στους 120°C.
- ◆ Προσθήκη 20ml υποστρώματος σε τρυβλία Petri μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow) για την επίτευξη αποστειρωμένων συνθηκών.
- ◆ Τα τρυβλία αφήνονται ώστε να στερεοποιηθεί το θρεπτικό.
- ◆ Τα τρυβλία μπορούν να φυλαχθούν για περίπου 2 εβδομάδες στους 4°C.

### 2.1.2 Εγκατάσταση και ανάπτυξη φυτών *Arabidopsis thaliana* και *Nicotiana tabacum*

α) Τοποθέτηση των σπερμάτων σε ddH<sub>2</sub>O για 24h στους 4°C προκειμένου να εξέλθουν από το στάδιο του ληθάργου και να ακολουθήσει η εκβλάστησή τους.

β) Απολύμανση και επίστρωση των σποριών κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

- ◆ Απολύμανση των σπερμάτων με 70% αιθανόλη για 30sec.
- ◆ Απομάκρυνση της αιθανόλης.
- ◆ Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 20% για 1-2min ανάλογα με την ποσότητα των σπερμάτων. Απομάκρυνση του διαλύματος της χλωρίνης.
- ◆ Ξέπλυμα των σπερμάτων 5 φορές με αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O επί μερικά δευτερόλεπτα τη φορά.
- ◆ Επίστρωση των σποριών σε στρογγυλά τρυβλία Petri που περιέχουν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με την βοήθεια πιπέτας Gilson.
- ◆ Τα τρυβλία αφήνονται μισάνοιχτα για να στεγνώσουν για περίπου 30min.
- ◆ Σφράγιση των τρυβλίων με διπλή ταινία parafilm και μεταφορά σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22°C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι).
- ◆ Μετά το πέρας περίπου δύο εβδομάδων κι αφού τα φυτά έχουν μια ανάπτυξη που να καθιστά δυνατή την μεταφύτευσή τους, μεταφέρονται σε μείγμα χώματος όπου και καλύπτονται με διάφανη μεμβράνη ή πλαστικό. Τα φυτά παραμένουν σκεπασμένα για 3-4 περίπου ημέρες ώστε να βοηθηθούν από το καθεστώς της αυξημένης υγρασίας να ξεπεράσουν το σοκ της καταπόνησης που προκλήθηκε από την μεταφύτευση. Η ανάπτυξη των φυτών συνεχίζεται στις ίδιες ελεγχόμενες συνθήκες και στον ίδιο θάλαμο ανάπτυξης.

## 2.2 Τύποι φυτών *Arabidopsis thaliana* που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω εργασία

- ◆ Αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Columbia (Col-0)
- ◆ Διαγονιδιακές σειρές *Arabidopsis thaliana*
  - ◆ WUS::GUS οικοτύπου Landsberg erecta (Ler)
  - ◆ WUS::GUS/RacRNAi (10H) γενιά F<sub>2</sub>
  - ◆ WUS::GUS/LFY-RNAi (10.141) γενιά F<sub>2</sub>
  - ◆ FA4C (CYCLINB1;1::GUS) οικοτύπου Columbia (Col-0)
  - ◆ FA4C/RacRNAi (10H) γενιά F<sub>2</sub>

## 2.3 Βακτηριακά στελέχη

### 2.3.1 *Escherichia coli*

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση πλασμιδίων είναι το DH5a (*E.coli*). Το στέλεχος αυτό έχει υψηλή ικανότητα μετασηματισμού (>2x10<sup>6</sup>

transformants/ $\mu\text{g}$  of plasmid DNA). Ο γονότυπός τους χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της  $\Delta$  (*lacZ*) M15 περιοχής που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της  $\beta$ -γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την συμπληρωματικότητα με το *lac-a* τμήμα που κωδικοποιείται από πολλούς πλασμιδιακούς φορείς. Έτσι είναι δυνατή η επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο που περιέχει X-gal και IPTG.

### 2.3.1.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  $O.D._{550} = 0.5$ .
- ◆ 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.

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

- ◆ Σε 200μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- ◆ Το μίγμα αναμιγνύεται και επώαζεται 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 1 ώρα.
- ◆ Φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 13000 r/min για 1min και απομάκρυνση των 2/3 του υπερκειμένου.
- ◆ Επαναδιάλυση του ιζήματος και επίστρωση κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής που διαφέρει κατά περίσταση.
- ◆ Επώαση των τρυβλίων για 12-16 hrs σε θάλαμο στους 37 °C.

### 2.3.1.γ Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασχηματισμού (Transform efficiency)

- ◆ Χωρίζουμε το τρυβλίο σε τεταρτημόρια και μετράμε τις αποικίες σε ένα από αυτά. Έστω ότι έχουμε  $n$  αποικίες.

- ◆ Στο τρυβλίο 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 γ μl από τα z μl που είχαμε αρχικά. Οπότε:
  - Στα γ μl που επιστρώσαμε έχουμε 400n αποικίες
  - Στα z μl έχουμε x? αποικίες,  $x = 400nz/\gamma$  αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA.

Ικανοποιητικό εύρος αποδοτικότητας:

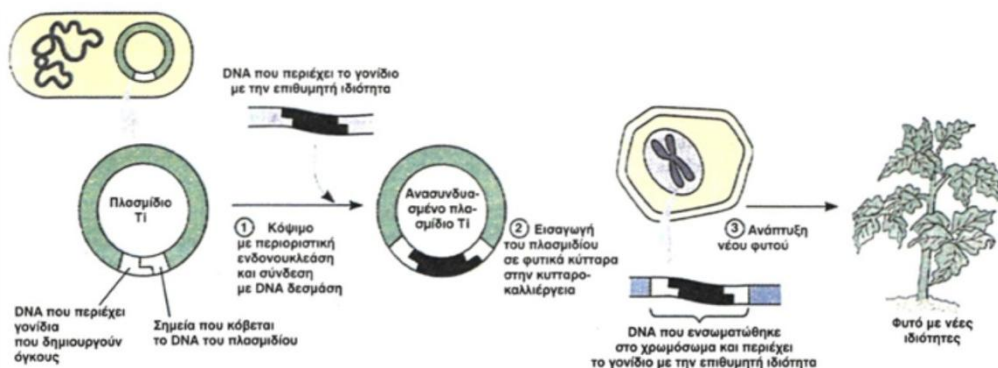
$5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$  αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA

### 2.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα αρνητικό κατά Gram αερόβιο βακτήριο το οποίο έχει μορφή ραβδίων και ανήκει στην οικογένεια *Rhizobiaceae*. Το βακτήριο αυτό περιέχει ένα πλασμίδιο μεγέθους περίπου 200 kb, το οποίο ονομάζεται πλασμίδιο Ti (tumor inducing) και έχει την ιδιότητα να μετασχηματίζει τα φυτικά κύτταρα, ενσωματώνοντας το DNA του στο γονιδίωμα τους.

Το πλασμίδιο Ti δεν μεταφέρεται ολόκληρο στα φυτικά κύτταρα αλλά μόνο μια περιοχή του (μήκους περίπου 20 kb), που ονομάζεται T-DNA (Transfer DNA). Η περιοχή αυτή μεταφέρεται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων και επειδή περιέχει ορισμένα ογκογονίδια είναι υπεύθυνη για την δημιουργία ενός είδους καρκίνου, που ονομάζεται crown gall.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το πλασμίδιο Ti μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας φυσικός φορέας (vector) μεταφοράς και έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτικά κύτταρα. Ως εκ τούτου ο φυσικός μηχανισμός μεταφοράς γενετικού υλικού σε φυτικά κύτταρα από τα αγροβακτήρια χρησιμοποιείται για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών αφού γίνουν οι κατάλληλες γενετικές επεμβάσεις. Στόχος η απενεργοποίηση των γονιδίων που δημιουργούν τους όγκους τοποθετώντας στο πλασμίδιο το γονίδιο που θα προσδώσει στο φυτό μία επιθυμητή ιδιότητα.



**Εικόνα 2.1:** Στο παραπάνω σχήμα φαίνονται τα στάδια που ακολουθούνται για την χρήση του πλασμιδίου Ti, που απομονώνεται από το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, ως φορέας για την εισαγωγή επιθυμητών γονιδίων στα φυτά.



Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος GV3101::pMP90 που είναι παράγωγο του στελέχους C58 του *Agrobacterium tumefaciens* και περιέχει το Ti πλασμίδιο pTiC58ΔT-DNA. Το συγκεκριμένο στέλεχος εκφράζει αντοχή στα αντιβιοτικά Rifampicin/Gentamicin sulphate. Η Rifampicin λειτουργεί ως δείκτης επιλογής του βακτηρίου και η Gentamicin sulphate ως δείκτης επιλογής του Ti πλασμιδίου σε συγκεντρώσεις 50μg/ml και 25μg/ml αντίστοιχα.

### **2.3.2.α Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο freeze – thaw**

- ◆ Προσθήκη περίπου 1μg πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα.
- ◆ Πάγωμα των κυττάρων σε υγρό άζωτο <sup>(1)</sup>.
- ◆ Ξεπάγωμα των κυττάρων με επώαση του φιαλιδίου errendorf σε υδατόλουτρο των 37°C για 5min.
- ◆ Προσθήκη 1ml LB θρεπτικού μέσου στο φιαλίδιο errendorf και επώαση στους 28°C για 2-4hrs με απαλή ανάδευση. Αυτή η περίοδος επιτρέπει τα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο αντιβιοτικής αντοχής.
- ◆ Φυγοκέντρηση των φιαλιδίων για 30sec. Αποβολή του υπερκείμενου διαλύματος και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 0.1ml LB θρεπτικό μέσο.
- ◆ Στρώσιμο των κυττάρων σε τρυβλίο LB/agar που περιέχει τα αντιβιοτικά <sup>(2)</sup> Ριφαμπικίνη (Rifampicin), Τζενταμικίνη (Gentamicin sulphate) και Καναμικίνη (Kanamycin). Οι μετασηματισμένες αποικίες θα εμφανιστούν σε 2-3 ημέρες.
- ◆ Επώαση στους 28°C.

<sup>1</sup> Το γρήγορο πάγωμα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας της διαδικασίας. Πάγωμα σε ξηρό πάγο/λουτρό αιθανόλης συχνά μειώνει σημαντικά τη συχνότητα μετασηματισμού.

<sup>2</sup> Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών ποικίλει εξαρτώμενη από το στέλεχος του *Agrobacterium* και τον δείκτη αντιβιοτικής αντοχής που χρησιμοποιείται.

### **2.3.3 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 800μl από την παραπάνω καλλιέργεια σε φιαλίδιο errendorf και προστίθενται 400μl 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.

## **2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

### **2.4.1 Αλκαλική λύση πλασμιδιακού DNA (Alkaline miniprepation)**

- ◆ Μεταφορά 1.5ml από υγρή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε σε LB over night σε errendorf και φυγοκέντρηση για 1min στις 13000r/min.
- ◆ Απομάκρυνση υπερκείμενου ώστε το ίζημα (pellet) να μείνει όσο πιο στεγνό γίνεται.
- ◆ Προσθήκη 0.2ml διαλύματος P1 και επαναδιάλυση του ιζήματος με πιπέτα.

- ◆ Προσθήκη 0.2ml διαλύματος P2, ανάδευση ελαφρά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές και επώαση του erpendorf ανοιχτό σε RT (θερμοκρασία δωματίου) για 4min.
- ◆ Προσθήκη 0.2ml παγωμένου διαλύματος 3M CH<sub>3</sub>COOK/5M CH<sub>3</sub>COOH και καλή ανάμιξη μέχρι να εμφανιστούν λευκά κομμάτια.
- ◆ Επώαση στον πάγο για 15min.
- ◆ Φυγοκέντρηση για 20min στους 4<sup>0</sup>C στις 13000r/min.
- ◆ Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
- ◆ Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης Et-OH 100% (αιθανόλη) και καλή ανάμιξη.
- ◆ Επώαση για 10min σε RT.
- ◆ Φυγοκέντρηση στις 13000r/min για 15min.
- ◆ Απομάκρυνση της Et-OH χωρίς τίναγμα και επώαση σε RT ανοιχτό για στέγνωμα.
- ◆ Προσθήκη κατάλληλου όγκου dH<sub>2</sub>O και επαναδιάλυση του ιζήματος.
- ◆ Αποθήκευση και διατήρηση στους -20<sup>0</sup>C.

## 2.5 Πέψη Νουκλεϊνικών Οξέων με Ένζυμα Περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που κόβουν dsDNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Για να δράσει ένα ένζυμο περιορισμού, δηλαδή να αναγνωρίσει και να “κόψει” μια εξωνουκλεοτιδική αλληλουχία βάσεων, χρειάζεται κατάλληλες συνθήκες:

- I. 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.
- II. 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.
- III. 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 erpendorf 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<sup>0</sup>C. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη φαίνονται στον πίνακα 1.

## 2.6 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 ποικίλει 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 (ladder) οι οποίοι έχουν καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη.

## 2.7 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 eppendorf 1.5ml.
- ◆ Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολλο της QIAquick Gel Extraction Kit (Cat No 28704).

## 2.8 Ενοποίηση 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 ενοποίησή τους με κατάλληλο τμήμα DNA μέσω της λιγάσης.

### 2.8.1 Διαδικασία A-tailing

Ορισμένες DNA πολυμεράσες με επιδιορθωτική δράση, όπως η Pfu DNA πολυμεράση, η Pwo DNA πολυμεράση και η Tli DNA πολυμεράση, παράγουν τμήματα με τυφλά άκρα.

Παρ' όλα αυτά, τα προϊόντα PCR που παράγονται με αυτές οι πολυμεράσες μπορούν να τροποποιηθούν με την χρήση της διαδικασίας A-tailing. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι η δημιουργία τμημάτων με προεξέχοντα μόρια αδενίνης στο 3' άκρο. Αυτό επιτυγχάνεται με μια αντίδραση στην οποία χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως η Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει τη δυνατότητα να προσθέτει μόρια αδενίνης στο 3' άκρο. Έτσι, καθίσταται δυνατή η ενοποίηση των υπό κλωνοποίηση τμημάτων με φορείς οι οποίοι φέρουν προεξέχοντα μόρια θυμίνης στο 3' άκρο τους, όπως είναι οι φορείς pGEM-T και pGEM-T Easy. Με την χρήση αυτής της μεθόδου, εισάγεται μόνο μία ένθεση εντός του φορέα (σε αντίθεση με την εισαγωγή πολλαπλών ενθέσεων που μπορεί να συμβεί στην κλωνοποίηση με τυφλά άκρα).

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

- ◆ 1-7μl προϊόντος PCR με τυφλά άκρα
- ◆ Κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Taq DNA πολυμεράσης 10x με MgCl<sub>2</sub>, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1x
- ◆ 5 units Taq DNA πολυμεράση
- ◆ dATPs σε τελική συγκέντρωση 0.2mM
- ◆ ddH<sub>2</sub>O μέχρι την συμπλήρωση 10μl αντίδρασης
- ◆ Επώαση της αντίδρασης για 15-30min στους 70°C

### 2.8.2 Αντίδραση Ενοποίησης

Το ένζυμο T4 DNA λιγάση έχει την ιδιότητα να αναγνωρίζει άκρα και να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Ως εκ τούτου, καθίσταται δυνατή η ενοποίηση επιθυμητών τμημάτων DNA με πλασμιδιακούς φορείς εφόσον τα άκρα τους είναι συμπληρωματικά. Για τον λόγο αυτό οι πλασμιδιακοί φορείς καθίστανται γραμμικοί μετά από πέψη με ένζυμο περιορισμού.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T Easy και pGBKT7. Η κάθε αντίδραση ενοποίησης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 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 ανμειγνύεται και τοποθετείται για 4-12hrs στους 14-16°C

### 2.9 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (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	5x	1x	10μl
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	-	-	Ποικίλει
<b>DNA πολυμεράση</b>	<b>(units/μl)</b>	<b>(units)</b>	<b>(u/μl)</b>
Phussion (NEB)	2	1	0.5μl
ddH <sub>2</sub> O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl		

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προσθέτονται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.2ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR που είναι τοποθετημένος στον πάγο. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρούνται 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.

<b>1x</b>	α) Αποδιάταξη της μήτρας για 2min στους 95 <sup>o</sup> C
<b>25-40x</b>	β) Αποδιάταξη στους 95 <sup>o</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>o</sup> C για χρόνο που ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του πολυμερισμού και των προδιαγραφών του ενζύμου
<b>1x</b>	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>o</sup>C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης του υβριδίου (T<sub>m</sub>).

**(ii):** Η θερμοκρασία T<sub>m</sub> υπολογίζεται από τον τύπο:

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

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<sup>o</sup>C.

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

Όνομασία εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία με κατεύθυνση 5' - 3'
<u>TFL2-SacI F</u>	ATAGAGCTCATGAAAGGGGCAAGTGGTGCT
<u>TFL2-NdeI F</u>	ATACATATGATGAAAGGGGCAAGTGGTGCT
<u>TFL2-PstI R</u>	AGTCTGCAGTTAAGGCGTTCGATTGTA CTTGAG

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

Πρόγραμμα PCR 1	Πρόγραμμα PCR 2
<b>Εκκινητές:</b> TFL2-SacI F/TFL2-PstI R	<b>Εκκινητές:</b> TFL2-NdeI F/TFL2-PstI R
1. 95°C for 2min	1. 95°C for 2min
2. 95°C for 30sec	2. 95°C for 30sec
3. 65°C for 40sec	3. 65°C for 40sec
4. 72°C for 100sec	4. 72°C for 55sec
5. Go to 2 for 25 times	5. Go to 2 for 25 times
6. 72°C for 5min	6. 72°C for 5min
7. 10°C for ever	7. 10°C for ever
8. End	8. End

## 2.10 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)-Split GFP σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum*)

### 2.10.1 Πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein)

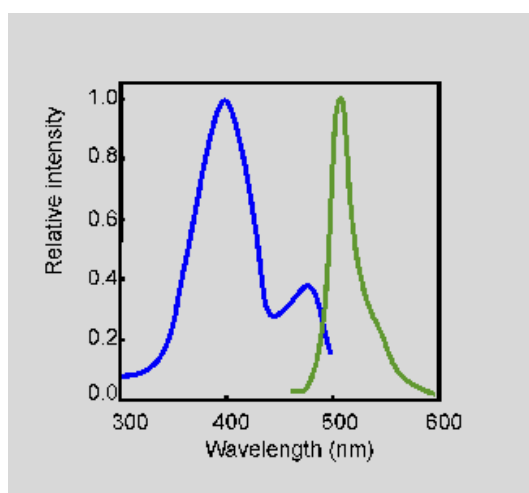
Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) είναι μία πρωτεΐνη 27 kD που αποτελείται από 238 κατάλοιπα αμινοξέων. Η GFP εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην μέδουσα *Aequorea victoria*. Η GFP της *A. victoria* έχει μια κύρια κορυφή διέγερσης σε μήκος κύματος 395 nm και μία μικρότερη σε 475 nm. Η κορυφή εκπομπής της είναι στα 509 nm, η οποία βρίσκεται στο πράσινο τμήμα του ορατού φάσματος και μία μικρότερη στα 540 nm. Αντίθετα με τις περισσότερες φθορίζουσες πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν χρωμοφόρα ξεχωριστό από την αλληλουχία του αμινοξέων της πρωτεΐνης, το χρωμοφόρο της GFP παράγεται εσωτερικά από μια αντίδραση που περιλαμβάνει τρία κατάλοιπα αμινοξέων.

Αυτή η μοναδική ιδιότητα επιτρέπει στην GFP να κλωνοποιηθεί εύκολα σε πολυάριθμα βιολογικά συστήματα, τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά, το οποίο άνοιξε το δρόμο για τη χρησιμοποίησή της σε μια ποικιλία βιολογικών εφαρμογών και κυρίως στην βιοανίχνευση.

Σήμερα, υπάρχουν πολλές νέες παραλλαγές της GFP με βελτιωμένες ή συμπληρωματικές ιδιότητες σε σχέση με εκείνες της GFP της *A. victoria*, καθώς στην κυτταρική και μοριακή βιολογία, το γονίδιο GFP χρησιμοποιείται συχνά ως γονίδιο αναφοράς της έκφρασης. Αυτές οι GFP-like πρωτεΐνες επιτρέπουν την παρακολούθηση στο χρόνο και στο χώρο ενός συνεχώς αυξανόμενου αριθμού φαινομένων σε ζωντανά κύτταρα και οργανισμούς, όπως η γονιδιακή έκφραση, ο εντοπισμός και η δυναμική των πρωτεϊνών, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, η κυτταρική διαίρεση, η αντιγραφή και η οργάνωση των χρωμοσωμάτων, ενδοκυτταρικές οδοί μεταφοράς, βιογένεση οργανιδίων, κ.α. Επιπλέον, οι αισθητήρες που αναφέρουν τιμές pH, συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  και άλλα βασικά χαρακτηριστικά του εσωτερικού των ζωντανών κυττάρων έχουν κατασκευαστεί από GFP-like πρωτεΐνες. Η πιο κοινή χρήση της GFP είναι να παρακολουθεί τη θέση, την κυκλοφορία και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών που εκφράζονται μέσω της σύντηξής τους με την GFP.

Η τεχνική επανάσταση που προκύπτει από την ανακάλυψη της GFP σχετίζεται με μια αξιοθαύμαστη ιδιότητα του χρωμοφόρου που είναι υπεύθυνο για τον φθορισμό της. Αυτό το χρωμοφόρο σχηματίζεται αυθόρμητα από ένα μοτίβο τρι-πεπτιδίου στην πρωτοταγή δομή της GFP, έτσι ώστε ο φθορισμός του ξεκινά "αυτόματα" σε κάθε οργανισμό όπου εκφράζεται. Με άλλα λόγια, η ωρίμανση του χρωμοφόρου της GFP απαιτεί μόνο οξυγόνο και δεν εξαρτάται από την παρουσία ενζύμων ή άλλων βοηθητικών παραγόντων. Η GFP είναι γενικά μη τοξική και μπορεί να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε διαφορετικούς οργανισμούς με αμελητέες επιπτώσεις στη φυσιολογία τους.

Από τη σκοπιά της χρησιμότητας της στις βιοεπιστήμες, ορισμένες πτυχές της λειτουργίας του GFP ξεχωρίζουν. Μεταξύ αυτών είναι: (i) η φωτεινότητα του μορίου, (ii) η φωτο-σταθερότητα του μορίου, (iii) η ύπαρξη μορίων GFP-like με διαφορετικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής σε όλη την ορατή περιοχή (iv) η ταχεία και αποτελεσματική αναδίπλωση του μορίου μέσα στο κύτταρο (v) η ταχεία ωρίμανση του χρωμοφόρου μετά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και (vi) η μονομερής διαμόρφωση των GFP-like πρωτεϊνών, για τη διευκόλυνση της σύντηξής τους με επιθυμητές πρωτεΐνες.

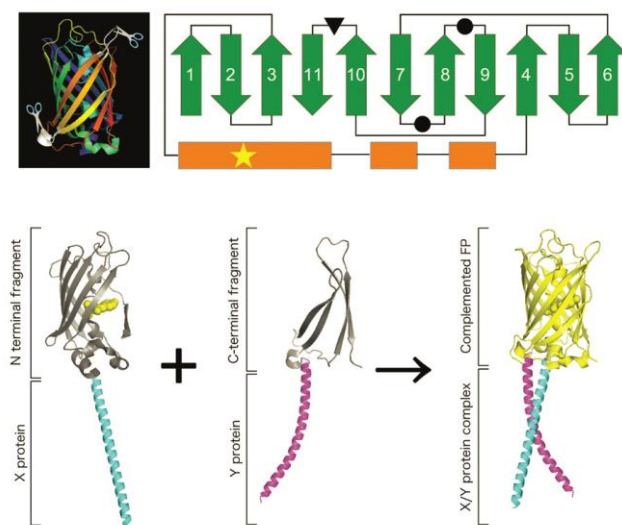


**Εικόνα 2.2:** Το φάσμα διέγερσης της αγρίου τύπου GFP από την *A. victoria* (μπλε) έχει δύο μέγιστα διέγερσης στα 395 nm και στα 475 nm. Το φάσμα εκπομπής φθορισμού (πράσινο) έχει μία κύρια κορυφή στα 509 nm και μία μικρότερη στα 540 nm.

### 2.10.2 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)

Η BiFC είναι μια τεχνική που βασίζεται στον φθορισμό και επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε ζωντανά κύτταρα. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής τοποθέτησης των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών και καταδεικνύει αν αλλάζει με την πάροδο του χρόνου, χωρίς να απαιτείται η προσθήκη εξωτερικών παραγόντων. Η διαδικασία BiFC βασίζεται στην δομική συμπλήρωση μεταξύ δύο μη φθορίζοντων N-τελικού και C-τελικού τμημάτων μίας φθορίζουσας πρωτεΐνης. Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες, π.χ., η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), αποτελούνται από 11 αντιπαράλληλους β-κλώνους που σχηματίζουν μία δομή β-βαρελιού, με μία α-έλικα εσωτερικά και αρκετές μικρού μήκους ελικοειδείς δομές. Το χρωμοφόρο, που βρίσκεται στην α-έλικα εντός της δομής του β-βαρελιού, σχηματίζεται από τρία κατάλοιπα. Για την ανάλυση BiFC, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι φθορίζουσες πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε ένα βρόχο ή εντός ενός β-κλώνου. Τα δύο προκύπτοντα μη φθορίζοντα τμήματα μπορούν στη συνέχεια να συντηχθούν με επιθυμητές πρωτεΐνες που μπορεί να αλληλεπιδρούν. Εάν οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, τα μη φθορίζοντα τμήματα έρχονται σε στενή γειτνίαση με αποτέλεσμα την ανασύσταση της ακεραίας φθορίζουσας πρωτεΐνης που μπορεί να απεικονιστεί χρησιμοποιώντας οποιοδήποτε μικροσκόπιο φθορισμού. Αν οι πρωτεΐνες που είναι συντηγμένες με τα διαχωρισμένα τμήματα της φθορίζουσας πρωτεΐνης δεν αλληλεπιδρούν, δεν λαμβάνει χώρα η ανασύσταση της και δεν ανιχνεύεται φθορισμός.

Αρκετά είναι τα σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής. (i) Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιώντας BiFC οπτικοποιούνται στο κανονικό περιβάλλον του φυτικού κυττάρου. (ii) Η BiFC είναι πολύ ευαίσθητη και μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων όταν οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα υπό τον έλεγχο των ενδογενών προαγωγέων. (iii) Το πιο βασικό πλεονέκτημα της BiFC είναι ότι η πρωτεϊνική αλληλεπίδραση συμβαίνει στο πραγματικό υποκυτταρικό διαμέρισμα των εξεταζόμενων πρωτεϊνών. (iv) Ο σχηματισμός του πρωτεϊνικού συμπλόκου στην BiFC λαμβάνει χώρα μέσω μιας πολλαπλών βημάτων οδού *in vitro* όπως και *in vivo*. (v) Με την BiFC μπορεί επίσης να διερευνηθεί το δομικό υπόβαθρο του σχηματισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου. (vi) Η BiFC προσέγγιση καθιστά δυνατό τον εντοπισμό σημάτων που επάγουν τον σχηματισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων ή που διαμορφώνουν την ενδοκυτταρική τους κατανομή *in planta*.



**Εικόνα 2.3: Αρχή της τεχνικής BiFC.** (A) Τρισδιάστατη δομή της Venus κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης. (B) Τοπολογία αναδίπλωσης μίας φθορίζουσας πρωτεΐνης. Τα αριθμημένα πράσινα βέλη και τα πορτοκαλί κουτιά υποδεικνύουν τους β-κλώνους και τις α-έλικες αντίστοιχα. Οι δύο κλειστοί κύκλοι υποδεικνύουν τις θέσεις των κανονικών θέσεων διαχωρισμού και το βέλος υποδεικνύει την θέση διαχωρισμού μεταξύ του 10ου και του 11ου β-κλώνου. Το αστέρι υποδηλώνει το φθοροφόρο. (C) Αρχή της BiFC. Η αριστερή δομή αντιπροσωπεύει το N-τελικό θραύσμα της BiFC (VN155) συγχωνευμένο με την επιθυμητή αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη X,

με κίτρινο υποδεικνύεται το φθοροφόρο. Η δομή στο κέντρο αντιπροσωπεύει το C-τελικό θραύσμα της BiFC (VC155) συγχωνευμένο με την άλλη αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη Y. Η αριστερή δομή δείχνει την ανασυγκροτημένη φθορίζουσα πρωτεΐνη (FP) και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο X/Y.



### 2.10.3 Split GFP σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum*)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι σύμφωνο με το τεχνικό εγχειρίδιο των Walter et al. (2004) για την οπτικοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω φθορίζουσας συμπληρωματικότητας σε ζωντανά φυτικά κύτταρα.

Το σύστημα περιέχει δύο πλασμιδιακούς φορείς, τον pSPYNE και τον pSPYCE όπου σε κάθε έναν είναι κλωνοποιημένη η αμινο-υπομονάδα και η καρβόξυ-υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες των οποίων επιθυμείται ο έλεγχος της αλληλεπίδρασής τους κλωνοποιήθηκαν στους φορείς στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την αντίστοιχη υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης. Στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* με την κάθε κατασκευή ξεχωριστά. Οι δυο καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων αναμείχθηκαν σε ίσες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ένεση στην υποδερμίδα φύλλων καπνού *Nicotiana tabacum* προκαλώντας παροδικό μετασχηματισμό στα κύτταρα του καπνού. Μετά το πέρας 65-72 ωρών ήταν δυνατή η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μέσω της ανίχνευσης της ακτινοβολίας που παράγεται με μικροσκόπιο φθορισμού. Προκειμένου όμως να μπορέσει να λειτουργήσει το σύστημα, απαιτείται η χρήση της πρωτεΐνης p19. Στον παροδικό μετασχηματισμό, οι εισερχόμενοι πλασμιδιακοί φορείς ανιχνεύονται ως εξωγενείς από τα κύτταρα με συνέπεια την επαγωγή του μηχανισμού της RNAi αποσιώπησης για την αντιμετώπιση της προσβολής. Η πρωτεΐνη p19 λειτουργεί ως καταστολέας της αποσιώπησης επιτρέποντας την έκφραση των πλασμιδιακών φορέων.

#### Πρωτόκολλο αγρο-διήθησης:

- ◆ Ανάπτυξη μονών αποικιών μετασχηματισμένων *Agrobacterium tumefaciens* που φέρουν ξεχωριστά τα πλασμίδια της αλληλεπίδρασης αλλά και το πλασμίδιο p19 σε 5ml θρεπτικού μέσου LB, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών επιλογής, over night.
- ◆ Επανακαλλιέργεια κάθε μονής αποικίας με αραιώση 1:25 σε 10ml θρεπτικού μέσου LB για 4-5h στους 28°C παρουσία έντονης ανάδευσης μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει το  $OD_{600}=0.7$
- ◆ Φυγοκέντρηση για 15min στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- ◆ Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος διήθησης (infiltration media) ώστε η οπτική πυκνότητα των κυττάρων να είναι  $OD_{600}=0.7$  για τα προς αλληλεπίδραση πλασμίδια και  $OD_{600}=1$  για το p19
- ◆ Επώαση για 1.5h σε θερμοκρασία δωματίου
- ◆ Ανάμιξη ίσης ποσότητας από κάθε αγρο-καλλιέργεια και εμβολιασμός με το τελικό διάλυμα φύλλων καπνού

### 2.11 Στερέωση και χρώση GUS σε φυτικούς ιστούς

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Jefferson et al, (1987) και Rodrigues Pousada et al (1993).

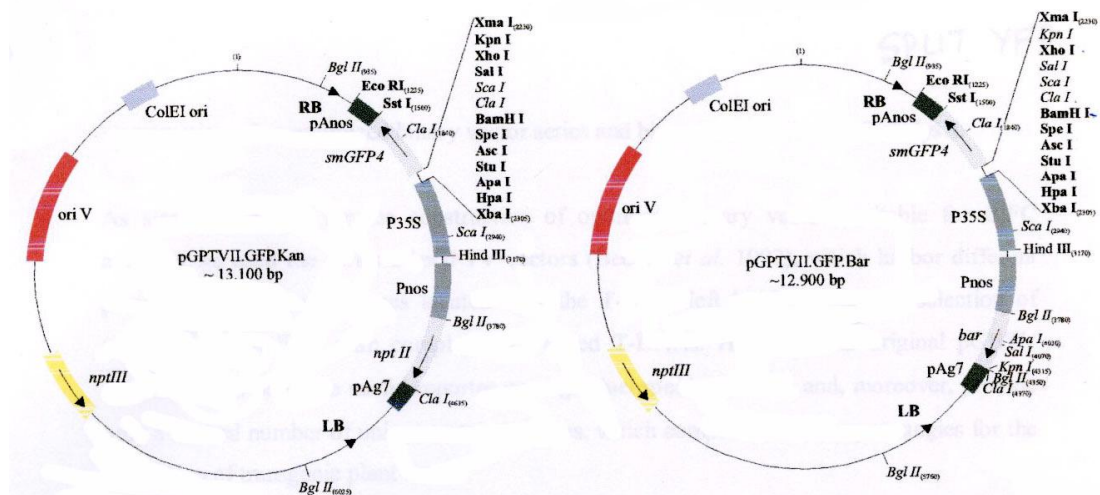
- ◆ Φυτικά όργανα *Arabidopsis thaliana* τοποθετούνται σε διάλυμα 90% ακετόνης για 20 min στους 4°C. Στο στάδιο αυτό γίνεται μερική στερέωση του ιστού.
- ◆ Η ακετόνη αφαιρείται και οι ιστοί ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα ξεπλύματος RS (Riense solution), προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η ακετόνη.
- ◆ Προσθήκη διαλύματος χρώσης GSS (GUS staining solution) μέχρι ο ιστός να καλυφθεί πλήρως.
- ◆ Ακολουθεί διείσδυση, των ιστών με την βοήθεια αντλίας κενού 2 – 3 φορές. Σε αυτό το στάδιο δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, έτσι ώστε τα φυτικά όργανα να είναι πλήρως εμβαπτισμένα μέσα στο διάλυμα GSS και να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρος γύρω από τον ιστό.

- ◆ Επώαση στους 37°C για μία έως 24 ώρες ανάλογα με τον ιστό και την ενζυμική δραστηριότητα. Στην παρούσα μελέτη η χρώση πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 4-16 ωρών.
- ◆ Αφαιρούμε το διάλυμα χρώσης GSS και αφυδατώνουμε τον ιστό σταδιακά με την τοποθέτηση του σε διαλύματα αιθανόλης 15% και 30% για 1 ώρα, αντίστοιχα.
- ◆ Τοποθέτηση των ιστών σε διάλυμα FAA (Fixative mix) για 2 ώρες για 30 min στους 4°C. Ο ιστός μπορεί να διατηρηθεί σε αυτό το διάλυμα στους 4°C για μερικές ημέρες (3 – 4) χωρίς να καταστραφεί ή να υποστεί αλλοίωση.
- ◆ Αφυδατώνουμε τον ιστό σταδιακά με την τοποθέτηση του σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 85%, 95% και 100% για 30 min αντίστοιχα. Οι ιστοί κατά αυτόν τον τρόπο αποχρωματίζονται, καθώς έχουμε μία σταδιακή απομάκρυνση της χλωροφύλλης και η εμφάνιση του μπλε χρώματος είναι πιο έντονη.
- ◆ Η φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε σε μικροσκόπιο.

## 2.12 Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν

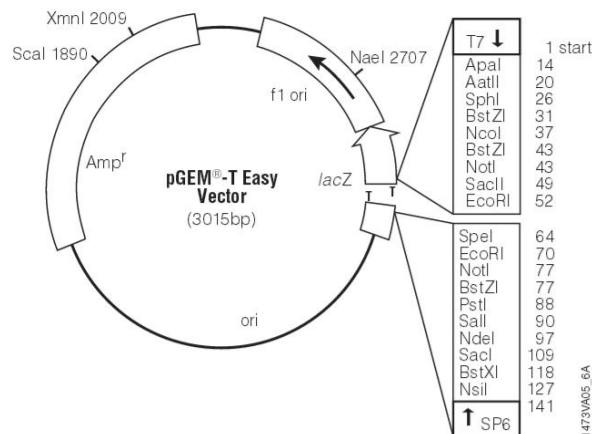
### 2.12.1 ρSPYNE/ρSPYCE

Είναι φορείς οι οποίοι δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της τεχνολογίας του BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) για την οπτικοποίηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα ζωικών και φυτικών οργανισμών. Οι φορείς αυτοί ονομάστηκαν ως ρSPYNE and ρSPYCE (split YFP N-terminal/C-terminal fragment expression) και έχουν μέγεθος 13.1kb και 12.9kb αντίστοιχα. Επιπλέον, περιέχουν τον καθολικό προαγωγέα 35S και μία περιοχή αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού (MCS, Multiple Cloning Site), διευκολύνοντας την κλωνοποίηση τμημάτων. Κάθε φορέας παρέχει τη δυνατότητα της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται συντηγμένες είτε στο N-άκρο, 155 αμινοξέα, (YFPN) είτε στο C- άκρο, 86 αμινοξέα (YFPC) της YFP πρωτεΐνης.



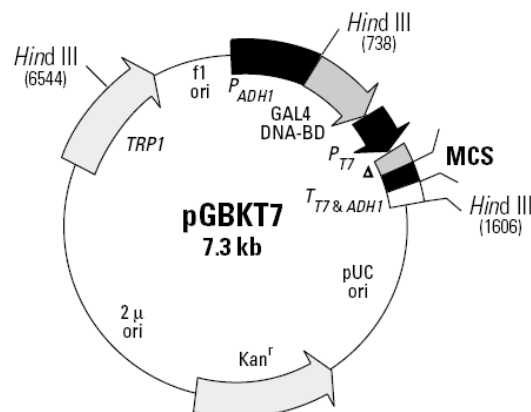
**Εικόνα 2.4:** Οι πλασμιδιακοί φορείς ρSPYNE (pGPTVII.GFP.Kan) και ρSPYCE (pGPTVII.GFP.Bar) που χρησιμοποιούνται ως φορείς αλληλεπίδρασης στο σύστημα SPLIT-GFP.

### 2.12.2 pGEM-T Easy



Ο φορέας pGEM-T Easy είναι ένας γραμμικός φορέας με μία 3'-τελική θυμίνη στα δύο άκρα. Τα T-προεξέχοντα άκρα στη θέση εισαγωγής βελτιώνουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της ενοποίησης με προϊόντα PCR εμποδίζοντας την επανακυκλοποίηση του φορέα και παρέχοντας συμβατά προεξέχοντα άκρα για τα προϊόντα PCR με τυφλά άκρα που παράγονται από ορισμένες πολυμεράσες. Επιπλέον, είναι φορέας που δίνει μεγάλο αριθμό αντιγράφων και περιέχει τους προαγωγείς T7 και SP6 RNA πολυμεράσης που βρίσκονται πλευρικά μιας περιοχής πολλαπλών θέσεων ενζύμων περιορισμού, εντός της κωδικής περιοχής του α-πεπτιδίου του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης. Ως εκ τούτου, εισαγωγή ένθεσης αδρανοποιεί το α-πεπτιδίο επιτρέποντας την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων κυττάρων από τις μπλε/λευκές αποικίες στα τρυβλία ενώ περιέχει και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

### 2.12.3 pGBKT7



Ο φορέας pGBKT7 χρησιμοποιείται στο σύστημα yeast two hybrid και εκφράζει πρωτεΐνες συντηγμένες με τα αμινοξέα 1-147 της περιοχής δέσμησης GAL4 DNA (DNA-BD). Στη ζύμη, οι συντηγμένες πρωτεΐνες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα από τον ενδογενή προαγωγέα ADH1 ( $P_{ADH1}$ ). Ο φορέας pGBKT7 αντιγράφεται αυτόνομα τόσο στο *E. coli* όσο και στην *S. cerevisiae* από τις pUC και 2  $\mu$  ori, αντίστοιχα. Επιπλέον, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη για επιλογή σε *E. coli* και τον διατροφικό δείκτη TRP1 για επιλογή σε ζύμη. Στελέχη ζύμης που περιέχουν τον φορέα pGBKT7 εμφανίζουν υψηλότερη

απόδοση μετασηματισμού από τα στελέχη που φέρουν άλλους φορείς με περιοχή DNA-BD.

## 2.13 Διαλύματα και Θρεπτικά Μέσα

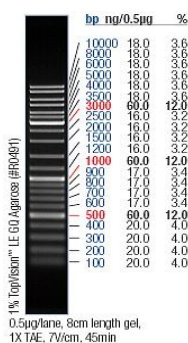
### 2.13.1 Θρεπτικά διαλύματα φυτών

#### MS (Murashige and Skoog)

- ◆ **MS:** 4.41g/l MS (Murashige and Skoog medium, μακρο-μικροστοιχεία και βιταμίνες), 0.05% MES (για σταθεροποίηση του pH. SIGMA P-8164), 2% σουκρόζη (πηγή άνθρακα), KOH 1N (για ρύθμιση του pH στο 5.7), 0.3% rhytagel (SIGMA M8250-100G- για στερεοποίηση υποστρώματος αν δεν βάλουμε αντιβιοτικό) ή 0,6% αγαρόζη (για στερεοποίηση υποστρώματος αν βάλουμε αντιβιοτικό).

### 2.13.2 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**



Δείκτης μοριακών βαρών GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

### 2.13.3 Διαλύματα μετασηματισμού 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°C
- ◆ **Kanamycin**  
50mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C
- ◆ **Gentamicin sulphate**  
25mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -200C
- ◆ **Rifampicin**

25mg/ml σε μεθανόλη. Φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 2.13.4 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
- ◆ 2x ligation buffer  
30mM Tris-HCl pH7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG
- ◆ 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  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- ◆ NEBuffer 1  
10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, pH7.0 at 25<sup>o</sup>C
- ◆ NEBuffer2.  
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 στους 25<sup>o</sup>C.
- ◆ NEBuffer 3  
100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, pH7.9 at 25<sup>o</sup>C.

#### 2.13.5 Διαλύματα αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

- ◆ dNTPs  
10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM TTP, dH<sub>2</sub>O
- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (Taq Fermendas)  
200mM Tris-HCl, 500mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>
- ◆ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (Phusion HF finnzymes).  
7,5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### 2.13.6 Διάλυμα αεροδιήθησης (Infiltration media)

10mM MES  
10mM MgCl<sub>2</sub>  
150μM acetosyringone  
pH 5.7

#### 2.13.7 Διαλύματα στερέωσης και χρώσης ιστών.

- ◆ Διάλυμα ξεπλύματος RS (Riense Solution)  
50mM Na(P)O<sub>4</sub> pH 7.2, 0.5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>
- ◆ Διάλυμα χρώσης GSS (Gus Staining Solution)
- ◆ 50mM Na(P)O<sub>4</sub> pH 7.2, 0.5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM X-GluC (MW 520.3).
- ◆ Διάλυμα FAA (Fixated Mix)
- ◆ 50% αιθανόλη, 5% οξικό οξύ, 3.7% φορμαλδεΐδη, 41.3% ddH<sub>2</sub>O

# **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις

#### 3.1.1 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in planta*

Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, χωρίζονται σε δύο κυρίως μέρη. Το πρώτο μέρος αφορά στην μελέτη των ενδεχόμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των HSP90 και πρωτεϊνών που έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στην άνθηση.

Οι πρωτεΐνες HSP90 είναι ένα υψηλά συντηρημένο σύστημα μοριακών συνοδών, το οποίο διευκολύνει την ωρίμανση ενός καθορισμένου συνόλου πρωτεϊνών που καταλαμβάνουν κεντρικές θέσεις σε πολλά βιολογικά δίκτυα (Pearl and Prodromou, 2006; Richter and Buchner, 2006). Ως εκ τούτου, οι HSP90 αποτελούν μόρια-κλειδιά για την ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών ουσιαστικών για την επιβίωση ενός οργανισμού.

Οι HSP90 είναι από τις πιο συντηρημένες HSPs. Ομόλογα γονίδια *HSP90* συναντώνται από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο, ενώ οι πρωτεΐνες HSP90 αποτελούν το 1-2% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ενός κυττάρου σε φυσιολογικές συνθήκες, με το ποσοστό να ανεβαίνει σε συνθήκες στρες (Krukenberg et al. 2011; Welch and Feramisco, 1982). Η γνώση σχετικά με τους πελάτες των HSP90 έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, χάρη κυρίως σε μελέτες στην ζύμη, στην οποία 1.232 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν φυσικά ή γενετικά με τις HSP90 (Breitkreutz et al., 2008). Με άλλα λόγια, ~20% των πρωτεϊνών της ζύμης επηρεάζονται από την λειτουργία των HSP90, καθιστώντας τις ως το σύστημα με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις στο γονιδίωμα της ζύμης.

Προγενέστερες μελέτες, τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε μοριακό επίπεδο, καταδεικνύουν πως οι HSP90 ενδεχομένως κατέχουν έναν ρόλο ζωτικής σημασίας για την άνθηση του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Συνδυαστικά, τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν την σπουδαιότητα της μελέτης της ύπαρξης ή μη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην διαδικασία της άνθησης.

Για την διερεύνηση των παραπάνω αλληλεπιδράσεων, επιλέχθηκε το σύστημα Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC) ή αλλιώς Split-GFP. Η BiFC είναι μια τεχνική που βασίζεται στον φθορισμό και επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε ζωντανά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η διαδικασία BiFC στηρίζεται στην δομική συμπλήρωση μεταξύ των δύο μη φθορίζοντων N- και C-τελικών τμημάτων μίας φθορίζουσας πρωτεΐνης π.χ, της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Τα δύο αυτά τμήματα μπορούν να συντηχθούν με επιθυμητές πρωτεΐνες που μπορεί να αλληλεπιδρούν. Εάν οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, τα μη φθορίζοντα τμήματα έρχονται σε στενή γειτνίαση με αποτέλεσμα την ανασύσταση της ακέραιης φθορίζουσας πρωτεΐνης που μπορεί να απεικονιστεί χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού. Αν οι πρωτεΐνες που είναι συντηγμένες με τα διαχωρισμένα τμήματα της φθορίζουσας πρωτεΐνης δεν αλληλεπιδρούν, δεν λαμβάνει χώρα η ανασύσταση της και δεν ανιχνεύεται φθορισμός. Το πιο βασικό πλεονέκτημα της BiFC είναι ότι η πρωτεϊνική αλληλεπίδραση συμβαίνει στο πραγματικό υποκυτταρικό διαμέρισμα των εξεταζόμενων πρωτεϊνών.

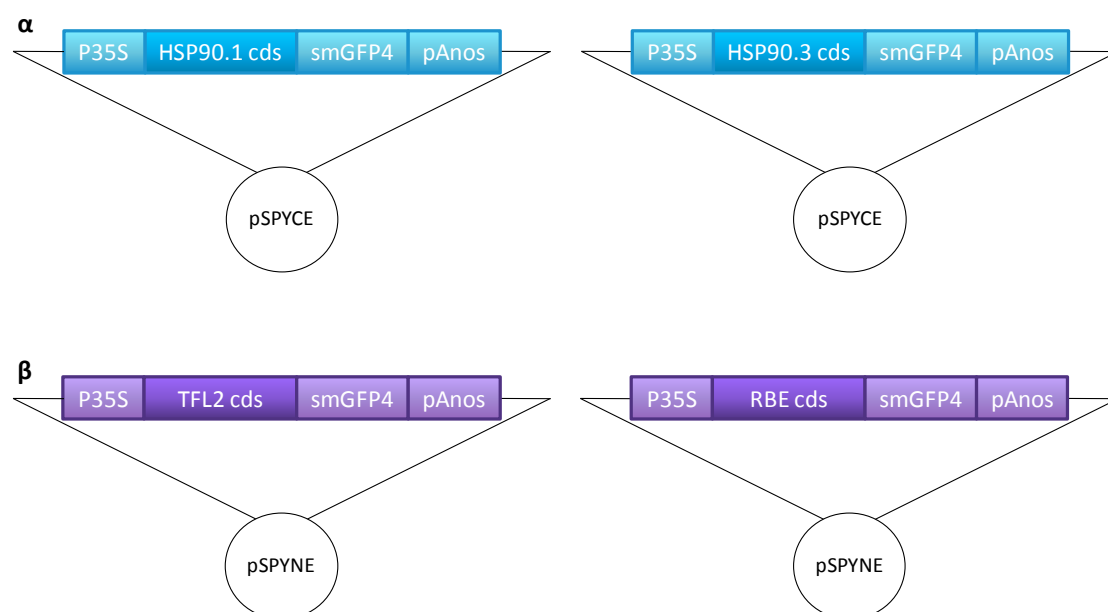
Πιο συγκεκριμένα, στην προκείμενη μελέτη οι αλληλεπιδράσεις ελέγχθηκαν *in planta* με πειράματα παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού. Το σύστημα περιείχε δύο πλασμιδιακούς φορείς, τον pSPYNE και τον pSPYCE όπου σε κάθε έναν ήταν κλωνοποιημένη η αμινο-υπομονάδα και η καρβόξυ-υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες των οποίων επιθυμείται ο έλεγχος της αλληλεπίδρασής τους κλωνοποιήθηκαν στους φορείς στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την αντίστοιχη υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης. Στη συνέχεια μετασχηματίστηκαν κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* με την κάθε κατασκευή ξεχωριστά. Οι δυο καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων αναμείχθηκαν σε ίσες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ένεση στην υποδερμίδα φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana* προκαλώντας παροδικό μετασχηματισμό στα κύτταρα του καπνού. Μετά το πέρας 65-72 ωρών ήταν δυνατή η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μέσω της ανίχνευσης της ακτινοβολίας που παράγεται με μικροσκόπιο φθορισμού. Προκειμένου

όμως να μπορέσει να λειτουργήσει το σύστημα, απαιτείται η χρήση της πρωτεΐνης p19. Στον παροδικό μετασχηματισμό, οι εισερχόμενοι πλασμιδιακοί φορείς ανιχνεύονται ως εξωγενείς από τα κύτταρα με συνέπεια την επαγωγή του μηχανισμού της RNAi αποσιώπησης για την αντιμετώπιση της προσβολής. Η πρωτεΐνη p19 λειτουργεί ως καταστολέας της αποσιώπησης επιτρέποντας την έκφραση των πλασμιδιακών φορέων.

### 3.1.1.α Κατασκευές για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυτταροπλασματικών HSP90 με πρωτεΐνες άνθησης, με το σύστημα SPLIT-GFP

Οι αλληλεπιδράσεις που εξετάστηκαν ήταν μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 (κυτταροπλασματικά μέλη της HSP90 υπεροικογένειας) και των πρωτεϊνών TFL2 και RBE (πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην διαδικασία της άνθησης). Κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων HSP90 κυτταροπλασματικών μελών αποτέλεσε το πρότυπο έκφρασής τους. Συγκεκριμένα το *HSP90.1* γονίδιο αποτελεί το καθαρά θερμοεπαγόμενο μέλος της οικογένειας, ενώ το γονίδιο *HSP90.3* παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης από τα τρία μέλη της οικογένειας που ανιχνεύονται ομαδοποιημένα στο χρωμόσωμα 5 του *Arabidopsis*.

Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις ελέγχθηκαν *in planta* με πειράματα παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν γονιδιακές κατασκευές οι οποίες προϋπήρχαν στο εργαστήριο: Οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 ήταν κλωνοποιημένες στον φορέα pSPYCE ενώ οι πρωτεΐνες TFL2 και RBE ήταν κλωνοποιημένες στον πλασμιδιακό φορέα pSPYNE (εικόνες 3.1α και 3.1β αντίστοιχα).



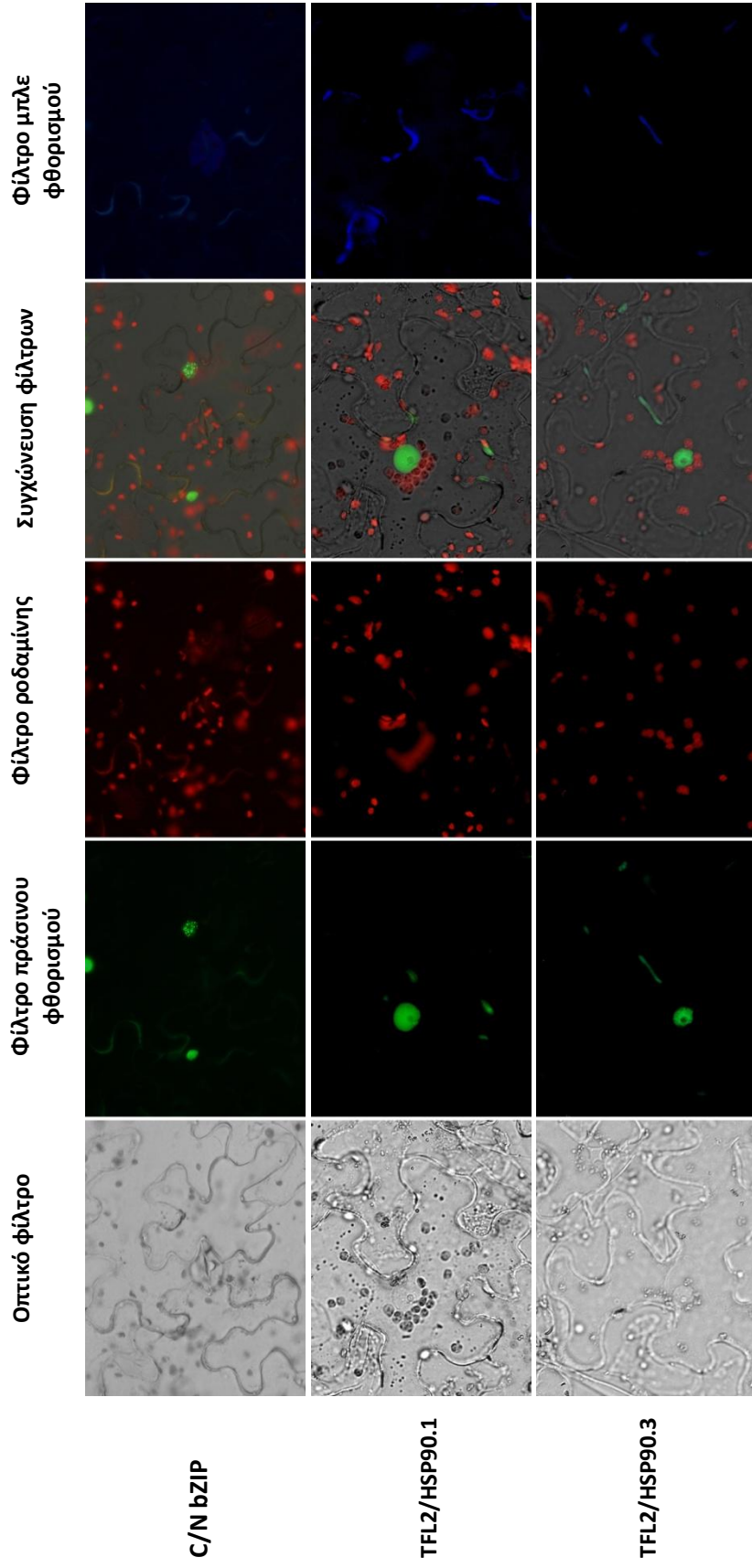
**Εικόνα 3.4: Σχηματική παρουσίαση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού των πρωτεϊνών HSP90.1, HSP90.3, TFL2 και RBE.** Κατασκευές παροδικού μετασχηματισμού για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών TFL2 και RBE με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 με το σύστημα SPLIT-GFP. (α) Οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSPYCE και (β) οι TFL2 και RBE κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSPYNE σε μεταφραστική σύντηξη με την καρβόξυ-τελική και με την αμινο-τελική υπομονάδα αντίστοιχα της GFP πρωτεΐνης που περιέχει ο φορέας. Οι κασέτες έκφρασης καθοδηγούνται από τον καθολικό προαγωγέα 35S.



### 3.1.1.β Έλεγχος αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 με τις πρωτεΐνες TFL2 και RBE

Για τον παροδικό μετασηματισμό χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana benthamiana*), τα οποία όταν έφτασαν σε αναπτυξιακό στάδιο όπου είχαν εκπτύξει 4-6 ζευγάρια πραγματικών φύλλων, μετασηματίστηκαν με τους εξής συνδυασμούς πλασμιδίων: α) rSPYNE:NbZIP/rSPYCE:CbZIP/p19, β) rSPYNE/rSPYCE:HSP90.1, γ) rSPYNE/rSPYCE:HSP90.3, δ) rSPYNE:TFL2/rSPYCE:HSP90.1/p19, ε) rSPYNE:TFL2/rSPYCE:HSP90.3/p19, στ) rSPYNE:RBE/rSPYCE:HSP90.1/p19, ζ) rSPYNE:RBE/rSPYCE:HSP90.3/p19. Εκτός από τους συνδυασμούς των πλασμιδιακών φορέων για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων, πραγματοποιήθηκε ακόμη ένας μετασηματισμός για το θετικό έλεγχο της διαδικασίας. Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε η πυρηνική πρωτεΐνη bZIP, η οποία έχει χωριστεί σε δυο υπομονάδες που έχουν κλωνοποιηθεί σε κάθε πλασμιδιακό φορέα. Η αλληλεπίδραση οδηγεί σε λειτουργική πρωτεΐνη που τοποθετείται στον πυρήνα και το σήμα ανιχνεύεται ως φθορισμός στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού. Για τον αρνητικό έλεγχο των αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί του άδειου πλασμιδιακού φορέα rSPYNE με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς rSPYCE:HSP90.1 και rSPYCE:HSP90.3.

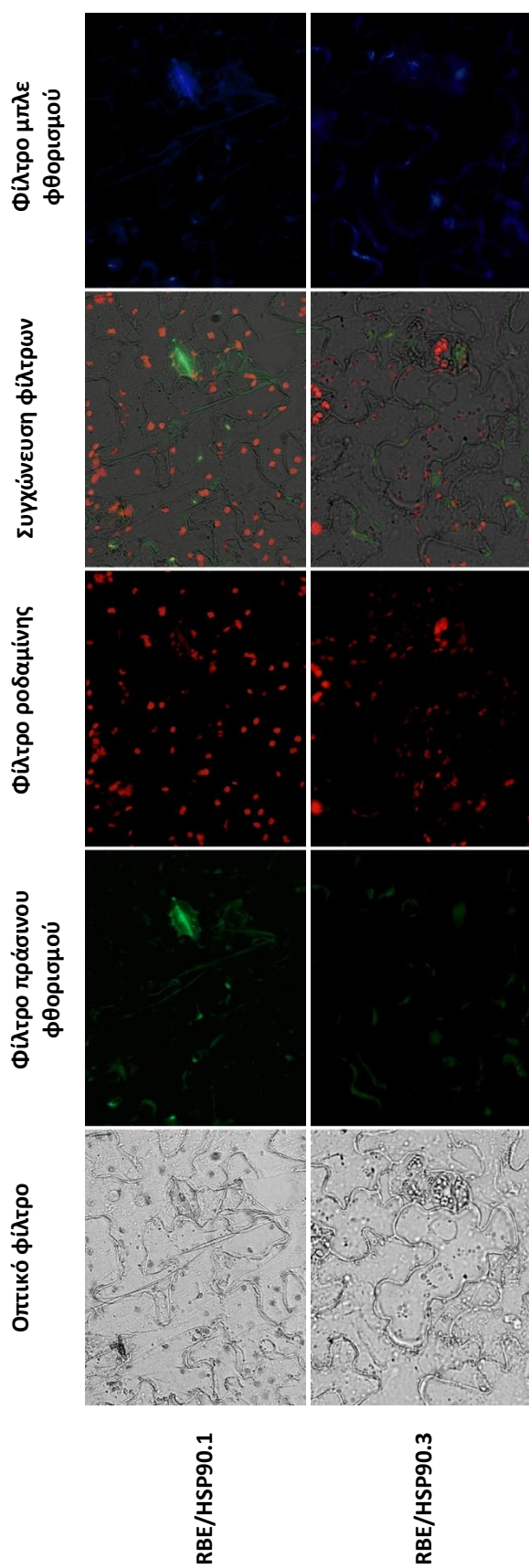
Οι παρατηρήσεις στην υποδερμίδα των φύλλων έλαβε χώρα μετά το πέρας 65 ωρών από τον εμβολιασμό των φύλλων καπνού σε μικροσκόπιο φθορισμού. Προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων, η διαδικασία του μετασηματισμού των φυτών και της παρατήρησης των αλληλεπιδράσεων διενεργήθηκε δύο φορές. Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων παρουσιάζονται στις εικόνες 3.2 και 3.3. Σημειώνεται, ότι επιπλέον φωτογραφίες όλων των αλληλεπιδράσεων παρατίθενται στο Παράρτημα.



**Εικόνα 3,2: Έλεγχος *in planta* των αλληλεπιδράσεων C/N bZIP, TFL2/HSP90.1 και TFL2/HSP90.3.** Υποδερμίδες φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασηματισμός με τους συνδυασμούς rSPYNE:NbZIP/rSPYCE:CbZIP/p19, rSPYNE:TFL2/rSPYCE:HSP90.1/p19 και rSPYNE:TFL2/rSPYCE:HSP90.3/p19. Απεικονίζονται πυρήνες οι οποίοι εκπέμπουν φθορισμό λόγω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης TFL2 με τις κυτταροπλασματικές HSP90, όπως συμβαίνει και μεταξύ των υπομονάδων της πρωτεΐνης bZIP η οποία λειτουργεί ως θετικός έλεγχος των αλληλεπιδράσεων. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης ελήφθησαν φωτογραφίες από διαφορετικά φίλτρα μικροσκοπίου. Χρησιμοποιήθηκαν με την σειρά: το οπτικό φίλτρο για την λήψη στο ορατό μήκος κύματος, το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση του φθορισμού της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, συγχώνευση των τριών αυτών φίλτρων (οπτικού, πράσινου και ροδαμίνης), το φίλτρο μπλε φθορισμού για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης.

Η αλληλεπίδραση θετικού ελέγχου, με τις υπομονάδες της πρωτεΐνης bZIP, λειτούργησε όπως ήταν αναμενόμενο καθώς το αποτέλεσμα της ήταν η ανίχνευση φθορισμού στους πυρήνες των μετασχηματισμένων κυττάρων του καπνού (Εικόνα 3.2).

Η παρατήρηση των φύλλων του παροδικού μετασχηματισμού τόσο με το συνδυασμό pSPYNE:TFL2/pSPYCE:HSP90.1 όσο και με τον συνδυασμό pSPYNE:TFL2/pSPYCE:HSP90.3, υπέδειξε την παρουσία σήματος φθορισμού στον πυρήνα των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 3.2), γεγονός που αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της TFL2 και των HSP90.1/HSP90.3. Είναι γνωστό ότι η TFL2 είναι πρωτεΐνη που εντοπίζεται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων και καταστέλλει την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων μεταξύ των οποίων και γονίδια που εμπλέκονται στην άνθηση όπως τα FT, FLC, AG και AP3 αφού φαίνεται να ενεργεί όμοια με τις πρωτεΐνες PRC1 της ομάδας Polycomb (PcG) (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007). Παράλληλα, τόσο στους ζωικούς οργανισμούς (Meng et al., 1996; Burch and Weller, 2005) όσο και στους φυτικούς οργανισμούς (Samakoni et al., 2014) έχει βρεθεί ότι η HSP90 εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να εκδηλώσει τη δράση της.



**Εικόνα 3,3: Έλεγχος *in planta* των αλληλεπιδράσεων RBE/HSP90.1 και RBE/HSP90.3.** Υποδερμίδες φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τους συνδυασμούς pSPYNE:RBE/pSPYCE:HSP90.1/p19 και pSPYNE:RBE/pSPYCE:HSP90.3/p19. Απεικονίζονται πυρήνες οι οποίοι δεν εκπέμπουν φθορισμό καθώς φαίνεται πως η πρωτεΐνη RBE δεν αλληλεπιδρά με τις κυτταροπλασματικές HSP90 και ως εκ τούτου, ανιχνεύεται μόνο αυτοφθορισμός. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης ελήφθησαν φωτογραφίες από διαφορετικά φίλτρα μικροσκοπίου. Χρησιμοποιήθηκαν με την σειρά: το οπτικό φίλτρο για την λήψη στο ορατό μήκος κύματος, το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση του φθορισμού της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, συγχώνευση των τριών αυτών φίλτρων (οπτικού, πράσινου και ροδαμίνης), το φίλτρο μπλε φθορισμού για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης

Κατά την παρατήρηση των φύλλων που μετασηματίστηκαν με τους συνδυασμούς pSPYNE:RBE/pSPYCE:HSP90.1 και pSPYNE:RBE/pSPYCE:HSP90.3, όπως και εκείνων του αρνητικού ελέγχου pSPYNE/pSPYCE:HSP90.1 και pSPYNE/pSPYCE:HSP90.3, δεν ανιχνεύτηκε φθορισμός στους πυρήνες των κυττάρων (Εικόνα 3.3). Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε μόνο αυτοφθορισμός προερχόμενος από τους χλωροπλάστες των κυττάρων. Ως εκ τούτου, η πρωτεΐνη RBE φαίνεται να μην αλληλεπιδρά ούτε με την πρωτεΐνη HSP90.1 αλλά ούτε και με την HSP90.3. Έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη RBE εντοπίζεται στον πυρήνα και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των πετάλων του άνθους όπως και των σεπάλων (Krizek et al., 2006).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, οι παρατηρήσεις των μετασηματισμένων φύλλων καπνού έδειξαν πως η πρωτεΐνη TFL2 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 στον πυρήνα των κυττάρων ενώ η πρωτεΐνης RBE φαίνεται να μην αλληλεπιδρά με καμία από τις δύο μοριακές συνοδούς. Αναλυτικότερα, εντοπίστηκε φθορισμός σε ποσοστό 14,75% εκ των παρατηρηθέντων πυρήνων της αλληλεπίδρασης TFL2/HSP90.1 και 16,67% στην αλληλεπίδραση TFL2/HSP90.3. Το αντίστοιχο ποσοστό της αλληλεπίδρασης του θετικού ελέγχου bZIP ήταν 26,67%. Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί πως ο αριθμός των μετασηματισμένων φύλλων καπνού που εξετάστηκαν ήταν μεγαλύτερος στις περιπτώσεις των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης RBE συγκριτικά με τις περιπτώσεις των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης TFL2. Με τον μεγάλο αριθμό παρατηρηθέντων φύλλων επιδιώχθηκε η κατά το δυνατόν καλύτερη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων καθώς στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης RBE δεν εντοπιζόταν σήμα φθορισμού.

### **3.1.2 Κλωνοποιήσεις του γονιδίου *TFL2***

#### **3.1.2.α Κλωνοποίηση του γονιδίου *TFL2* στον φορέα pGBKT7**

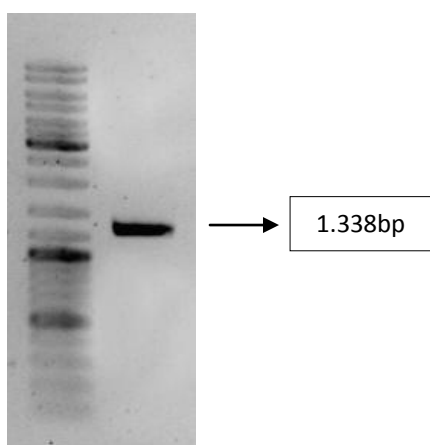
Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης *in planta*, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη TFL2 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3. Τα δεδομένα αυτά έρχονται να προστεθούν στα πολυάριθμα άλλα πειραματικά αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί στο συγκεκριμένο εργαστήριο και τα οποία καταδεικνύουν την σημαντική εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στη άνθηση του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Εντούτοις, μία ακόμα πιο ισχυρή απόδειξη για τη δυναμική της αλληλεπίδρασης θα αποτελούσε η επιβεβαίωσή της σε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης *in vivo*. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

Στο σύστημα δυο υβριδίων χρησιμοποιούνται δύο πλασμιδιακοί φορείς. Ο ένας φορέας φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή της μεταγραφής και ο δεύτερος την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς με βάση το οποίο θα ελεγχτεί η αλληλεπίδραση. Σε κάθε φορέα κλωνοποιείται μια από τις δύο πρωτεΐνες που επιθυμείται να ελεγχθεί η αλληλεπίδρασή τους. Ένα τέτοιο ζεύγος πλασμιδιακών φορέων, αποτελούν οι πλασμιδιακοί φορείς της Clontech pGBKT7, που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, και ο pGADT7, που φέρει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Στο εργαστήριο υπάρχουν ήδη οι κατασκευές που περιέχουν κλωνοποιημένα τα γονίδια *HSP90.1* και *HSP90.3* στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7. Επομένως, για να ελεγχθούν οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις με το σύστημα δυο υβριδίων, θα πρέπει η κωδική περιοχή της πρωτεΐνης TFL2 να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7, σε μεταφραστική σύντηξη με την ρυθμιστική περιοχή του πλασμιδιακού φορέα.

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου *TFL2* στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7 με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικό πείραμα με το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* για την επαλήθευση των *in planta* αλληλεπιδράσεων του πρωτεϊνικού προϊόντος του με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3. Για τον σκοπό αυτό, κρίθηκε σκόπιμο το γονίδιο *TFL2* να κλωνοποιηθεί αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy της Promega, ο οποίος είναι ένας γραμμικός φορέας

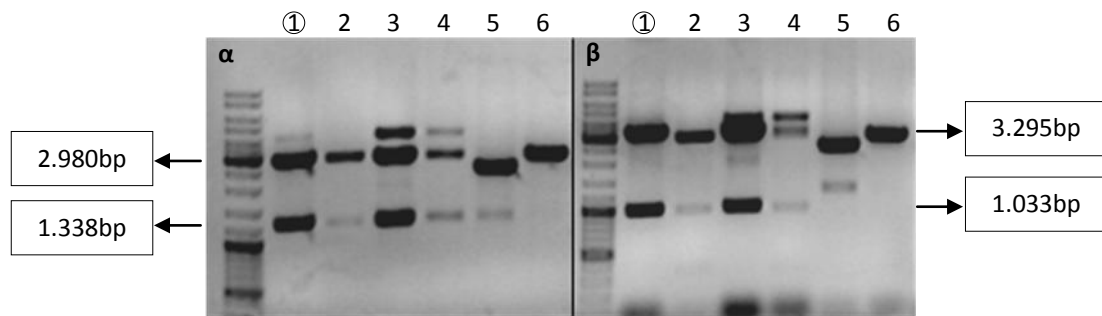
που φέρει προεξέχοντα μόρια θυμίνης στα 3' άκρα του. Τα T-προεξέχοντα άκρα στη θέση εισαγωγής βελτιώνουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της ενοποίησης με προϊόντα PCR εμποδίζοντας την επανακυκλοποίηση του φορέα και παρέχοντας συμβατά προεξέχοντα άκρα για τα προϊόντα PCR με A-προεξέχοντα άκρα.

Προκειμένου να κλωνοποιηθεί το γονίδιο *TFL2* στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy χρειάστηκε αρχικά να ενισχυθεί το γονίδιο με αντίδραση PCR. Η αντίδραση PCR εκτελέστηκε με την χρήση εκκινητών σχεδιασμένων να ενισχύουν ολόκληρη την κωδική αλληλουχία (full length cds) του γονιδίου *TFL2* και να του προσδίδουν άκρα με θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού NdeI/PstI (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). Αφού το προϊόν της αντίδρασης PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 3.4), ακολούθησε απομόνωση της επιθυμητής ζώνης από την πηκτή αγαρόζης και καθαρισμός της με την χρήση του Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel). Καθότι στόχος ήταν η μετέπειτα εισαγωγή του γονιδίου *TFL2* στη θέση εισαγωγής με τα T-προεξέχοντα άκρα του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy, το επόμενο βήμα ήταν η διαδικασία A-tailing. Στόχος της διαδικασίας αυτής ήταν η δημιουργία προεξέχοντων μορίων αδενίνης στα 3' άκρα του γονιδίου καθώς η Pfu DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση PCR παράγει τμήματα με τυφλά άκρα. Με τον τρόπο αυτό κατέστη στην συνέχεια δυνατή η ενοποίηση του γονιδίου *TFL2* στη θέση εισαγωγής με τα T-προεξέχοντα άκρα του pGEM-T Easy με την χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Εν συνεχεία, ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής αμπικιλίνη καθώς και των X-Gal/IPTG για την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων κυττάρων.



**Εικόνα 3.4:** Προϊόν της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του cds του γονιδίου *TFL2*. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% του προϊόντος της PCR αντίδρασης σε *TFL2* DNA. με τους εκκινητές *TFL2*-NdeI F/*TFL2*-PstI R. Το μέγεθος του γονιδίου *TFL2* είναι 1.338bp.

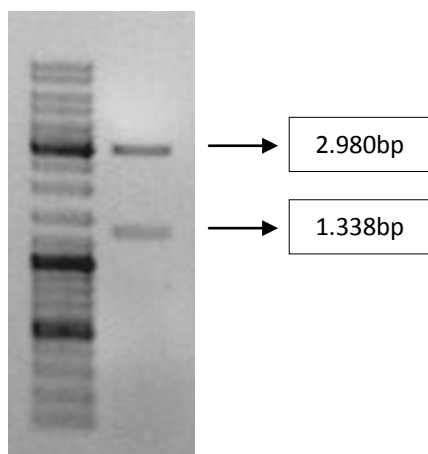
Ο παραπάνω μετασχηματισμός έδωσε πολυάριθμες άσπρες και μπλε αποικίες από τις οποίες επιλέχτηκαν 6 άσπρες αποικίες ώστε να ελεγχθούν για την παρουσία του ενθέτου μετά από πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Έτσι, στο κάθε δείγμα DNA που απομονώθηκε, πραγματοποιήθηκαν δύο διπλές πέψεις επιβεβαίωσης. Η μία πέψη έγινε με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και PstI τα οποία θα έπρεπε να δώσουν αναμενόμενα προϊόντα στις 2.980bp και 1.338bp. Η δεύτερη διπλή πέψη έγινε με τα ένζυμα περιορισμού HndIII και PstI τα οποία θα έπρεπε να δώσουν αναμενόμενα προϊόντα στις 3.295bp και 1.033bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.5).



**Εικόνα 3.5:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των προϊόντων των αντιδράσεων πέψεων επιβεβαίωσης με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ανίχνευση της ένθεσης του γονιδίου *TFL2* στο φορέα *pGEM-T Easy*. (α) Διπλές πέψεις με ένζυμα *NdeI/PstI* και (β) με ένζυμα *HndIII/PstI*. Οι αποικίες 1 και 2 περιέχουν το ένθετο καθώς έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα ενώ πιθανότατα να υπάρχει παρουσία του ενθέτου και στις αποικίες 3 και 4 και η πέψεις να μην είναι πλήρεις. Η αποικία 1 επιλέχθηκε για περαιτέρω χειρισμούς.

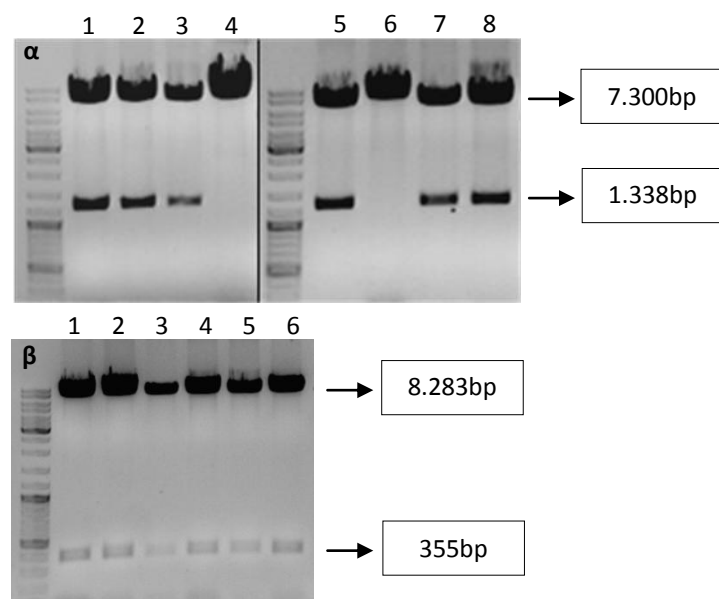
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5, το γονίδιο *TFL2* έχει κλωνοποιηθεί στο πλασμιδίο των αποικιών 1 και 2 καθώς τα δύο αυτά δείγματα έδωσαν τις ζώνες με τα αναμενόμενα μεγέθη. Επιπλέον, είναι πολύ πιθανό να υπάρχει παρουσία του ενθέτου και στις αποικίες 3 και 4 και η επιπλέον ζώνη που εμφανίζεται στην πηκτή αγαρόζης να είναι άκοπο πλασμιδιακό DNA το οποίο μπορεί να οφείλεται σε πιθανή χρήση μεγάλης ποσότητας DNA στις πέψεις.

Στην συνέχεια για να ξεκινήσει η διαδικασία της κλωνοποίησης του γονιδίου *TFL2* στον πλασμιδιακό φορέα *pGBKT7* επιλέχθηκε η αποικία 1. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διπλές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *NdeI* και *PstI* του DNA της αποικία 1 και του φορέα *pGBKT7*, ώστε να απομονωθεί το επιθυμητό γονίδιο από τον φορέα *pGEM-T Easy* και να έχει ίδια άκρα με τον φορέα *pGBKT7* προκειμένου να είναι εφικτή η ενοποίησή τους. Η πέψη του *pGEM-T-Easy/TFL2* αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης και έδωσε δύο ζώνες στις 2.980bp και 1.338bp (Εικόνα 3.6). Ακολούθησε απομόνωσή της επιθυμητής ζώνης των 1.338bp που είναι το *TFL2* από την πηκτή αγαρόζης όπως και της ζώνης του φορέα *pGBKT7* και καθαρισμός τους με την χρήση του *Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit* (*Macherey Nagel*). Εν συνεχεία έλαβε χώρα η αντίδραση ενοποίησης του γονιδίου *TFL2* με τον φορέα *pGBKT7*, με την χρήση του ενζύμου *T4 DNA* λιγάση. Έπειτα, ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* *DH5a* και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο *LB* παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής *καναμικίνη*.



**Εικόνα 3.6:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των προϊόντων της αντίδρασης διπλής πέψης με ένζυμα περιορισμού για την απομόνωση του γονιδίου *TFL2* από το φορέα *pGEM-T Easy*. Διπλή πέψη με ένζυμα περιορισμού *NdeI/PstI* για την απομόνωση του γονιδίου *TFL2* από το φορέα *pGEM-T Easy* και την δημιουργία ίδιων άκρων με τον φορέα *pGBKT7*, που έχει κοπεί με τα ίδια ένζυμα, προκειμένου να είναι εφικτή η μετέπειτα ενοποίησή τους.

Ο μετασηματισμός αυτός έδωσε μερικές αποικίες από τις οποίες επιλέχτηκαν 6 ώστε να ελεγχθούν για την παρουσία του ενθέτου με διπλές πέψεις επιβεβαίωσης με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Έτσι, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των αντίστοιχων βακτηριακών καλλιεργειών, με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης, και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο διπλές πέψεις επιβεβαίωσης στο κάθε δείγμα DNA. Η μία διπλή πέψη έγινε με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και PstI με αναμενόμενα προϊόντα στις 7.300bp και 1.338bp. Η δεύτερη διπλή πέψη έγινε με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και PstI με αναμενόμενα προϊόντα στις 8.283bp και 355bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζη και παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.

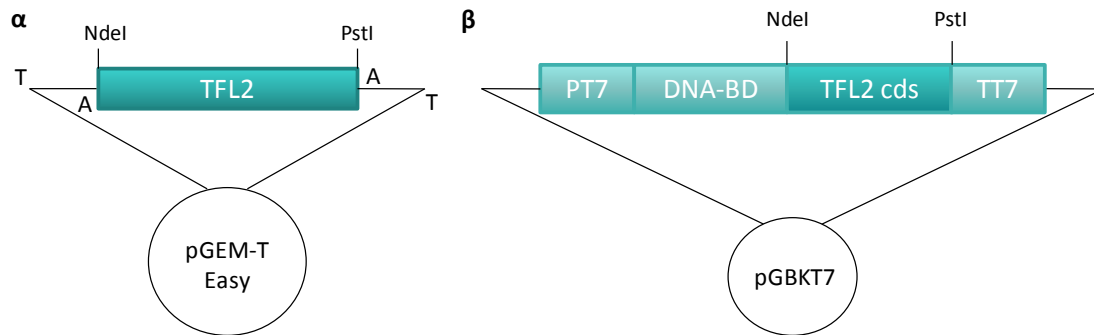


**Εικόνα 3.7:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των προϊόντων των αντιδράσεων πέψεων επιβεβαίωσης με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ανίχνευση της ένθεσης του γονιδίου *TFL2* στο φορέα *pGBKT7*. (α) Διπλές πέψεις με ένζυμα NdeI/PstI και (β) με ένζυμα BamHI/PstI (σε όσες αποικίες βγήκαν θετικές από τις πέψεις της α εικόνας). Οι αποικίες 1, 2, 3, 5, 7 και 8 περιέχουν το ένθετο καθώς έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα.

Όπως φαίνεται και την εικόνα της πηκτής αγαρόζης (Εικόνα 3.7), το γονίδιο *TFL2* έχει κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο των αποικιών 1, 2, 3, 5, 7 και 8 καθώς τα δείγματα αυτά έδωσαν τις ζώνες με τα αναμενόμενα μεγέθη. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται μία αχνή επιπλέον ζώνη στην πηκτή αγαρόζης, το οποίο είναι πολύ πιθανό να είναι άκοπο πλασμιδιακό DNA το οποίο οφείλεται σε χρήση μεγάλης ποσότητας DNA στις πέψεις.

Συνοψίζοντας, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου *TFL2* στον πλασμιδιακό φορέα *pGBKT7* με σκοπό να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά σε πείραμα με το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* προκειμένου να επαληθευτούν οι *in planta* αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης *TFL2* με τις πρωτεΐνες *HSP90.1* και *HSP90.3* (Εικόνα 3.8).



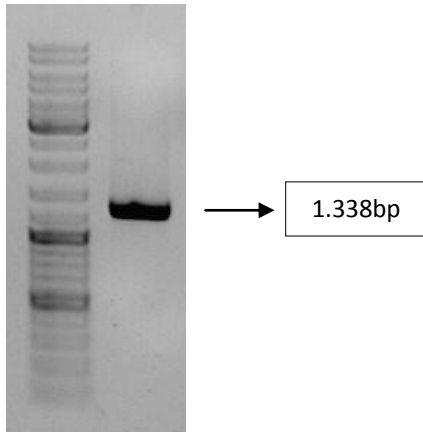


**Εικόνα 3.8:** Σχηματική παρουσίαση των κατασκευών διαδοχικών κλωνοποιήσεων του γονιδίου *TFL2* για μελλοντικό μετασχηματισμό ζύμης. (α) Το *TFL2* κλωνοποιήθηκε αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy στη θέση εισαγωγής μεταξύ των T-προεξέχοντων άκρων ώστε στην συνέχεια να κλωνοποιηθεί στο φορέα pGBKT7. (β) Η πρωτεΐνη *TFL2* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7 σε μεταφραστική σύντηξη με την υπομονάδα του ενεργοποιητή του γονιδίου αναφοράς. DNA-BD: υπομονάδα πρόσδεσης στο DNA, PT7: T7 εκκινήτης, TT7: αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής. Η κατασκευή του φορέα pGBKT7 με το ένθετο *TFL2* δημιουργήθηκε για μελλοντική χρήση του για μετασχηματισμό ζύμης προκειμένου να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *TFL2* με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι HSP90.1 και HSP90.3 μέσω του συστήματος δυο υβριδίων.

### 3.1.2.β Κλωνοποίηση του γονιδίου *TFL2* στον φορέα pGEM-T Easy

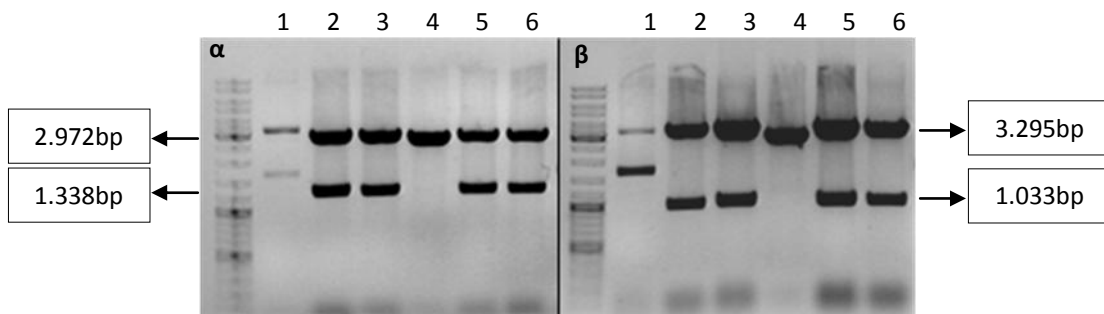
Πέρα από την κλωνοποίηση του γονιδίου *TFL2* στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου *TFL2* στον ίδιο φορέα με την διαφορά ότι το γονίδιο ενισχύθηκε με άλλους εκκινήτες που του προσδίδουν άκρα με θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού *SacI/PstI*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ακριβώς η ίδια με εκείνη της προηγούμενης ενότητας.

Αρχικά ενισχύθηκε το γονίδιο με αντίδραση PCR με την χρήση εκκινήτων σχεδιασμένων να ενισχύουν ολόκληρη την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *TFL2* και να του προσδίδουν άκρα με θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού *SacI/PstI* (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). Αφού το προϊόν της αντίδρασης PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 3.9), ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός της επιθυμητής ζώνης από την πηκτή αγαρόζης. Ακολούθησε η διαδικασία A-tailing του DNA που απομονώθηκε και κατέστη στην συνέχεια δυνατή η ενοποίηση του γονιδίου *TFL2* στη θέση εισαγωγής με τα T-προεξέχοντα άκρα του pGEM-T Easy με την χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Εν συνεχεία, ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής αμικικίνη καθώς και των X-Gal/IPTG για την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων κυττάρων.



**Εικόνα 3.9:** Προϊόν της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του *cds* του γονιδίου *TFL2*. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% του προϊόντος της PCR αντίδρασης σε *TFL2* DNA, με τους εκκινητές *TFL2*-*SacI* F/*TFL2*-*PstI* R. Το μέγεθος του γονιδίου *TFL2* είναι 1.338bp.

Ο παραπάνω μετασχηματισμός έδωσε πολυάριθμες άσπρες και μπλε αποικίες από τις οποίες επιλέχτηκαν 6 άσπρες αποικίες ώστε να ελεγχθούν για την παρουσία του ενθέτου με πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Έτσι, έπειτα από απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης, πραγματοποιήθηκαν δύο διπλές πέψεις επιβεβαίωσης στο κάθε δείγμα DNA. Η μία διπλή πέψη έγινε με τα ένζυμα περιορισμού *SacI* και *PstI* τα οποία θα έπρεπε να δώσουν αναμενόμενα προϊόντα στις 2.972bp και 1.338bp. Η δεύτερη διπλή πέψη έγινε με τα ένζυμα περιορισμού *HndIII* και *PstI* τα οποία θα έπρεπε να δώσουν αναμενόμενα προϊόντα στις 3.295bp και 1.033bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 3.10:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των προϊόντων των αντιδράσεων πέψεων επιβεβαίωσης με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ανίχνευση της ένθεσης του γονιδίου *TFL2* στο φορέα *pGEM-T Easy*. (α) Διπλές πέψεις με ένζυμα *SacI*/*PstI* και (β) με ένζυμα *HndIII*/*PstI*. Οι αποικίες 2, 3, 5 και 6 περιέχουν το ένθετο καθώς έδωσαν τα αναμενόμενα προϊόντα.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.10, το γονίδιο *TFL2* έχει κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο των αποικιών 2, 3, 5 και 6 καθώς τα δείγματα αυτά έδωσαν τις ζώνες με τα αναμενόμενα μεγέθη.

### 3.2 Ιστοχημική ανάλυση με την χρήση του συστήματος αναφοράς *GUS*

Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας έχει χρησιμοποιηθεί η προσέγγιση της στοχευμένης γονιδιακής αποσιώπησης με σκοπό την παραγωγή διαγονιδιακών σειρών *Arabidopsis* (RNAi σειρές). Οι σειρές αυτές χαρακτηρίζονται από εκλεκτική αποσιώπηση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών της *HSP90* οικογένειας υπό την καθοδήγηση του

ιστοειδικού Rac2/Rop7 προαγωγέα (Μεταπτυχιακή εργασία Μαργαριτοπούλου Θεώνη). Η χρήση της συγκεκριμένης κατασκευής αποσκοπούσε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των HSP90 σε συγκεκριμένους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια με στόχο την μελέτη του ρόλου του συστήματος στην εγκαθίδρυση και λειτουργία του AMB καθώς και στην ανάπτυξη του αγωγού ιστού.

Το γονίδιο *RAC* ανήκει στην RHO οικογένεια μικρών GTPασών. Οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες και ενεργοποιούνται από ενδογενή ή εξωγενή σιγάλα όταν προσδένεται GTP και απενεργοποιούνται κατά την υδρόλυση του GTP σε GDP (Bourne et al, 1991). Τα γονίδια της οικογένειας αυτής εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια σημαντικά για την επιβίωση του κυττάρου όπως η μεταγωγή σήματος επαγόμενη από στρες (Hall, 1998: Aspenstrom, 1999: Ridley, 2001). Το mRNA του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* υπάρχει σε μικρή ποσότητα παντού στο φυτό, σε όλους του ιστούς και όλα τα αναπτυξιακά στάδια, εμφανίζοντας κάποια μέγιστα σε ορισμένα από αυτά.

Το δεύτερο μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, αφορά στην ιστοχημική μελέτη της έκφρασης δύο γονιδίων, *WUS* και *CYCLINB1;1*, τα οποία θεωρήθηκαν πως μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση των παρατηρούμενων φαινοτύπων της αποσιωπημένης σειράς *RacRNAi 10H* του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

### **3.2.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου *WUSCHEL (WUS)* σε φυτάρια της αποσιωπημένης σειράς *RacRNAi 10H***

Τα αποτελέσματα του φαινοτυπικού χαρακτηρισμού της *RacRNAi 10H* σειράς υπέδειξαν πως η μείωση των επιπέδων έκφρασης των HSP90 μπορεί να επιφέρει σημαντική απόκλιση του φαινοτύπου από το φυσιολογικό. Χαρακτηριστικός είναι ο πλειοτροπικός φαινότυπος της συγκεκριμένης σειράς όπως και αυτός της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής (Μεταπτυχιακή εργασία Δημοπούλου Αναστασία). Τα φυτά με έλλειψη κυριαρχίας κορυφής δεν εκπτύσσουν κεντρικό βλαστό άλλα παράγουν πολυάριθμους πλάγιους βλαστούς.

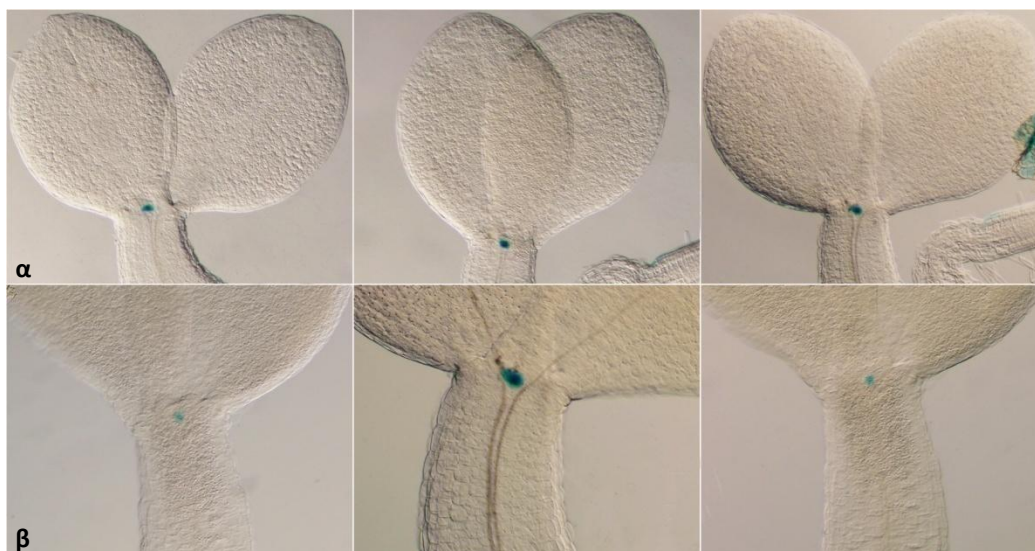
Καθώς λοιπόν, τα φυτά της *RacRNAi 10H* σειράς χαρακτηρίζονται από έλλειψη κυριαρχίας κορυφής, θεωρήθηκε πιθανή η μη σωστή λειτουργία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού (AMB). Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *WUSCHEL (WUS)*, το οποίο κατέχει κυρίαρχο ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση του AMB.

Το γονίδιο *WUS*, η έκφραση του οποίου παρατηρείται στο κέντρο οργάνωσης είναι υπεύθυνο για την διατήρηση των βλαστικών κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Τα βλαστικά κύτταρα από την άλλη εκφράζουν το γονίδιο *CLAVATA3 (CLV3)*, το οποίο ελέγχει την έκφραση του *WUS*, περιορίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο το μέγεθος του κέντρου οργάνωσης (Williams and Fletcher, 2005). Τα ολικής απώλειας λειτουργίας *wus* μεταλλάγματα αδυνατούν να δημιουργήσουν ένα λειτουργικό AMB, κάτι που υποδηλώνει την σημασία του γονιδίου *WUS* στην ανάπτυξη και διατήρηση του AMB (Laux et al., 1996).

Η έκφραση του γονιδίου *WUS* μελετήθηκε μέσω της προσέγγισης της ιστοχημικής ανάλυσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου, με την χρήση του συστήματος αναφοράς GUS. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* οικότυπου *Landsberg erecta (Ler)*, τα οποία περιέχουν κατάλληλη γονιδιακή κατασκευή. Η κατασκευή αυτή περιείχε τον προαγωγέα του γονιδίου *WUS* σε μεταφραστική σύντηξη με το γονίδιο αναφοράς *GUS*. Τα φυτά στα οποία διερευνήθηκε η έκφραση του γονιδίου *WUS* αποτελούσαν φυτά της F2 γενιάς η οποία προέκυψε από την διασταύρωση των φυτών-μαρτύρων *WUS::GUS* με φυτά της διαγονιδιακής σειράς *RacRNAi 10H*. Καθώς λοιπόν τα φυτά *WUS::GUS/RacRNAi (10H)* είναι προϊόν διασταύρωσης, παρατηρήθηκαν και φυτά που είχαν μεγαλώσει σε θρεπτικό μέσο MS απουσία αντιβιοτικών και φυτά που είχαν μεγαλώσει σε θρεπτικό μέσο MS παρουσία αντιβιοτικών (Hyg/Ppt). Αυτό κρίθηκε σκόπιμο προκειμένου να διαπιστωθεί το αν τα παρατηρούμενα φυτά ήταν

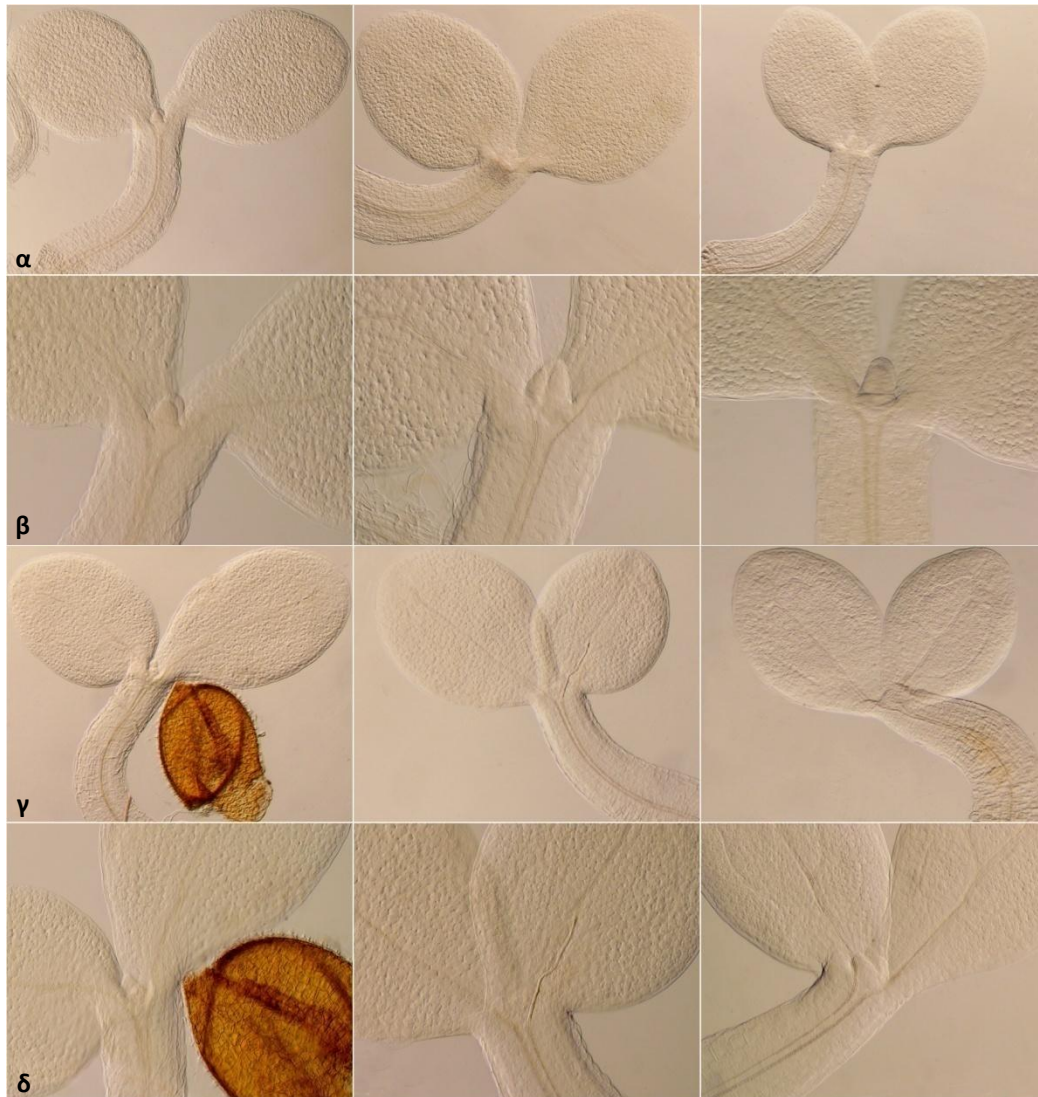
διαγονιδιακά ή όχι, ενώ τα φυτά που μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικών λειτούργησαν σαν ένας ακόμα μάρτυρας.

Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου σε νεαρά φυτάρια τριών και πέντε ημερών και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



**Εικόνα 3.11: Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής WUS::GUS σε φυτάρια αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana* τριών ημερών. (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε φυτάρια τριών ημερών. (β) Περιοχή γύρω από το AMB στο οποίο και παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής.**

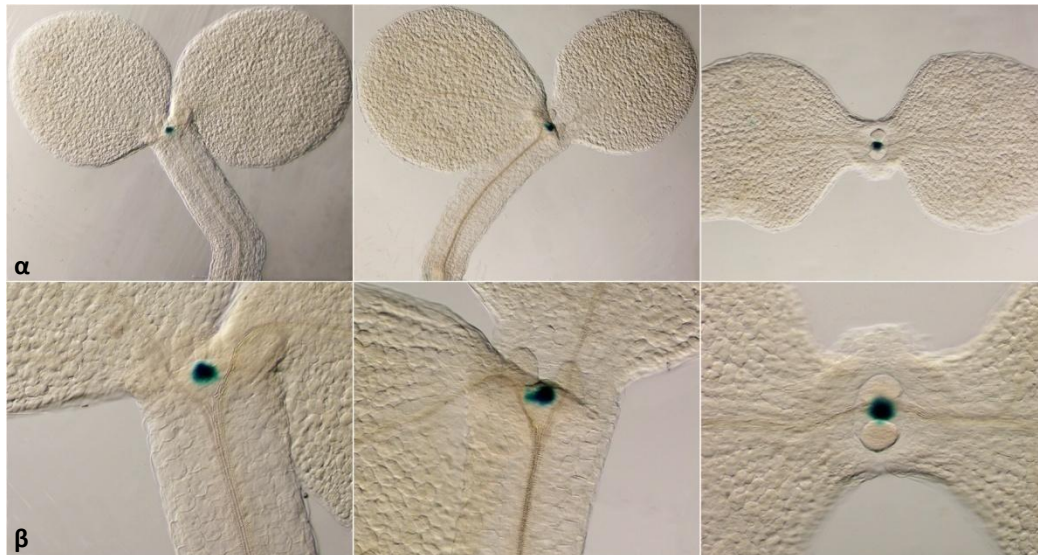
Σύμφωνα με την παρατήρηση των φυτών WUS::GUS των τριών ημερών, η έκφραση της *GUS* κατασκευής είναι αρκετά εντοπισμένη σε συγκεκριμένη περιοχή του AMB, όπως αναμενόταν. Αναλυτικότερα, φαίνεται πως ο *WUS* προαγωγέας οδηγεί την έκφραση του γονιδίου-μάρτυρα *GUS* στο κέντρο οργάνωσης του μεριστώματος, το οποίο σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αποτελεί την περιοχή έκφρασης του *WUS* σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Επομένως, η παρατήρηση του μάρτυρα έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα.



**Εικόνα 3.12:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής WUS::GUS σε φυτάρια της διαγονιδιακής σειράς RacRNAi 10H του φυτού *Arabidopsis thaliana* τριών ημερών. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου GUS υπό τον έλεγχο του προαγωγέα WUS σε φυτάρια τριών ημερών που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο (α) χωρίς αντιβιοτικά και (γ) με αντιβιοτικά. Περιοχή γύρω από το AMB στο οποίο θα έπρεπε να παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής, φυταρίων που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο (β) χωρίς αντιβιοτικά και (δ) με αντιβιοτικά.

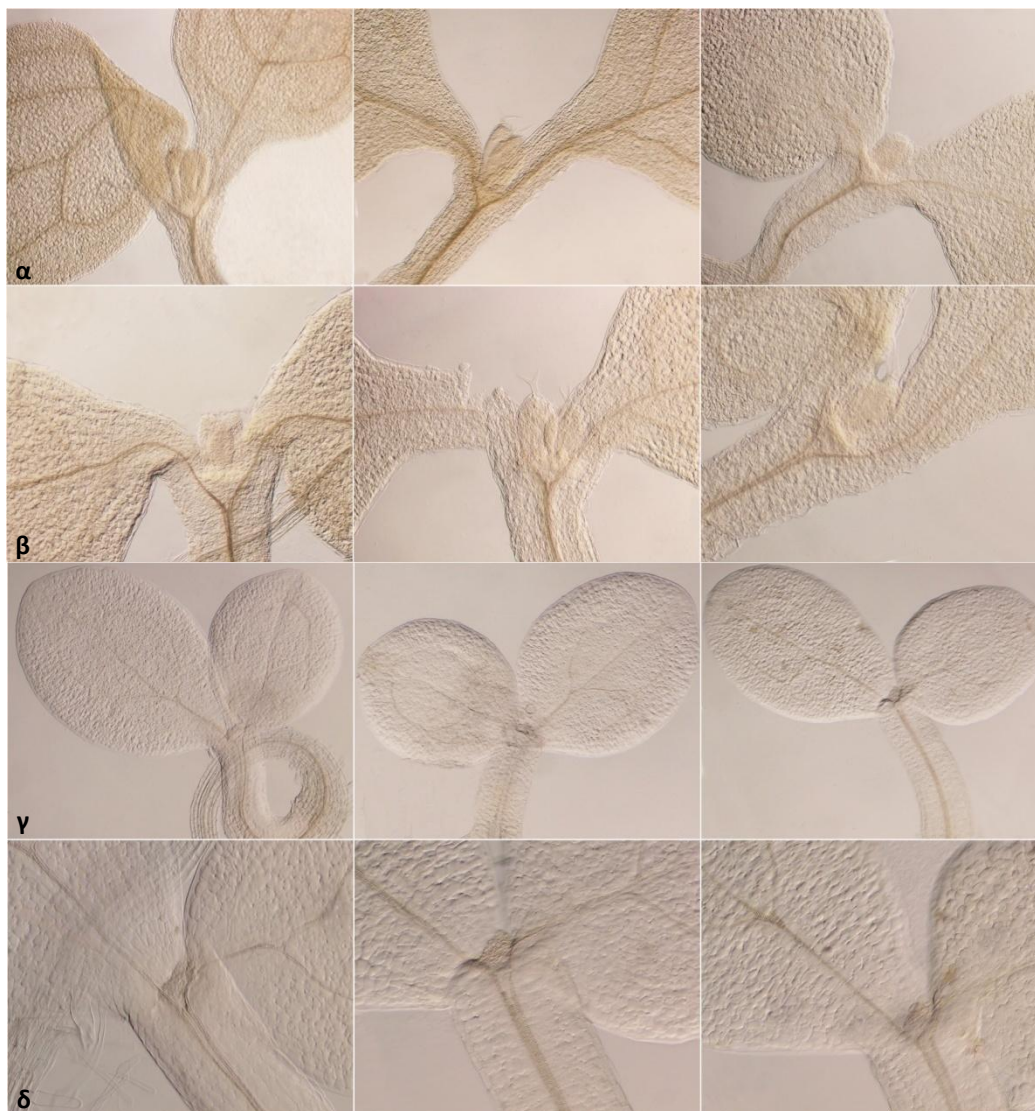
Τα αποτελέσματα της παρατήρησης των φυτών WUS::GUS/RacRNAi (10H) των τριών ημερών έδωσαν μία τελείως διαφορετική εικόνα συγκριτικά με τον μάρτυρα. Δεν ανιχνεύεται πουθενά μπλε χρώμα σε κανένα από τα δείγματα, γεγονός που υποδηλώνει πως στα φυτά με RacRNAi υπόβαθρο της σειράς 10H, το γονίδιο WUS φαίνεται να μην εκφράζεται καθώς ο προαγωγέας του δεν λειτουργεί και δεν εκφράζεται το γονίδιο GUS. Η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και στα φυτά που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικά και σε αυτά με αντιβιοτικά.





**Εικόνα 3.13: Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής WUS::GUS σε φυτάρια αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana* πέντε ημερών. (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε φυτάρια πέντε ημερών. (β) Περιοχή γύρω από το AMB στο οποίο και παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής.**

Η παρατήρηση των φυτών WUS::GUS των πέντε ημερών έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με εκείνα των φυτών των τριών ημερών. Και πάλι η έκφραση του γονιδίου *GUS* είναι περιορισμένη σε μία συγκεκριμένη περιοχή του μεριστώματος, υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS*. Η μόνη διαφορά είναι η ενδεχομένως ελάχιστη μεγαλύτερη περιοχή έκφρασης. Και πάλι λοιπόν, η παρατήρηση του μάρτυρα έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα.



**Εικόνα 3.14:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *WUS::GUS* σε φυτάρια της διαγονιδιακής σειράς *RacRNAi 10H* του φυτού *Arabidopsis thaliana* πέντε ημερών. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε φυτάρια πέντε ημερών που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο (α) χωρίς αντιβιοτικά και (γ) με αντιβιοτικά. Περιοχή γύρω από το AMB στο οποίο θα έπρεπε να παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής, φυταρίων που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο (β) χωρίς αντιβιοτικά και (δ) με αντιβιοτικά.

Όπως και στην περίπτωση του μάρτυρα, τα αποτελέσματα της παρατήρησης των φυτών *WUS::GUS/RacRNAi* (10H) των πέντε ημερών ήταν τα ίδια με εκείνα των φυτών των τριών ημερών. Στα φυτά που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικά όπως και σε αυτά με αντιβιοτικά δεν παρατηρήθηκε πουθενά και σε κανένα δείγμα έκφραση του γονιδίου *GUS*. Ως εκ τούτου, το γονίδιο *WUS* φαίνεται να συνεχίζει να μην εκφράζεται δύο μέρες μετά κατά την ανάπτυξη των φυταρίων.

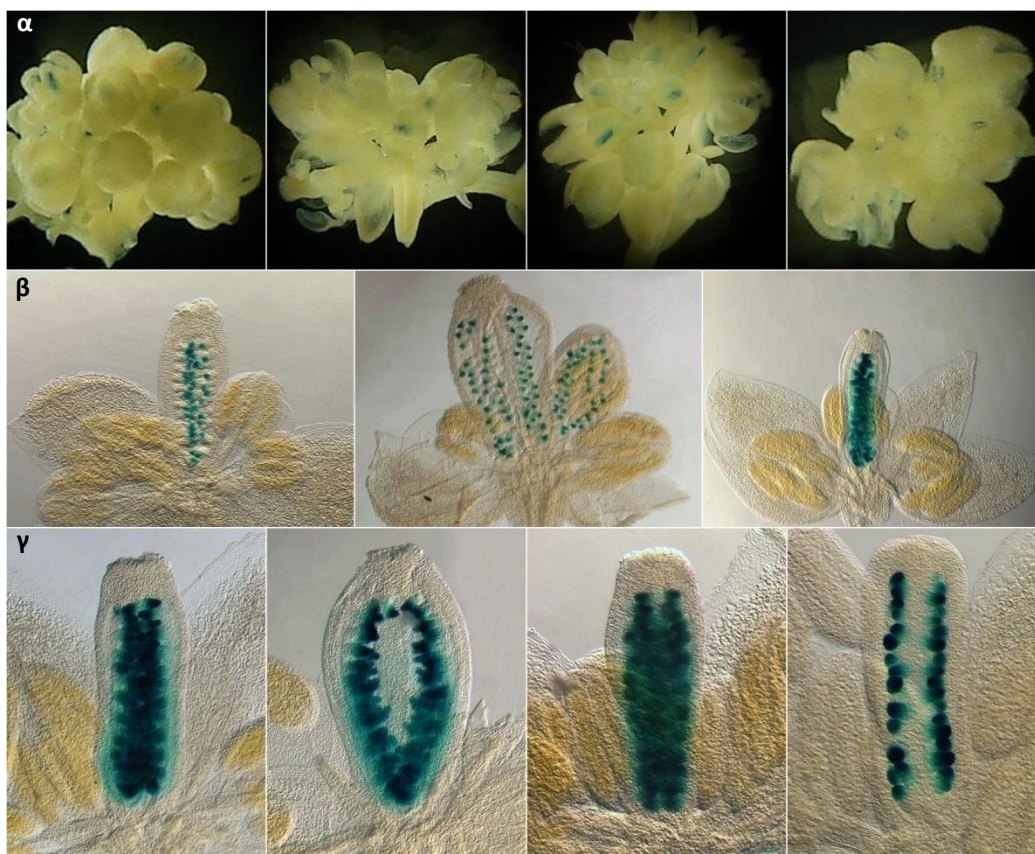
Συγκεντρωτικά τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν πως ενώ ο μάρτυρας έδωσε την εικόνα που αναμενόταν, τοποθετώντας την έκφραση του *GUS* στο κέντρο οργάνωσης του μεριστώματος, τα φυτά *WUS::GUS/RacRNAi* (10H) δεν έδειξαν καθόλου την έκφραση της κατασκευής.



### 3.2.2 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου *WUSCHEL (WUS)* σε έμβρυα αποσιωπημένων σειρών *Arabidopsis thaliana*

Καθώς τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας υποδεικνύουν την απουσία έκφρασης του γονιδίου *WUS* σε νεαρά φυτάρια αποσιωπημένων σειρών RacRNAi 10H, κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της έκφρασής του σε μεγαλύτερης ηλικίας φυτά. Κάνοντας χρήση της ίδιας μεθόδου, της ιστοχημικής ανάλυσης GUS, σκοπός ήταν ο περιορισμός του αναπτυξιακού παραθύρου κατά το οποίο το γονίδιο *WUS* δεν εκφράζεται στην συγκεκριμένη σειρά.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το γονίδιο *WUS* ξεκινά να εκφράζεται από το στάδιο του 16-κύτταρου προεμβρύου. Επομένως, επιλέχθηκαν άνθη από τις ίδιες διαγονιδιακές σειρές φυτών *Arabidopsis thaliana* με την προηγούμενη ενότητα, προκειμένου να παρατηρηθεί η έκφραση της GUS κατασκευής στα έμβρυα που βρίσκονταν στο εσωτερικό των υπέρων. Οι παρατηρήσεις αρχικά πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια στερεοσκοπίου και στην συνέχεια με οπτικό μικροσκόπιο σε άνθη φυτών ηλικίας 41 ημερών. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



**Εικόνα 3.15:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *WUS::GUS* σε έμβρυα αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana*. Άνθη 41 ημερών στα οποία φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε έμβρυα στο εσωτερικό των υπέρων, όπως παρατηρήθηκαν (α) με στερεοσκόπιο και (β) με οπτικό μικροσκόπιο. (γ) Ύπεροι ανθέων οι οποίοι περιέχουν έμβρυα όπου και παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής.

Η παρατήρηση του μάρτυρα έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, η παρατήρηση των ανθέων *WUS::GUS* έδειξε έκφραση της κατασκευής στα έμβρυα των γονιμοποιημένων υπέρων.





**Εικόνα 3.16:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *WUS::GUS* σε έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς *RacRNAi 10H* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Άνθη 41 ημερών στα οποία φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε έμβρυα στο εσωτερικό των υπέρων, όπως παρατηρήθηκαν (α) με στερεοσκόπιο και (β) με οπτικό μικροσκόπιο. (γ) Υπεροι ανθέων οι οποίοι περιέχουν έμβρυα όπου και παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής.

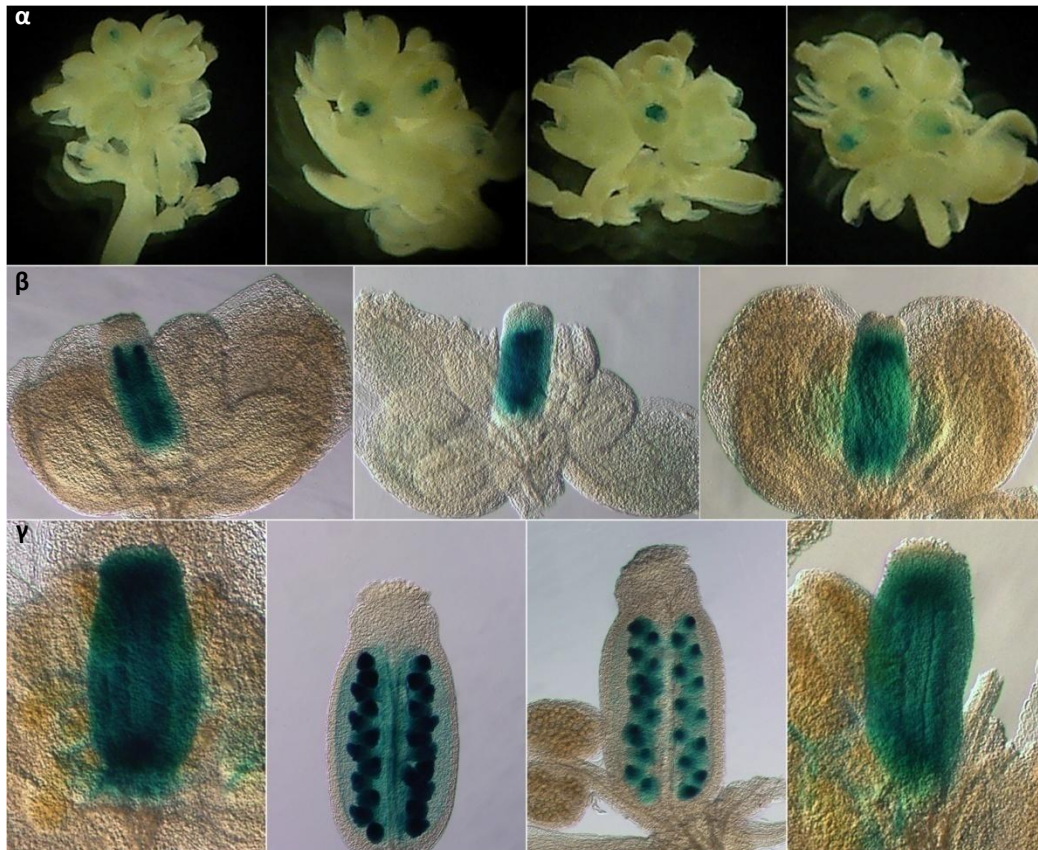
Η παρατήρηση των ανθέων *WUS::GUS/RacRNAi (10H)* έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με εκείνα των μαρτύρων. Φαίνεται πως ο *WUS* προαγωγέας οδηγεί την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GUS* στα έμβρυα, τα οποία αριθμητικά είναι εμφανώς λιγότερα ανά ύπερο συγκριτικά με τον μάρτυρα.

Στο ευρύτερο πλαίσιο μελέτης των *HSP90* και της εμπλοκής τους στην φαινοτυπική πλαστικότητα των οργανισμών, έχουν κατασκευαστεί, πέρα από τις σειρές *RacRNAi*, αντίστοιχες σειρές αποσιώπησης των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών της *HSP90* οικογένειας υπό την καθοδήγηση του ιστοειδικού προαγωγέα *LFY* (Μεταπτυχιακή εργασία Μαργαριτοπούλου Θεώνη). Η χρήση της συγκεκριμένης κατασκευής αποσκοπεί στην διερεύνηση του ρόλου των *HSP90* στην άνθηση, καθώς η πρωτεΐνη *LEAFY* εκφράζεται στη φάση μετάβασης από το βλαστικό στο αναπαραγωγικό στάδιο στα δικοτυλήδονα φυτά και ρυθμίζει την παραγωγή των ανθέων. Επιπλέον, απαιτείται για όλες τις βασικές λειτουργίες που διαφοροποιούν τα άνθη και αναφέρεται και ως γονίδιο ταυτότητας μεριστώματος (William et al, 2004).

Καθώς οι αποσιωπημένες αυτές σειρές εμφανίζουν φαινοτύπους όπως μειωμένη ανάπτυξη, αποφασίστηκε και σε αυτά η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *WUS* με την μέθοδο της ιστοχημικής ανάλυσης *GUS*. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν και πάλι φυτά της διαγονιδιακής σειράς *WUS::GUS*. Τα φυτά στα οποία διερευνήθηκε η έκφραση του γονιδίου

*WUS* αποτελούσαν φυτά της F2 γενιάς η οποία προέκυψε από την διασταύρωση των φυτών-μαρτύρων *WUS::GUS* με φυτά της διαγονιδιακής σειράς *LFY/RNAi* 10.141.

Οι παρατηρήσεις έγιναν σε άνθη τα οποία επιλέχτηκαν από τις διαγονιδιακές σειρές, προκειμένου να παρατηρηθεί η έκφραση της *GUS* κατασκευής στα έμβρυα που βρίσκονταν στο εσωτερικό των υπέρων. Οι παρατηρήσεις αρχικά πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια στερεοσκοπίου και στην συνέχεια με οπτικό μικροσκόπιο σε άνθη ηλικίας 28 ημερών. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



**Εικόνα 3.17: Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *WUS::GUS* σε έμβρυα αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana*. Άνθη 28 ημερών στα οποία φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε έμβρυα στο εσωτερικό των υπέρων, όπως παρατηρήθηκαν (α) με στερεοσκόπιο και (β) με οπτικό μικροσκόπιο. (γ) Υπεροι ανθέων οι οποίοι περιέχουν έμβρυα όπου και παρατηρείται η έκφραση της κατασκευής.**

Τα άνθη των φυτών μαρτύρων των 28 ημερών, είχαν την ίδια εικόνα με εκείνα των μεγαλύτερων φυτών. Πιο συγκεκριμένα, η παρατήρηση των ανθέων αυτών έδειξε έκφραση της κατασκευής *GUS* στα έμβρυα των γονιμοποιημένων υπέρων.





**Εικόνα 3.18:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *WUS::GUS* σε έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς *LFY-RNAi* 10.141 του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Άνθη 28 ημερών στα οποία φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *WUS* σε έμβρυα στο εσωτερικό των υπέρων, όπως παρατηρήθηκαν με στερεοσκόπιο.

Αντίθετα με τον μάρτυρα, στα άνθη των φυτών *WUS::GUS/LFY-RNAi* (10.141) δεν εντοπίστηκε έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GUS* ύστερα από παρατήρησή τους σε στερεοσκόπιο.

Συνοψίζοντας, τα ανωτέρω δεδομένα έδειξαν πως ενώ στα άνθη *WUS::GUS/RacRNAi* (10H) όπως και στον μάρτυρα, ο *WUS* προαγωγέας οδηγεί την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GUS* στα έμβρυα, τα άνθη *WUS::GUS/LFY-RNAi* (10.141) δεν έδειξαν καθόλου την έκφραση της κατασκευής.

### 3.2.3 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου *CYCLINB1:1* σε φυτάρια της αποσιωπημένης σειράς *RacRNAi* 10H

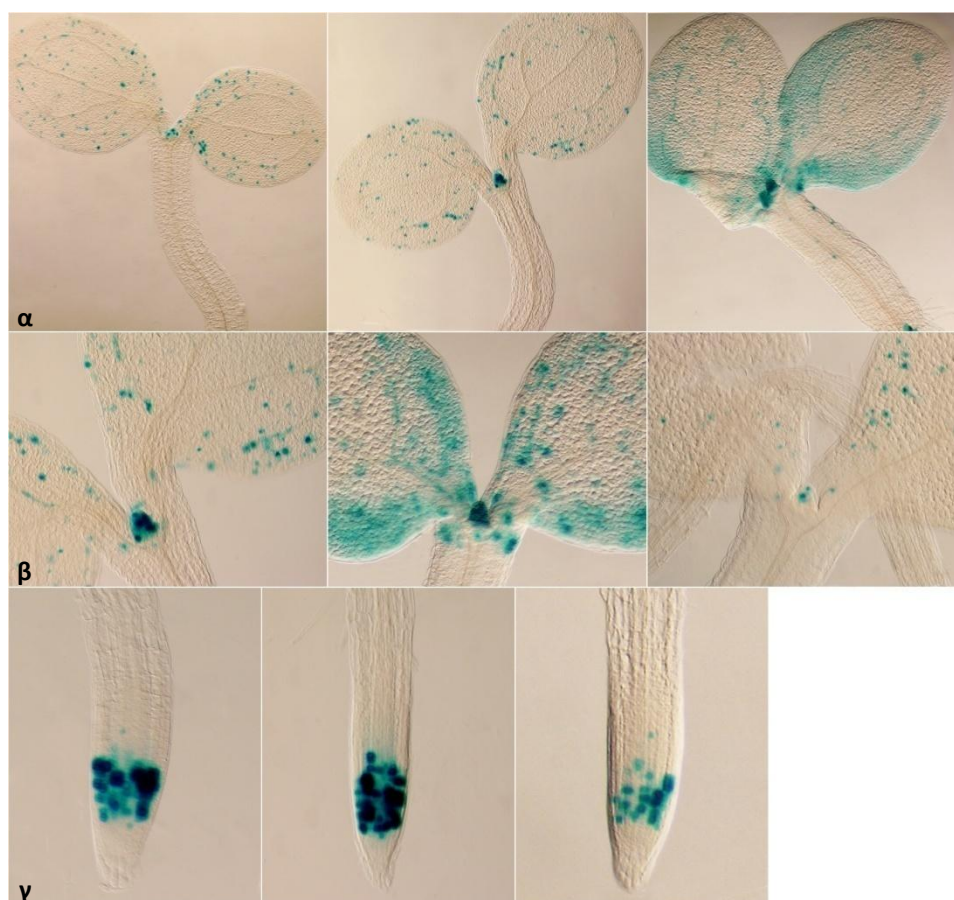
Στην προσπάθεια περαιτέρω κατανόησης του παρατηρούμενου φαινοτύπου των φυτών *RacRNAi*(10H), μελετήθηκε ακόμα μία παράμετρος, το πρότυπο των κυτταρικών διαιρέσεων σε νεαρά φυτάρια. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ιστοχημική ανάλυση της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου της κυκλίνης B1, με την χρήση του συστήματος αναφοράς *GUS*.

Η κυκλίνη B1 (*cyclin B1*), είναι μία ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε σύμπλοκο με την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση *CDC2* (ή αλλιώς *CDK1*) ελέγχει την μετάβαση από την μεσόφαση στην διαίρεση, δηλαδή από την φάση G2 στη φάση M.

Το πείραμα εκτελέστηκε με παρόμοια λογική με την ενότητα 3.2.1, εφαρμόζοντας την μέθοδο της ιστοχημικής ανάλυσης *GUS* σε νεαρά φυτάρια. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Columbia (*Col-0*), τα οποία περιέχουν κατάλληλη γονιδιακή κατασκευή. Η κατασκευή αυτή περιείχε τον

προαγωγέα του γονιδίου *CYCLINB1;1* σε μεταφραστική σύντηξη με το γονίδιο αναφοράς GUS (διαγονιδιακή σειρά FA4C). Τα φυτά στα οποία διερευνήθηκε η έκφραση του γονιδίου *CYCLINB1;1* αποτελούσαν φυτά της F2 γενιάς η οποία προέκυψε από την διασταύρωση των φυτών-μαρτύρων FA4C με φυτά της διαγονιδιακής σειράς RacRNAi 10H. Καθώς λοιπόν τα φυτά FA4C/RacRNAi (10H) είναι προϊόν διασταύρωσης, παρατηρήθηκαν και φυτά που είχαν μεγαλώσει σε θρεπτικό μέσο MS απουσία αντιβιοτικού και φυτά που είχαν μεγαλώσει σε θρεπτικό μέσο MS παρουσία αντιβιοτικού (Hyg). Αυτό κρίθηκε σκόπιμο προκειμένου να διαπιστωθεί το αν τα παρατηρούμενα φυτά ήταν διαγονιδιακά ή όχι, ενώ τα φυτά που μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικού λειτούργησαν σαν ένας ακόμα μάρτυρας.

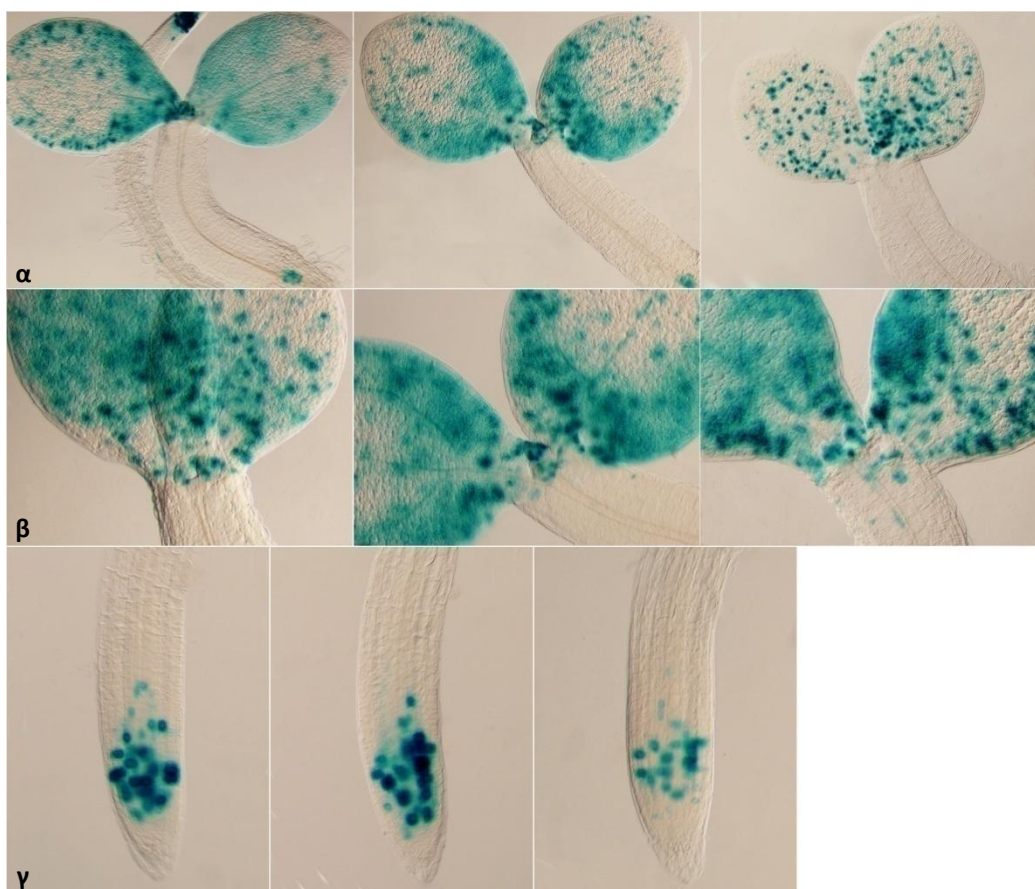
Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου σε φυτάρια τριών και πέντε ημερών και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



**Εικόνα 3.19: Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *CYCLINB1;1::GUS* σε φυτάρια αγριού τύπου *Arabidopsis thaliana* (FA4C) τριών ημερών. (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου GUS υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* σε φυτάρια τριών ημερών. (β) Κοτυληδόνες, ακραίο μερίστωμα βλαστού και (γ) ρίζας όπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο η έκφραση της κατασκευής.**

Σύμφωνα με την παρατήρηση των φυτών FA4C των τριών ημερών, η έκφραση της GUS κατασκευής εντοπίζεται, όπως αναμενόταν, σε περιοχές με έντονη δραστηριότητα κυτταροδιαίρεσεων. Αναλυτικότερα, η χρώση εμφανίζεται με την μορφή κουκκίδων σε διαιρούμενα κύτταρα στην περιοχή των μεριστωμάτων του βλαστού και της ρίζας, όπως και στις κοτυληδόνες καθώς αυτές αναπτύσσονται. Ορισμένες φορές επίσης, εντοπίζεται χρώση στις νευρώσεις των κοτυληδόνων και στο υποκοτύλιο σε σημεία από όπου συχνά εκπύσσονται μετέπειτα οι δευτερογενείς ρίζες του φυτού. Επιπλέον, σε πολλές

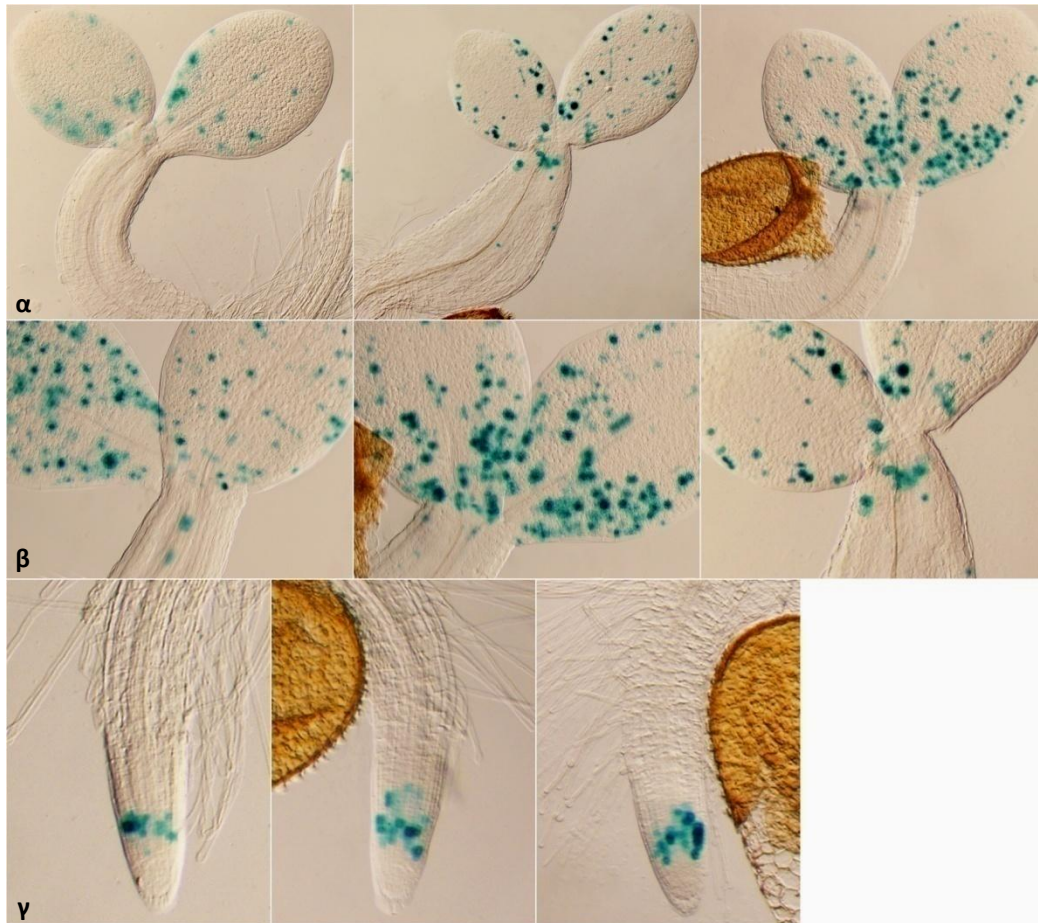
περιπτώσεις φαίνεται πως η έκφραση του γονιδίου *GUS*, υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* δεν είναι τόσο περιορισμένη σε μεμονωμένα κύτταρα αλλά εμφανίζεται περισσότερο διάχυτη σε μία ευρύτερη περιοχή.



**Εικόνα 3.20:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *CYCLINB1;1::GUS* σε φυτάρια της διαγονιδιακής σειράς *RacRNAi 10H* του φυτού *Arabidopsis thaliana* τριών ημερών (απουσία αντιβιοτικού). (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* σε φυτάρια τριών ημερών που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό (β) Κοτυληδόνες, ακραίο μερίστωμα βλαστού και (γ) ρίζας όπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο η έκφραση της κατασκευής.

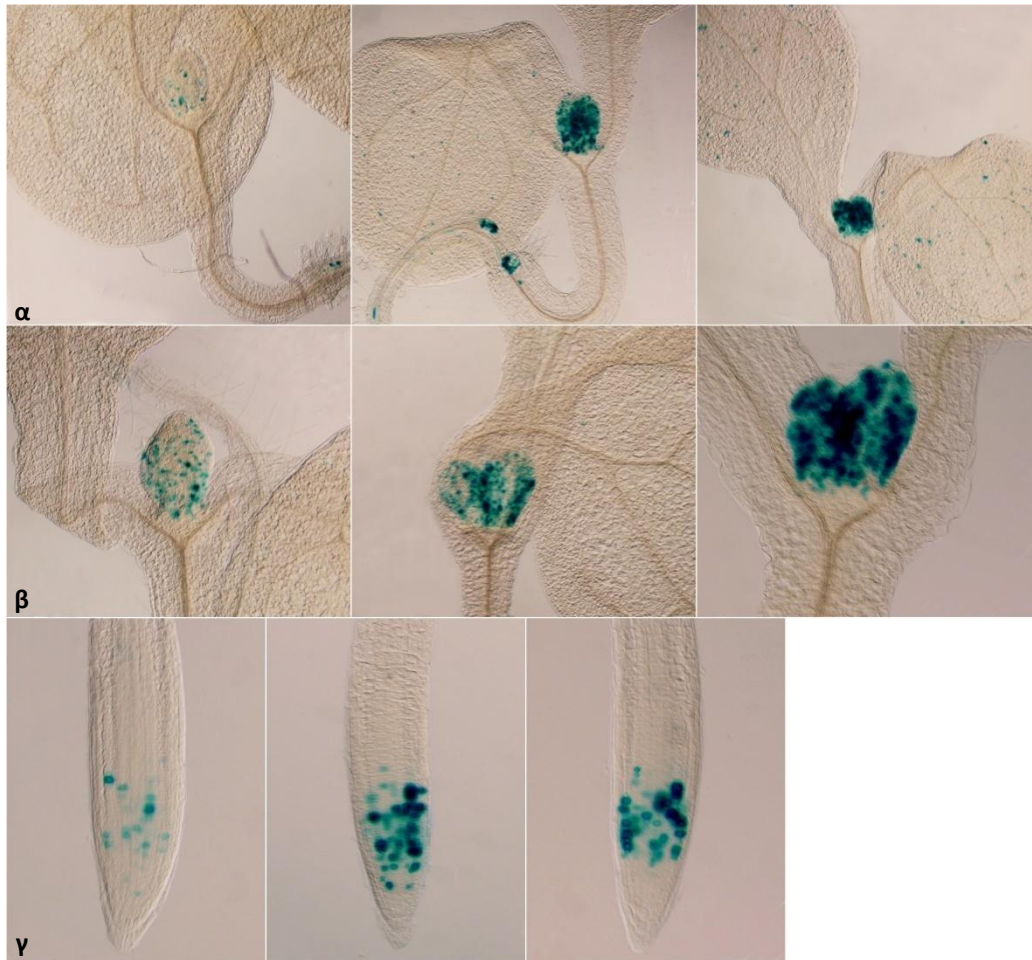
Η παρατήρηση των φυτών *FA4C/RacRNAi (10H)* των τριών ημερών τα οποία μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικού έδειξε ότι στα φυτά αυτά η χρώση εμφανίζεται περισσότερο διάχυτη στην περιοχή των κοτυληδόνων συγκριτικά με τον μάρτυρα. Επιπροσθέτως, σε ορισμένα δείγματα παρατηρήθηκε η ύπαρξη διάσπαρτων περιοχών χρώσης κάτω από το ακραίο μερίστωμα του βλαστού αλλά όχι πάνω σε αυτό.





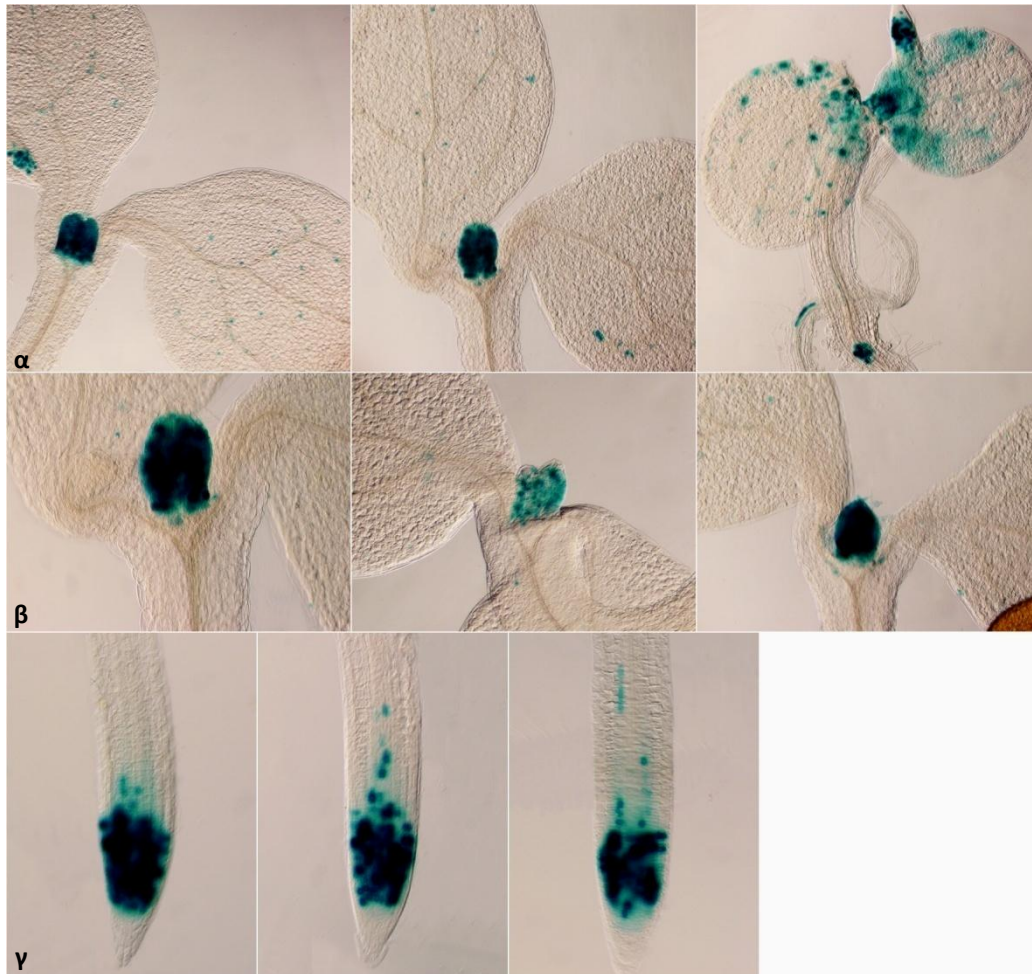
**Εικόνα 3.21: Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής CYCLINB1;1::GUS σε φυτάρια της διαγονιδιακής σειράς RacRNAi 10H του φυτού *Arabidopsis thaliana* τριών ημερών (παρουσία αντιβιοτικού). (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* σε φυτάρια τριών ημερών που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό (β) Κοτυληδόνες, ακραίο μερίστωμα βλαστού και (γ) ρίζας όπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο η έκφραση της κατασκευής.**

Όσον αφορά τα φυτά FA4C/RacRNAi (10H) των τριών ημερών τα οποία μεγάλωσαν παρουσία αντιβιοτικού τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά των φυτών μεγαλωμένων απουσία αντιβιοτικού. Εδώ, η χρώση εμφανίζεται λιγότερο διάχυτη στις κοτυληδόνες όπως και στο μερίστωμα της ρίζας, όμως και πάλι παρατηρήθηκε η ύπαρξη διάσπαρτων περιοχών χρώσης κάτω από το ακραίο μερίστωμα του βλαστού σε κάποιες περιπτώσεις.



**Εικόνα 3.22:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *CYCLINB1;1::GUS* σε φυτάρια αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana* (FA4C) πέντε ημερών. (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* σε φυτάρια τριών ημερών. (β) Πρώτο ζεύγος φύλλων και (γ) ακραίο μερίστωμα ρίζας όπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο η έκφραση της κατασκευής.

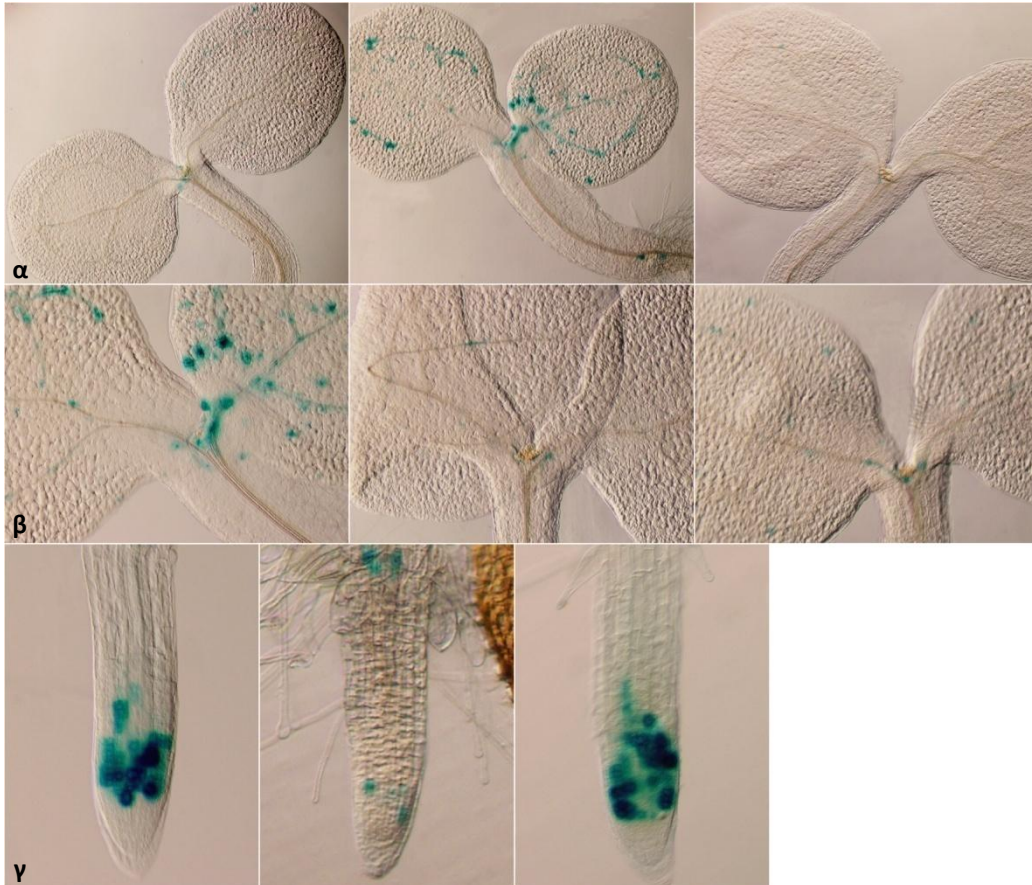
Τα φυτά μάρτυρες FA4C των πέντε ημερών φαίνεται πως έχουν περάσει σε επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, καθώς όλα τα δείγματα έχουν εκπτύξει το πρώτο ζεύγος φύλλων μετά τις κοτυληδόνες. Ως εκ τούτου, ο *CYCLINB1;1* προαγωγέας οδηγεί την έκφραση του γονιδίου-μάρτυρα *GUS* κυρίως στα νέα αναπτυσσόμενα φύλλα και στο μερίστωμα της ρίζας. Επιπροσθέτως, χρώση εμφανίζεται και σε σημεία του υποκοτυλίου σε πολλά από τα οποία έχει ξεκινήσει ήδη η ανάπτυξη δευτερευόντων ριζών. Η συσσώρευση έκφρασης του *GUS* στις κοτυληδόνες είναι πλέον ελάχιστη καθώς έχουν σχεδόν ολοκληρώσει την ανάπτυξή τους.



**Εικόνα 3.23:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *CYCLINB1;1::GUS* σε φυτάρια της διαγονιδιακής σειράς *RacRNAi 10H* του φυτού *Arabidopsis thaliana* πέντε ημερών (απουσία αντιβιοτικού). (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* σε φυτάρια τριών ημερών που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό (β) Πρώτο ζεύγος φύλλων και (γ) ακραίο μερίστωμα ρίζας όπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο η έκφραση της κατασκευής.

Όπως συνέβη και στα νεαρότερα φυτά, η παρατήρηση των φυτών *FA4C/RacRNAi* (*10H*) των πέντε ημερών τα οποία μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικού έδειξε ότι σε σύγκριση με τον μάρτυρα στα φυτά αυτά η χρώση στο νέο ζεύγος φύλλων είναι διάχυτη και συνήθως καλύπτει ολόκληρη την επιφάνειά τους ενώ διάχυτη είναι η χρώση και στο μερίστωμα της ρίζας. Άλλη μία διαφορά τους είναι πως ορισμένα φυτά εμφάνισαν καθυστερημένη ανάπτυξη και βρίσκονταν στο στάδιο της έναρξης ανάπτυξης του πρώτου ζεύγους φύλλων.





**Εικόνα 3.24:** Ιστοχημική τοποθέτηση της έκφρασης της κατασκευής *CYCLINB1;1::GUS* σε φυτάρια της διαγονιδιακής σειράς *RacRNAi 10H* του φυτού *Arabidopsis thaliana* πέντε ημερών (παρουσία αντιβιοτικού). (α) Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *GUS* υπό τον έλεγχο του προαγωγέα *CYCLINB1;1* σε φυτάρια τριών ημερών που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό (β) Κοτυληδόνες, ακραίο μερίστωμα βλαστού και (γ) ρίζας όπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο η έκφραση της κατασκευής.

Τα φυτά FA4C/*RacRNAi* (10H) των πέντε ημερών τα οποία μεγάλωσαν παρουσία αντιβιοτικού εμφάνισαν καθυστερημένη ανάπτυξη και σε σχέση με εκείνα που μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικού αλλά και με τα φυτά μάρτυρες. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρείται έκπτυξη φύλλων ενώ η έκφραση του *GUS* συσσωρεύεται κυρίως στο μερίστωμα της ρίζας και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται και μία διάχυτη έκφραση σε ολόκληρη την περιοχή της ρίζας. Στις κοτυληδόνες η παρατηρούμενη έκφραση της κατασκευής είναι ελάχιστη και εντοπίζεται κυρίως στις νευρώσεις. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του ακραίου μεριστώματος του βλαστού, όπου η έκφραση που παρατηρείται εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές γύρω από αυτό και ιδιαίτερα στον αγωγό ιστό.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το πρότυπο έκφρασης της κατασκευής *GUS* παρουσίασε διακυμάνσεις περιλαμβάνοντας ένα εύρος φαινοτύπων. Επιπλέον, καθώς τα φυτά ολοκλήρωναν την ανάπτυξη των κοτυληδόνων φαίνεται πως καθυστερούσαν να εισέλθουν στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο της έκπτυξης του πρώτου ζεύγους φύλλων.

# **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### 4.1 Οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TFL2

Στα πλαίσια της μελέτης της λειτουργίας των HSP90, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας έχει χρησιμοποιηθεί η προσέγγιση της στοχευμένης γονιδιακής αποσιώπησης με σκοπό την παραγωγή διαγονιδιακών σειρών *Arabidopsis* (RNAi σειρές). Οι σειρές αυτές χαρακτηρίζονται από εκλεκτική αποσιώπηση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών της HSP90 οικογένειας υπό την καθοδήγηση ιστοειδικών προαγωγέων (Μεταπτυχιακή εργασία Μαργαριτοπούλου Θεώνη). Η χρήση των συγκεκριμένων κατασκευών αποσκοπούσε στη μείωση των επιπέδων έκφρασης των HSP90 σε συγκεκριμένους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια προκειμένου να μελετηθούν τα αποτελέσματα της απώλειας έκφρασης των HSP90 στα στάδια αυτά. Ο ένας προαγωγέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο LFY ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη της εμπολής των HSP90 στην διαδικασία της άνθησης. Ο άλλος προαγωγέας που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή RNAi σειρών ήταν ο AtRAC2/ROP7 με στόχο την μελέτη του ρόλου του συστήματος στην εγκαθίδρυση και λειτουργία του AMB καθώς και στην ανάπτυξη του αγωγού ιστού. Τόσο τα φαινοτυπικά αποτελέσματα όσο και οι μοριακές αναλύσεις των μετασχηματισμένων LFY/RNAi φυτών υποδεικνύουν πως τα HSP90 γονίδια διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην άνθηση του φυτού *Arabidopsis thaliana*, καθώς μείωση ή απαλειφή της έκφρασης καθιστά τα φυτά της T1 γενιάς ανίκανα να αναπαραχθούν και να παράγουν απογόνους. Ακόμη όμως και στα φυτά της T2 και T3 γενιάς που κατάφεραν να ανθίσουν παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των ανθέων όπως και ο φαινότυπος τους δεν είναι ο φυσιολογικός.

Τα ευρήματα αυτά έρχονται να προστεθούν σε ορισμένες ακόμα ερευνητικές μελέτες που συνηγορούν στην εμπλοκή των HSP90 γονιδίων στο μηχανισμό της άνθησης (Kim et al., 2011; Sangster et al., 2008a; 2007). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες, στην ζύμη 1.232 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν φυσικά ή γενετικά με τις HSP90 (Breitkreutz et al., 2008). Με άλλα λόγια, ~ 20% των πρωτεϊνών της ζύμης επηρεάζονται από την λειτουργία των HSP90, καθιστώντας την ως την πρωτεΐνη με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις στο γονιδίωμα της ζύμης. Συνδυαστικά, τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν την πιθανότητα μια ή περισσότερες πρωτεΐνες του μηχανισμού άνθησης του *Arabidopsis* να αλληλεπιδρούν με τις HSP90.

Στόχος του πρώτου μέρους της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες TFL2 και RBE που εμπλέκονται στην οργανογένεση του άνθους.

Οι αλληλεπιδράσεις ελέγχθηκαν *in planta* με πειράματα παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης έδειξαν ότι η πρωτεΐνη TFL2 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 και πως οι αλληλεπιδράσεις αυτές τοποθετούνται στον πυρήνα των κυττάρων.

Η πρωτεΐνη TFL2 θεωρείται ένα λειτουργικό ομόλογό PRC1 της ομάδας Polycomb αποτελώντας έναν παράγοντα ρύθμισης της συμπύκνωσης της χρωματίνης στα φυτά και κατέχοντας έτσι έναν σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση. Είναι γνωστό επίσης, πως οι HSP90 αλληλεπιδρούν με την χρωματίνη, με την δέσμευσή τους σε ιστόνες κι αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι οι HSP90 μπορούν να επηρεάσουν την δομή και την οργάνωση της χρωματίνης (Schnaider et al. 1999; Csermely et al., 1994). Επιπλέον, αρκετά γονίδια στόχοι που υπερεκφράζονται σε αναστολή των HSP90, υπόκεινται σε επιγενετικό έλεγχο. Έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb (PCG) έχουν τους ίδιους υποκινητές-στόχους με τις HSP90 και ότι συνεργάζονται για την καταστολή αρκετών γενετικών τόπων loci (Sawarkar and Paro, 2013). Επίσης έχει δειχθεί ότι οι HSP90 συνεργάζονται και με τις πρωτεΐνες της ομάδας Trithorax (TrxG) για τη διατήρηση της ενεργής έκφρασης περιοχών-στόχων της χρωματίνης (Tariq et al., 2009). Εντούτοις, η ακριβής σχέση μεταξύ των HSP90 και των πρωτεϊνών TrxG και PCG δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

Η ανικανότητα δράσης της πρωτεΐνης TFL2 στα φυτά LFY/RNAi πιθανώς να αντικατοπτρίζεται και στο πρότυπο υπομεθυλίωσης που παρουσίασαν σε σχέση με τον άγριο τύπο. Η ανάλυση του πρότυπου μεθυλίωσης φυτών με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των κυτταροπλασματικών HSP90 γονιδίων (LFY/RNAi), υπέδειξε ότι έχουν τροποποιηθεί επιγενετικά παρουσιάζοντας υπομεθυλιωμένο επιγενετικό πρότυπο (Διδακτορική Διατριβή Μαργαριτοπούλου Θεώνη).

Εκτός των ανωτέρω δεδομένων, η συσχέτιση των HSP90 με την πρωτεΐνη TFL2 ενδεχομένως να είναι περισσότερο πολύπλοκη. Σύμφωνα με τους Ludwig-Muller et al., (2000) η παρατηρούμενη θερμοευαισθησία του *tfl2* (*TU8*) *Arabidopsis* μεταλλάγματος οφείλεται σε μειωμένα επίπεδα των κυτταροπλασματικών HSP90. Το ποιος είναι όμως ο ακριβής μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τα μειωμένα επίπεδα των HSP90 παραμένει ακόμα ασαφές.

Όπως γίνεται αντιληπτό, το γονίδιο *TFL2* κωδικοποιεί έναν σημαντικό καταστολέα της γονιδιακής έκφρασης. Επομένως, οι HSP90 μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την πρωτεΐνη TFL2 πιθανώς να ρυθμίζουν επιγενετικά μια πλειάδα μονοπατιών και διαδικασιών που εμπλέκονται στον σύνθετο μηχανισμό της άνθησης. Δύο φαίνεται να είναι οι πιθανοί ρόλοι που μπορεί να διαδραματίζει η HSP90 στο φαινόμενο αυτό. Πρώτον, η HSP90 λόγω της ιδιότητας να λειτουργεί ως μοριακός συνοδός μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση της σωστής ενεργής διαμόρφωσης της TFL2 πρωτεΐνης. Ενδεχομένως η TFL2 πρωτεΐνη να είναι ανίκανη να τροποποιείται και να λαμβάνει την ορθή διαμόρφωση που τη θέτει σε λειτουργική κατάσταση. Η αλληλεπίδραση με την HSP90 επιτρέπει την τροποποίηση και διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με τις ιστόνες. Δεύτερον, η HSP90 πρωτεΐνη μπορεί να απαιτείται για τη μετακίνηση της πρωτεΐνης TFL2 στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να καταστείλει τη γονιδιακή μεταγραφή. Η μία περίπτωση όμως δεν αποκλείει την άλλη, το οποίο συνεπάγεται πως οι δυο παραπάνω ρόλοι της HSP90 θα μπορούσαν να δρουν συνεργατικά. Πιθανόν επομένως, η πρωτεΐνη HSP90 να χρειάζεται τόσο για τη λήψη και διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης TFL2 όσο και για την είσοδο της στον πυρήνα των κυττάρων.

#### **4.2 Οι HSP90 πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RBE**

Φαινοτυπικές αναλύσεις των LFY/RNAi φυτών έχουν δείξει πως η πλειονότητα των ανθέων τους εμφανίζουν διαταραγμένο φαινότυπο. Συγκεκριμένα, αναπτύσσουν μειωμένο αριθμό οργάνων ή/και όργανα που παρουσιάζουν παραμορφώσεις, συμφύσεις ή μειωμένο μέγεθος. Όσον αφορά τα πέταλα, βρέθηκε πως ο αριθμός τους είναι μειωμένος στο μεγαλύτερο ποσοστό των ανθέων που μελετήθηκαν. Παράλληλα μπορεί να χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα δυσμορφιών, από υπανάπτυξη ή/και να δημιουργούν συμφύσεις με άλλα ανθικά όργανα. Ως εκ τούτου, έχοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά κρίθηκε σκόπιμο, να εξεταστούν οι αλληλεπιδράσεις των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη RBE, έναν βασικό ρυθμιστή της ανάπτυξης των πετάλων στο *Arabidopsis*. Οι αλληλεπιδράσεις ελέγχθηκαν *in planta* με πειράματα παροδικής έκφρασης σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του SPLIT-GFP πειράματος φαίνεται ότι η πρωτεΐνη RBE δεν αλληλεπιδρά με καμία από τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3.

Το RBE κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη SUPERMAN (SUP)-like zinc-finger η οποία κατέχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των πετάλων του άνθους όπως και των σεπάλων. Καθώς η πρωτεΐνη RBE φαίνεται να μην αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης, ο παρατηρούμενος φαινότυπος των LFY/RNAi φυτών υποδηλώνει πως οι HSP90 ενδεχομένως να εμπλέκονται

σε πρότερα στάδια της άνθησης, όπως στον καθορισμό της ταυτότητας των ανθικών οργάνων.

#### **4.3 Ιστοχημική μελέτη έκφρασης γονιδίων με την χρήση του συστήματος αναφοράς GUS**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν κατασκευαστεί διαγονιδιακές σειρές χρησιμοποιώντας τον ιστο-ειδικό προαγωγέα *Rac2/Rop7* μέσω των οποίων πραγματοποιήθηκε στοχευμένη, χρονικά και αναπτυξιακά, καταστολή των κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων. Η χρήση της συγκεκριμένης κατασκευής αποσκοπούσε στην μελέτη του ρόλου του συστήματος στην εγκαθίδρυση και λειτουργία του AMB καθώς και στο μονοπάτι ανάπτυξης του αγωγού ιστού. Η φαινοτυπική ανάλυση της *RacRNAi 10H* σειράς υπέδειξε πως η μείωση των επιπέδων έκφρασης των *HSP90* μπορεί να επιφέρει σημαντική απόκλιση του φαινοτύπου από το φυσιολογικό. Ένα από τα σημαντικότερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της σειράς *RacRNAi 10H*, αποτελεί η απουσία κεντρικού βλαστού, δηλαδή η έλλειψη κυριαρχίας κορυφής καθώς και η αδυναμία στήριξης. Επιπροσθέτως τα φυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολυάριθμων πλάγιων βλαστών όπως και διπλών βλαστών.

Στα πλαίσια κατανόησης μερικών εκ των παρατηρούμενων φαινοτύπων της αποσιωπημένης σειράς *RacRNAi 10H*, το δεύτερο μέρος της εν λόγω μεταπτυχιακής εργασίας αφορά στην ιστοχημική μελέτη της έκφρασης δύο γονιδίων, των *WUS* και *CYCLINB1;1*. Τα γονίδια αυτά θεωρήθηκε πως ενδεχομένως εμπλέκονται στην εμφάνιση των φαινοτυπικών αυτών χαρακτηριστικών κάτω από συνθήκες έλλειψης των *HSP90*.

##### **4.3.1 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου *WUSCHEL (WUS)***

Πέραν του πλειοτροπικού φαινοτύπου της *RacRNAi 10H* σειράς, ένα μεγάλο ποσοστό των φυτών αυτών δεν εκπτύσσουν κεντρικό βλαστό αλλά παράγουν πολυάριθμους πλάγιους βλαστούς (Μεταπτυχιακή εργασία Δημοπούλου Αναστασία). Καθώς λοιπόν, τα φυτά της *RacRNAi 10H* σειράς χαρακτηρίζονται από έλλειψη κυριαρχίας κορυφής, θεωρήθηκε πιθανή η μη σωστή λειτουργία του ακραίου μεριστώματος του βλαστού (AMB). Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *WUS* στην σειρά *RacRNAi 10H*, το οποίο κατέχει κυρίαρχο ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση του AMB.

Το γονίδιο *WUS* κωδικοποιεί για έναν ομοιοδομικό (homeodomain) μεταγραφικό παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την διατήρηση των αρχικών μεριστωματικών κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, γεγονός που επιτρέπει την διατήρηση και συνεχή ομαλή λειτουργία του AMB. Η έκφραση του γονιδίου *WUS* μελετήθηκε μέσω της προσέγγισης της ιστοχημικής ανάλυσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου, με την χρήση του συστήματος αναφοράς GUS. Αρχικά, η έκφραση του γονιδίου εξετάστηκε σε νεαρά φυτάρια τριών και πέντε ημερών και οι παρατηρήσεις των φυτών και στις δύο ηλικίες συμφωνούν. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν πως στον μάρτυρα η έκφραση του GUS ανιχνεύεται πολύ εντοπισμένα, στο κέντρο οργάνωσης του μεριστώματος, ενώ στα φυτά *WUS::GUS/RacRNAi (10H)* δεν ανιχνεύεται έκφραση. Σημειώνεται, πως το παραπάνω ισχύει τόσο για τα φυτά *WUS::GUS/RacRNAi (10H)* που μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό όσο και για εκείνα που αναπτύχθηκαν παρουσία αντιβιοτικού.

Καθώς η μελέτη των φυταρίων των τριών και πέντε ημερών υποδεικνύει την απουσία έκφρασης του γονιδίου *WUS* στην σειρά *RacRNAi 10H* στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης, κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της έκφρασής του σε μικρότερης ηλικίας φυτά. Κάνοντας χρήση της ίδιας μεθόδου, της ιστοχημικής ανάλυσης GUS, σκοπός ήταν ο περιορισμός του αναπτυξιακού παραθύρου κατά το οποίο το γονίδιο *WUS* δεν εκφράζεται στην εν λόγω σειρά φυτών. Είναι γνωστό ότι το γονίδιο *WUS* ξεκινά να εκφράζεται από το

στάδιο του 16-κύτταρου προεμβρύου (Haecker et al., 2004). Επομένως, επιλέχθηκαν άνθη από φυτά ηλικίας 41 ημερών, προκειμένου να παρατηρηθεί η έκφραση της *GUS* κατασκευής στα έμβρυα που βρίσκονταν στο εσωτερικό των υπέρων. Έτσι, η παρατήρηση των ανθών *WUS::GUS/RacRNAi* (10H) έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με εκείνα των μαρτύρων καθώς ανιχνεύθηκε η έκφραση του *WUS* στα έμβρυα.

Η μελέτη του πρότυπου έκφρασης του γονιδίου *WUS* σε *RacRNAi* φυτά ηλικίας επτά ημερών, υπέδειξε ότι δεν ανιχνεύονται *WUS* μεταγραφάσματα στο ακραίο μερίστωμα του βλαστού (Διπλωματική εργασία Γεωργοπούλου Παρασκευή). Αντίθετα, σε φυτά 19 ημερών έχει δειχθεί ότι το *WUS* εκφράζεται και μάλιστα φαίνεται να προσεγγίζει τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης (Μεταπτυχιακή εργασία Δημοπούλου Αναστασία). Συνδυαστικά, όλα τα παραπάνω καταλήγουν στο συμπέρασμα πως υπάρχει ένα αναπτυξιακό παράθυρο, κατά το οποίο το γονίδιο *WUS* εκφράζεται ελάχιστα ή και καθόλου στα φυτά της αποσιωπημένης σειράς *RacRNAi* 10H. Πριν και μετά το αναπτυξιακό αυτό παράθυρο φαίνεται πως η έκφραση του *WUS* είναι φυσιολογική ή κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο το *WUS* σταματάει να εκφράζεται τοποθετείται μετά τον σχηματισμό του 16-κύτταρου προεμβρύου και πριν ή κατά την τρίτη ημέρα μετά την βλάστηση του σπόρου. Επίσης, το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο το *WUS* ξεκινά και πάλι να εκφράζεται τοποθετείται μετά την έβδομη ημέρα και πριν ή κατά την δέκατη ένατη ημέρα ανάπτυξης των φυτών.

Όπως γίνεται αντιληπτό, η διαταραχή της έκφρασης του *WUS* πιθανότατα διαδραματίζει άμεσο ρόλο στην εμφάνιση του φαινοτύπου της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής και στην δυσλειτουργία που παρουσιάζει το κορυφαίο μερίστωμα στα φυτά *RacRNAi* 10H. Εντούτοις, ο μηχανισμός ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αλλοίωση των προτύπων έκφρασης του *WUS* δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Η πρώτη εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι πως οι HSP90 εμπλέκονται στο CLV-*WUS*-STM δίκτυο μεταγωγής σιναύλου. Είναι γνωστό, πως ο καθορισμός της ταυτότητας των βλαστικών κυττάρων εξαρτάται από τη δράση των γονιδίων *WUS* και *STM* και πως η διατήρηση της έκφρασης του ενός απαιτεί την ύπαρξη του άλλου. Η δράση του *WUS* οδηγεί στον καθορισμό ενός υποσυνόλου κυττάρων ως βλαστικά κύτταρα, ενώ η δράση του *STM* καταστέλλει την διαφοροποίηση τους προκειμένου αυτά να διαιρεθούν. Χωρίς όμως την παρουσία ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης (negative feedback loop), η συνεχής δράση των γονιδίων *WUS* και *STM* θα είχε σαν αποτέλεσμα την υπέρμετρη συσσώρευση βλαστικών κυττάρων στην κεντρική ζώνη. Επομένως, η διατήρηση ενός περιορισμένου αλλά ικανού αριθμού βλαστικών κυττάρων στο αναπτυσσόμενο AMB επιτυγχάνεται με έναν μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *WUS*, το CLV σύμπλοκο μεταγωγής σιναύλου το οποίο ρυθμίζει την ομοιόσταση του AMB (Williams and Fletcher, 2005). Με βάση τα δεδομένα αυτά, αν οι HSP90 εμπλέκονται στο δίκτυο CLV-*WUS*-STM θα ήταν πιθανό να διαταραχθεί όλο το σηματοδοτικό μονοπάτι ομοιόστασης του AMB σε συνθήκες έλλειψης των HSP90, όπως παρατηρήθηκε στα φυτά *RacRNAi* 10H. Ενδεχομένως η ύπαρξη του αναπτυξιακού παραθύρου όπου δεν ανιχνεύεται έκφραση του *WUS*, να οφείλεται στην αυξημένη έκφραση της κατασκευής αποσιώπησης εξαιτίας του προαγωγέα που χρησιμοποιήθηκε.

Μία δευτερεύουσα ερμηνεία σχετικά με την διαταραχή της έκφρασης του *WUS* θα μπορούσε να προκύψει από τον ρόλο που διαδραματίζει η αυξίνη στην έκφραση του. Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που συσχετίζουν τα επίπεδα κυτοκίνης και αυξίνης με την επαγωγή της έκφρασης του *WUS*, μία εκ των οποίων υποδεικνύει πως η δημιουργία διαβάθμισης αυξίνης και η πολική κατανομή του PIN1 είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της έκφρασης του *WUS* κατά τη διάρκεια της σωματικής εμβρυογένεσης στο *Arabidopsis* (Su et al., 2009; Su et al., 2011). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί πως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PIN1* στην σειρά *RacRNAi* 10H είναι αρκετά μειωμένα (Μεταπτυχιακή εργασία Δημοπούλου Αναστασία). Το γονίδιο *PIN1* κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα εκροής αυξίνης και απαιτείται για την έναρξη και διατήρηση μιας διαβάθμισης

αυξίνης στα φυτά καθώς εμπλέκεται στην πολική μεταφορά της αυξίνης (Friml et al., 2003). Καθώς λοιπόν, η αποσιωπημένη *RacRNAi 10H* σειρά παρουσιάζει προβλήματα τόσο στην μεταφορά των μηνυμάτων της αυξίνης όσο και στην αντίληψη των επιπέδων αυξίνης θα μπορούσε ενδεχομένως αυτό να οδηγήσει στην παρατηρούμενη ελάττωση της έκφρασης του *WUS*.

Συμπερασματικά, και τα δύο ανωτέρω ενδεχόμενα θα μπορούσαν εν δυνάμει να συνεισφέρουν στην αποδιοργάνωση του ακραίου μεριστώματος του βλαστού και στην εμφάνιση του φαινοτύπου της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής της *RacRNAi 10H* σειράς, μέσω της διατάραξης του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *WUS*.

#### **4.3.1.α Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου *WUS* σε έμβρυα *LFY/RNAi***

Φαινοτυπικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στις σειρές *LFY/RNAi* καταλήγουν στο συμπέρασμα πως τα φυτά αυτά εκτός από την δυσλειτουργία και την αποδιοργάνωση που εμφανίζουν στην διαδικασία της άνθησης, φαίνεται να αντιμετωπίζουν προβλήματα και στην ανάπτυξή τους. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε και σε αυτά τα φυτά η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *WUS* με την χρήση του συστήματος αναφοράς *GUS*. Συνεπώς, για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν άνθη από φυτά ηλικίας 28 ημερών, προκειμένου να παρατηρηθεί η έκφραση της *GUS* κατασκευής στα έμβρυα που βρίσκονταν στο εσωτερικό των υπέρων. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η σειρά *LFY/RNAi 10.141*. Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων υποδηλώνουν πως αντίθετα με τον μάρτυρα, στον οποίο καταγράφηκε έκφραση της κατασκευής *GUS* στα έμβρυα των γονιμοποιημένων υπέρων, στα άνθη των φυτών *WUS::GUS/LFY-RNAi (10.141)* δεν εντοπίστηκε έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GUS*.

Προκειμένου να διαλευκανθεί το αν ευθύνεται η ηλικία των φυτών ή αν υπάρχει ενδεχόμενη εμπλοκή των *HSP90* στην απουσία έκφρασης του γονιδίου *WUS* θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα.

#### **4.3.2 Μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου *CYCLINB1:1***

Πέρα από την ποικιλία των φαινοτύπων που παρουσιάζει η σειρά *RacRNAi 10H*, έχει διαπιστωθεί σε γενική κλίμακα πως τα φυτά αυτά έχουν μικρότερο ύψος σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Κατά συνέπεια, στην προσπάθεια διερεύνησης του παρατηρούμενου φαινοτύπου των φυτών *RacRNAi(10H)*, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να ελεγχθεί ακόμα μία παράμετρος, το πρότυπο των κυτταρικών διαιρέσεων σε νεαρά φυτάρια. Η μελέτη των κυτταροδιαιρέσεων, πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας την μεθόδο της ιστοχημικής ανάλυσης *GUS* για την ανάλυση της μεταγραφικής δραστηριότητας του προαγωγέα του γονιδίου της κυκλίνης *B1*.

Η κυκλίνη *B1 (CYCLIN B1)*, είναι μία ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε σύμπλοκο με την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση *CDC2* (ή αλλιώς *CDK1*) ελέγχει την μετάβαση από την μεσόφαση στην διαίρεση, δηλαδή από την φάση *G2* στη φάση *M*.

Η έκφραση του γονιδίου *CYCLINB1:1* εξετάστηκε σε νεαρά φυτάρια τριών και πέντε ημερών. Στα φυτά *FA4C/RacRNAi (10H)* των τριών ημερών (είτε μεγάλωσαν παρουσία είτε απουσία αντιβιοτικών) η έκφραση της *GUS* κατασκευής εντοπίστηκε, όπως αναμενόταν, σε περιοχές με έντονη δραστηριότητα κυτταροδιαιρέσεων όπως οι περιοχές των μεριστωμάτων του βλαστού και της ρίζας, οι κοτυληδόνες καθώς αυτές αναπτύσσονταν και περιοχές του υποκοτυλίου από όπου συχνά εκπύσσονταν μετέπειτα οι δευτερογενείς ρίζες του φυτού. Συγκριτικά όμως με τον μάρτυρα, στα φυτά *FA4C/RacRNAi (10H)* τα οποία μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικών η χρώση εμφανιζόταν περισσότερο διάχυτη στις περιοχές των κοτυληδόνων και του μεριστώματος της ρίζας. Στα μεγαλύτερα φυτά τα



πρότυπα έκφρασης των σειρών άλλαξαν κυρίως όσον αφορά τα φυτά που μεγάλωσαν παρουσία αντιβιοτικών καθώς βρίσκονταν σε προγενέστερο στάδιο ανάπτυξης σε σχέση με τον μάρτυρα και η συσσώρευση χρώσης ήταν μειωμένη. Και πάλι τα φυτά FA4C/RacRNAi (10H) τα οποία μεγάλωσαν απουσία αντιβιοτικών παρουσίασαν ένα πρότυπο χρώσης περισσότερο διάχυτο στην επιφάνεια του νέου ζεύγους φύλλων και στο μερίστωμα της ρίζας συγκριτικά με τον μάρτυρα.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως στα φυτά FA4C/RacRNAi (10H) το πρότυπο έκφρασης της κατασκευής GUS παρουσίασε ένα εύρος φαινοτύπων. Επιπλέον, καθώς τα φυτά ολοκλήρωναν την ανάπτυξη των κοτυληδόνων φαίνεται πως καθυστερούσαν να εισέλθουν στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο της έκπτυξης του πρώτου ζεύγους φύλλων.

Συνοψίζοντας, όλα τα ανωτέρω δεδομένα συνδυαστικά καταδεικνύουν μία γενικευμένη εμπλοκή των κυτταροπλασματικών HSP90 πρωτεϊνών σε κομβικές διαδικασίες καθ'όλη την πορεία της ανάπτυξης των φυτών. Αναλυτικότερα, τα ευρήματά μας επισημαίνουν τον εξέχοντα ρόλο που διαδραματίζουν οι HSP90 πρωτεΐνες στο μηχανισμό της άνθησης που θεμελιώνεται δια μέσω της αλληλεπίδρασης των HSP90 με ένα κεντρικό ρυθμιστικό μόριο της άνθησης, την πρωτεΐνη TFL2. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως η μείωση των επιπέδων των HSP90 οδήγησε στην εμφάνιση ενός αναπτυξιακού παραθύρου, κατά το οποίο το γονίδιο *WUS* εκφράζεται ελάχιστα ή και καθόλου με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του ακραίου μεριστώματος του βλαστού και την εμφάνιση του φαινοτύπου της έλλειψης κυριαρχίας κορυφής. Όπως γίνεται αντιληπτό, το σύστημα HSP90 κατέχει ρόλο θεμελιώδους σημασίας και ασκεί ρύθμιση ευρείας κλίμακας από τα πρώτα κίοντα στάδια τόσο στην βλαστική όσο και στην αναπαραγωγική ανάπτυξη των φυτών.

## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- **Acunzo J, Katsogiannou M and Rocchi P** (2012). Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 1622–1631.
- **Akner G, Mossberg K, Sundqvist KG, Gustafsson JA and Wikstrom AC** (1992). Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 356–364.
- **Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P and Kay SA** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* 293, 880–883.
- **Ali MM, et al.** (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440, 1013–1017.
- **Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, et al.** (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5328–33.
- **Al-Wahaibi MH** (2011). Plant heat-shock proteins: a mini review. *J King Saud Univ (Sci)* 23:139–150.
- **Amasino R** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J.* 61, 1001–1013.
- **Arya R, Mallik M and Lakhota SC** (2007). Heat shock genes – integrating cell survival and death. *J. Biosci.* 32: 595-610.
- **Aspenstrom P** (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 95-102.
- **Baker CC, Sieber P, Wellmer F and Meyerowitz EM** (2005). The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15, 303-315.
- **Balch WE, Morimoto RI, Dillin A and Kelly JW** (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916–919.
- **Barends TR, Werbeck ND and Reinstein J** (2010). Disaggregases in 4 dimensions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 46–53.
- **Bartlett AI and Radford SE** (2009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 582–588.
- **Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P and Rosen N** (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem.* 277:39858-66.
- **Bathey NH and Lyndon RF** (1990). Reversion of flowering. *Bot. Rev.* 56, 162–189.
- **Becker J and Craig EA** (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 219:11-23.
- **Bernier G** (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 175–219.
- **Bertrand C, Bergounioux C, Domenichini S, Delarue M and Zhou DX** (2003). Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *Journal of Biological Chemistry* 278:28246-28251.
- **Bhalla PL and Singh MB** (2006). Molecular control of stem cell maintenance in shoot apical meristem. *Plant Cell Reports* 25:249-256.
- **Biggiogera M, et al.** (1996). Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. *Exp. Cell Res.* 229, 77–85.
- **Birve A, Sengupta AK, Beuchle D, Larsson J, Kennison JA, Rasmuson-Lestander A and Muller J** (2001). Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development* 128, 3371–3379.

- **Blázquez MA, Ahn JH and Weigel D** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet* 33:168–171.
- **Blázquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR and Weigel D** (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* 10:791–800.
- **Blázquez MA, Weigel D** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404:889–892.
- **Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleissner R, Wisman E, Apel K and Melzer S** (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24:591–599.
- **Bourne HR, Sanders DA and McCormick F** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.
- **Bowman JL, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz EM and Smyth DR** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. *Development* 119, 721–743.
- **Bowman JL, Smyth DR and Meyerowitz EM** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112, 1–20.
- **Bowman JL, Smyth DR and Meyerowitz EM** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 1: 37–52.
- **Breitkreutz BJ, Stark C, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Livstone M, Oughtred R, Lackner DH, Bahler J, Wood V, et al.** (2008). The BioGRID interaction database: 2008 update. *Nucleic Acids Res.* 36, D637–D640.
- **Brewer PB, Howles PA, Dorian K, Griffith M, Ishida T, Kaplan-Levy RN, Kilinc A and Smyth DR** (2004). PETAL LOSS, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the *Arabidopsis* flower. *Development* 131, 4035–4045.
- **Brugge JS** (1986). Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 123, 1–22.
- **Bukau B and Horwich AL** (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines *Cell*, 92 (3), 351–366.
- **Burton BM and Baker TA** (2005). Remodeling protein complexes: insights from the AAA $\omega$  unfoldase ClpX and Mu transposase. *Protein Sci.* 14, 1945–1954.
- **Caplan AJ** (1999). Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol.* 9:262-8.
- **Carles CC and Fletcher JC** (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science* 8:394-401.
- **Cartolano M, Efremova N, Kuckenbergh M, Raman S and Schwarz-Sommer Z** (2009). Enhanced AGAMOUS expression in the centre of the *Arabidopsis* flower causes ectopic expression over its outer expression boundaries. *Planta* 230:857–62.
- **Causier B, Schwarz-Sommer Z and Davies B** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 73-79.
- **Cerdan PD and Chory J** (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423:881–885.
- **Chandler J Wilson A and Dean C** (1996). *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J.* 10, 637–644.
- **Chen B, Zhong D and Monteiro A** (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7, 156.
- **Chen G, Cao P and Goeddel DV** (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell.* 9:401-10.
- **Clark SE, Running MP and Meyerowitz EM** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397–418.

- **Clark SE, Running MP and Meyerowitz EM** (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development* 121, 2057–2067.
- **Clarke AK, MacDonald TM and Sjogren LLE** (2005). The ATPdependent Clp protease in chloroplasts of higher plants. *Physiol. Plant* 123, 406–412.
- **Coen ES and Meyerowitz EM** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*;353:31–7.
- **Colasanti J and Sundaresan V** (2000). Florigen' enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower *Trends Biochem. Sci.*, 25, 236–240
- **Corbesier L and Coupland G** (2006). The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.*, 57, 3395–3403.
- **Cowen LE and Lindquist S** (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309, 2185–2189.
- **Csermely P** (2004). Strong links are important, but weak links stabilize them; *Trends Biochem. Sci.* 29 331–334.
- **Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Oikarinen J and Somogyi J** (1994). The 90 kDa heat shock protein (hsp90) induces the condensation of the chromatin structure. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1657–1663.
- **Cunningham CN, Krukenberg KA and Agard DA** (2008). Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *J. Biol. Chem.* 283, 21170–21178.
- **Curtis OF and Chang HT** (1930). The relative effectiveness of the temperature of the crown as contrasted with that of the rest of the plant upon the flowering of celery plants. *Am. J. Bot.* 17, 1047–1048.
- **Dathan N, Zaccaro L, Esposito S, Isernia C, Omichinski JG, Riccio A, Pedone C, Di Blasio B, Fattorusso R and Pedone PV** (2002). The Arabidopsis SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.* 30, 4945–4951.
- **Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S and Yanofsky MF** (2004). The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* 14, 1935–1940.
- **Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P and Pratt WB** (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J Biol Chem.* 272:21213-20.
- **Dobson CM, Sali A and Karplus M** (1998). Protein folding — a perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 37, 868–893.
- **Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM and Gewirth, DT** (2007). Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the Hsp90 chaperones. *Mol. Cell* 28, 41–56.
- **Douglas NR, et al.** (2011). Dual action of ATP hydrolysis couples lid closure to substrate release into the Group II chaperonin chamber. *Cell* 144, 240–252.
- **Doyle SM, Shorter J, Zolkiewski M, Hoskins JR, Lindquist S and Wickner S** (2007). Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 114–122.
- **Durfee T, Roe JL, Sessions RA, Inouye C, Serikawa K, Feldmann KA, Weigel D and Zambryski PC** (2003). The F-box containing protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8571–8576.
- **Echeverria PC, Mazaira G, Erlejman A, Gomez-Sanchez C, Piwien Pilipuk G and Galigniana MD** (2009). Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the

nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta. *Mol Cell Biol* 29: 4788–4797.

- **Eissenberg JC and Elgin SCR** (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 10: 204-210.
- **Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V and Elgin SCR** (1990). Mutation in a Heterochromatin-Specific Chromosomal Protein is Associated with Suppression of Position-Effect Variegation in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 87: 9923-9927.
- **Elbi C, Walker DA, Romero G, Sullivan WP, Toft DO, Hager GL and DeFranco DB** (2004). Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2876–2881.
- **Ellis RJ** (2007). Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 1–13.
- **Ellis RJ and van der Vies SM** (1991). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 60:321-47.
- **Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin J and Laux T** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J.* 10, 967–979.
- **Eustace BK, et al.** (2004). Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 $\alpha$  in cancer cell invasiveness. *Nature Cell Biol.* 6, 507–514.
- **Fan HY, Hu Y, Tudor M and Ma H** (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J.* 12, 999–1010.
- **Feige U and Polla BS** (1994). Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia.* 50:979-86.
- **Fink AL** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79, 425–449.
- **Fridborg I, Kuusk S, Moritz T and Sundberg E** (1999). The *Arabidopsis* dwarf mutant shi exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell* 11:1019–1032.
- **Fridborg I, Kuusk S, Robertson M and Sundberg E** (2001). The *Arabidopsis* protein SHI represses gibberellin responses in *Arabidopsis* and barley. *Plant Physiol.* 127, 937–948.
- **Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R and Jürgens G** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147–153.
- **García-Cardena G et al.** (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821–824.
- **Gaudin V, Libault M, Pouteau S, Juul T, Zhao G, Lefebvre D and Grandjean O** (2001). Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* 128: 4847-4858.
- **Gendall AR, Levy YY, Wilson A and Dean C** (2001). The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107, 525–535.
- **Germann S, Juul-Jensen T, Letarnc B and Gaudin V** (2006). DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, and its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J* 48: 153–163.
- **Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T and Bukau B** (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732–13737.
- **Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C and Meyerowitz EM** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci* 106: 16529–16534.

- **Gragerov A and Gottesman ME** (1994) Different peptide binding specificities of Hsp70 family members. *J. Mol. Biol.* 241, 133–135.
- **Grandjean O, Vernoux T, Laufs P, Belcram K, Mizukami Y and Traas J** (2004). In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 74–87.
- **Grenert JP, Johnson BD and Toft DO** (1999). The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J Biol Chem.* Jun 18;274(25):17525-33.
- **Griffith ME, da Silva Conceicao A and Smyth DR** (1999). PETAL LOSS gene regulates initiation and orientation of second whorl organs in the *Arabidopsis* flower. *Development* 126, 5635–5644.
- **Guo HW, Yang WY, Mockler TC and Lin CT** (1998). Regulations of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360–1363.
- **Habich C, Kempe K, van Der Zee R, Rumenapf R, Akiyama H, Kolb H and Burkart V** (2005). Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 174, 1298–1305.
- **Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M and Laux T** (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:657-668.
- **Hainzl O, Lapina MC, Buchner J and Richter K** (2009). The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 284, 22559–22567.
- **Hall A** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- **Halliday KJ, Salter MG, Thingnaes E and Whitelam GC** (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J* 33:875–885.
- **Harris SF, Shiau AK and Agard DA** (2004). The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure* 12, 1087–1097.
- **Hartl FU** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 381:571-9.
- **Hartl FU, Bracher A and Hayer-Hartl M** (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.
- **Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M, Mayer MP and Bukau B** (1999). Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr Biol.* 9(9): 322-5.
- **Hartl FU and Hayer-Hartl M** (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16: 574–581.
- **Hartl FU and Hayer-Hartl M** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852–1858.
- **Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D and Buchner J** (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 842–846.
- **Haughn GW, Davin L, Giblin M and Underhill EW** (1991). Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. The glucosinolates. *Plant Physiol.* 97: 217–226.
- **Hayama R and Coupland G** (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 6:13–19.
- **Heald R and McKeon F** (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61 (4): 579–89.
- **Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA and Meyerowitz EM** (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* 15, 1899–1911.
- **Hendrick JP and Hartl FU** (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62: 349-84.



- **Hennig L and Derkacheva M** (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? *Trends in Genetics* 25(9): 814-14-423.
- **Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A and Coupland G** (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *EMBO J* 21:4327-4337.
- **Hiratsu K, Ohta M, Matsui K and Ohme-Takagi M** (2002). The *SUPERMAN* protein is an active repressor whose carboxyterminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett.* 514, 351–354.
- **Holcik M and Sonenberg N** (2005). Translational Controls in Stress and Apoptosis. *Nature* 6, 318-327.
- **Holt SE, et al.** (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 13, 817–826.
- **Honma T and Goto K** (2000). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525–529.
- **Horwich AL, Farr GW and Fenton WA** (2006). GroEL-GroES-mediated protein folding. *Chem. Rev.* 106, 1917–1930.
- **Horwich AL and Fenton WA** (2009). Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Q. Rev. Biophys.* 42, 83–116.
- **Horwich AL, Fenton WA, Chapman E and Farr GW.** (2007). Two families of chaperonin: Physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 115–145.
- **Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy F and Nilsson O** (2005). The mRNA of the Arabidopsis gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309 1694–1696.
- **Huang T, Lopez-Giraldez F, Townsend JP and Irish VF** (2012). RBE controls microRNA164 expression to effect floral organogenesis. *Development* 139:2161–2169.
- **Immink RG, Tonaco IA, de Folter S, Shchennikova A, van Dijk AD, Busscher-Lange J, Borst JW and Angenent GC** (2009). *SEPALLATA3*: the ‘glue’ for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* 10, R24.
- **Irish VF** (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *Plant J.*, 61, 1014–1028.
- **Irish VF** (2008). The Arabidopsis petal: a model for plant organogenesis. *Trends Plant Sci.* 13: 430-436.
- **Ishitani M, Xiong LM, Lee HJ, Stevenson B and Zhu JK** (1998). *HOS1*, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1151–1161.
- **Jaattela M** (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* 31, 261–271.
- **Jackson-Constan D, Akita M and Keegstra K** (2001). Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1541, 102–113.
- **Jacobsen SE and Olszewski NE** (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5, 887–896.
- **Jakob U, Lilie H, Meyer I and Buchner J** (1995). Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 7288–7294.
- **Jhaveri K, Taldone T, Modi S and Chiosis G** (2012). Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers, *Biochim Biophys Acta* 1823: 742–755.
- **Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M and Okamoto JK** (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 6:1211–25.
- **Johnson JL and Brown C** (2009) Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperones* 14, 83–94.
- **Jürgens G** (2001). Apical-basal pattern formation in Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J.* ;20:3609–3616.
- **Jurgens G** (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 316: 153–155.

- **Kampinga HH and Craig EA** (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 579–592.
- **Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ and Weigel D** (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286, 1962–1965.
- **Katschinski DM** (2004). On heat and cells and proteins. *News Physiol Sci.* 19:11-5.
- **Kaufman RJ** (1999). Molecular chaperones and the heat shock response. Sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, 6-10 May 1998. *Biochim Biophys Acta.* 1423:R13-27.
- **Kaya H, Shibahara K, Taoka K, Iwabuchi M, Stillman B and Araki T** (2001). FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104:131-142.
- **Kayes JM, Clark SE** (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* 125, 3843–3851.
- **Keck E, McSteen P, Carpenter R and Coen E.** (2003). Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *EMBO Journal* 22: 1058–1066.
- **Kerner MJ, et al.** (2005). Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. *Cell* 122, 209–220.
- **Kim JH, Durrett TP, Last RL and Jander G** (2004). Characterization of the Arabidopsis TU8 Glucosinolate Mutation, an Allele of TERMINAL FLOWER2. *Plant Molecular Biology* 54: 671-682.
- **Kim JY, Song HR, Taylor BL and Carre IA** (2003). Light-regulated translation mediates gated induction of the Arabidopsis clock protein LHY. *EMBO J* 22:935–944.
- **Kim TS, Kim WY, Fujiwara S, Kim J, Cha JY, Park JH, Lee SY and Somers DE** (2011). HSP90 functions in the circadian clock through stabilization of the client F-box protein ZEITLUPE. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 108, 16843–16848.
- **Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M and Araki T** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960–1962.
- **Komeda Y** (2004). Genetic regulation of time to flower in Arabidopsis thaliana. *Annu Rev Plant Biol* 55: 521–535.
- **Koornneef M, Alonso-Blanco C, Blankestijn-de Vries H, Hanhart CJ and Peeters AJ** (1998a). Genetic interactions among late-flowering mutants of Arabidopsis. *Genetics* 148, 885–892.
- **Koornneef M, Alonso-Blanco, C, Peeters AJM and Soppe W** (1998b). Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 49, 345–370.
- **Koornneef M, Hanhart CJ and Van Der Veen JH** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* 229, 57–66.
- **Koornneef M and Van der Veen JH** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* 58: 257-263.
- **Kotake T, Takada S, Nakahigashi K, Ohto M and Goto K** (2003). Arabidopsis TERMINAL FLOWER 2 Gene Encodes a Heterochromatin Protein 1 Homolog and Represses both FLOWERING LOCUS T to Regulate Flowering Time and Several Floral Homeotic Genes. *Plant Cell Physiol.* 44: 555-564.
- **Krishna P and Gloor G** (2001). The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell stress and Chaperones* 6:238-246.
- **Krizek BA and Fletcher JC** (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* 6:688–698.
- **Krizek BA, Lewis MW and Fletcher JC** (2006). RABBIT EARS is a second whorl repressor of AGAMOUS that maintains spatial boundaries in Arabidopsis flowers. *Plant J.* 45, 369-383.
- **Krukenberg KA, Street TO, Lavery LA and Agard DA** (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Quarterly Reviews of Biophysics* 44, 2

- **Kwon CS, Chen C and Wagner D** (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes and Development* 19:992-1003.
- **Lampugnani ER, Kilinc A and Smyth DR** (2013). Auxin controls petal initiation in Arabidopsis. *Development* 140:185–194.
- **Langer T, Rosmus S and Fasold H** (2003). Intracellular localization of the 90 kDA heat shock protein (HSP90 $\alpha$ ) determined by expression of a EGFP-HSP90 $\alpha$ -fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. *Cell Biol. Int.* 27, 47–52.
- **Latrasse D, Germann S, Houba-Herlin N, Dubois E, Bui-Prodhomme D, et al.** (2011). Control of flowering and cell fate by LIF2, an RNA binding partner of the polycomb complex component LHP1. *PLoS One* 6: e16592.
- **Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K and Traas J** (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1375–1390 b.
- **Laufs P, Peaucelle A, Morin H and Traas J** (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131, 4311-4322.
- **Laux T, Mayer KFX, Berger J and Jürgens G** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* 122, 87–96.
- **Lawson EJ and Poethig RS** (1995). Shoot development in plants: Time for a change. *Trends Genet.* 11, 263–268.
- **Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR and Vierling E** (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* 16, 659–671.
- **Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM and Lee I** (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev* 14: 2366–2376.
- **Lee HJ, Xiong LM, Gong ZZ, Ishitani M, Stevenson B and Zhu JK** (2001). The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.* 15, 912–924.
- **Lee I, Aukerman MJ, Gore SL, Lohman KN, Michaels SD, Weaver LM, John MC, Feldmann KA and Amasino RM** (1994). Isolation of LUMINIDEPENDENS: A gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* 6, 75–83.
- **Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER and Vierling E** (2007). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J* 49:115–127.
- **Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ and Lohmann JU** (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438:1172–1175.
- **Lenhard M, Jurgens G and Laux T** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* 129:3195-3206.
- **Levy, YY and Dean C** (1998). The transition to flowering. *Plant Cell* 10, 1973–1989.
- **Lewis EB** (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* 276:565–570.
- **Li J, Richter K and Buchner J** (2011). Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18(1):61–66.
- **Libault M, Tessadori F, Germann S, Snijder B, Fransz P and Gaudin V** (2005). The Arabidopsis LHP1 protein is a component of euchromatin. *Planta* 222: 910-925.
- **Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J and Cashmore AR** (1998). Enhancement of the blue-light sensitivity of Arabidopsis young seedlings by a blue-light receptor cry2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2686–90.

- **Lindquist S** (1986). The Heat-Shock Response. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-9.
- **Lindquist S and Craig EA** (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 22:631-77.
- **Liu C, Xi W, Shen L, Tan C and Yu H** (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Dev Cell* 16(5):711–722. doi:10.1016/j.devcel.2009.03.011.
- **Liu X, Kim YJ, Müller R, Yumul RE, Liu C, et al.** (2011). AGAMOUS terminates floral stem cell maintenance in Arabidopsis by directly repressing WUSCHEL through recruitment of Polycomb Group proteins. *Plant Cell* 23: 3654–70.
- **Long JA, Moan EI, Medford JI and Barton MK** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature*, 379, 66–69.
- **Lu R, et al.** (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22, 5690–5699.
- **Lubben TH, Donaldson GK, Viitanen PV and Gatenby AA,** (1989). Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone. *Plant Cell* 1, 1223–1230.
- **Ludwig-Muller J, Krishna P and Forreiter C** (2000). A glucosinolate mutant of Arabidopsis is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress. *Plant Physiol.* 123: 949–958.
- **Ludwig-Muller J, Pieper K, Ruppel M, Cohen JD, Epstein E, Kiddle G and Bennett R** (1999). Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. *Planta* 208: 409–419.
- **Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Westphal L, Murphy G, Sherson S, Cobbett C and Dean C** (1997). FCA, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 89, 737–745.
- **MacRae TH** (2000). Structure and function of small heat shock/a-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 899-913.
- **Makhnevych T and Houry WA** (2012). The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim Biophys Acta* 1823:674–682.
- **Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP and Bartel B** (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr. Biol.* 14, 1035-1046.
- **Mandel M, Gustafson-Brown C, Savidge B and Yanofsky MF** (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature* 360: 273-277.
- **Mandel MA and Yanofsky MF** (1995). A gene triggering flower formation in Arabidopsis. *Nature* 377, 522–524.
- **Martin A, Baker TA and Sauer RT** (2005). Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* 437, 1115–1120.
- **Martinez-Zapater JM, Coupland G, Dean C and Koornneef M** (1994). The transition to flowering in Arabidopsis C.R Somerville, E.M Meyerowitz (Eds.), Arabidopsis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 403–434.
- **Martinez-Zapater JM and Somerville CR** (1990). Effect of light quality and vernalization on late-flowering mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 92, 770–776.
- **Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G and Laux T** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, 95, 805–815.
- **Mayer MP** (2010). Gymnastics of molecular chaperones. *Mol. Cell* 39, 321–331.
- **Mayer MP and Bukau B** (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- **Mayer MP, Nikolay R and Bukau B** (2002). Aha, Another Regulator for Hsp90 Chaperones. *Molecular Cell.* 10:1255-1256.
- **McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J and Bukau B** (1995) The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* 249, 126–137.

- **McClellan AJ, et al.** (2007). Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131, 121–135.
- **McDaniel CN, Singer SR and Smith SME** (1992). Developmental states associated with the floral transition. *Dev. Biol.* **153**, 59–69.
- **McHaourab HS, Godar JA and Stewart PL** (2009). Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry* 48, 3828–3837.
- **McLaughlin SH, Smith HW and Jackson SE** (2002). Stimulation of the weak ATPase activity of human Hsp90 by a client protein. *J. Mol. Biol.* 315, 787–798.
- **Melzer S, Kampmann G, Chandler J and Apel K** (1999). FPF1 modulates the competence to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 18, 395–405.
- **Metzger JD** (1988). Localization of the site of perception of thermoinductive temperatures in *Thlaspi arvense* L. *Plant Physiol.* 94, 151–156.
- **Michaels SD and Amasino RM** (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*, 13:935–941.
- **Michaels SD and Amasino RM** (2000). Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ.* 23, 1145–1153.
- **Michaels, SD and Amasino RM** (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11, 949–956.
- **Miernyk JA** (1999). Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol.* 121, 695–703.
- **Milioni D and Hantzopoulos P** (1997). Genomic organization of Hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 35, 955–961.
- **Millar AJ** (2003). A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. *J Biol Rhythms* 18:217–226.
- **Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K and Yahara I** (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1459–1464.
- **Mizukami Y and Ma H** (1997). Determination of *Arabidopsis* Floral Meristem Identity by AGAMOUS. *Plant Cell* 9: 393–408.
- **Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schonfeld HJ, Vierling E and Bukau B** (2003). Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* 278, 31033–31042.
- **Mollapour M, Neckers L**, (2012). Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1823(3):648–655.
- **Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG and Lee I** (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellins signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* 35:613–623.
- **Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C** (1994). The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 313–334.
- **Mouradov A, Cremer F and Coupland G** (2002). Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 14:S111–S130.
- **Muller J and Verrijzer P** (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19: 150–158.
- **Munoz IG, et al.** (2011). Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin. *Nature Struct. Mol. Biol.* 18, 14–19.
- **Myline JS, Barrett L, Tessadori F, Mesnage S, Johnson L, et al.** (2006). LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5012–5017.

- **Nilsson L** (2007). Analysis of Two Transcriptional Regulators that Affect Meristem Function-*Arabidopsis thaliana* *TERMINAL FLOWER2* and *Picea abies* *APETELA2*. Uppsala University, ISSN 1651-6214.
- **Nollen EA and Morimoto RI**, (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *J. Cell Sci.* 115, 2809-2816.
- **Nover L and Scharf KD** (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 53:80-103.
- **Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T and Nakamura K** (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 252–261.
- **Onouchi H, Igeno MI, Perilleux C, Graves K and Coupland G** (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* floweringtime genes. *Plant Cell* 12, 885–900.
- **Panaretou B, et al.** (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone Aha1. *Mol. Cell* 10, 1307–1318.
- **Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW and Pearl LH** (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* Aug 17;17(16):4829-36.
- **Parenticová L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, et al.** (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15:1538–51.
- **Paro R and Hogness DS** (1991). The Polycomb Protein Shares a Homologous Domain with a Heterochromatin- Associated Protein of *Drosophila*. *PNAS* 88: 263-267.
- **Parsell DA 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.
- **Payer JB** (1857). *Traiti d'Organogntnie Comparie des la Fleur*. Masson: Paris.
- **Pearl LH and Prodromou C** (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 271–294.
- **Pearl LH and Prodromou C** (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol.* 10:46-51.
- **Pelaz S, Tapia-Lopez R, Alvarez-Buylla ER and Yanofsky MF** (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 11, 182–184.
- **Pfluger J and Wagner D** (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 645–652.
- **Picard D** (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1640–1648.
- **Pirkkala L, Nykanen P and Sistonen L** (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J.* 15:1118-31.
- **Pouteau S, Nicholls D, Tooke F, Coen E and Battey N** (1997). The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*. *Development* 124, 3343–3351.
- **Powers ET, Morimoto RI, Dillin, A, Kelly JW and Balch WE** (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 959–991.
- **Pratt WB and Toft DO** (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228:111-33.
- **Pratt WB and Toft DO** (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360.
- **Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS and Li L** (2007). PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol.* 5, e172.
- **Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, and Clark SE** (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 17, 61–76.

- **Prodromou C, et al.** (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* 18, 754–762.
- **Putterill J, Laurie R and Macknight R** (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays* 26,363 -373.
- **Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R and Coupland G** (1995). TheCONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80:847–57.
- **Queitsch C, Sangster TA and Lindquist S** (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417, 618–624.
- **Rando OJ and Ahmad K** (2007). Rules and regulation in the primary structure of chromatin. *Curr Opin Cell Biol.*
- **Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL and Riechmann JL** (2001). Regulation of flowering in Arabidopsis by an FLC homologue. *Plant Physiol.* 126, 122–132.
- **Reddy GV** (2008). Live-imaging stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Curr Opin Plant Biol* 11: 88–93.
- **Reddy GV, Heisler MG, Ehrhardt DW and Meyerowitz EM** (2004). Realtime lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Development*, 131, 4225–4237.
- **Reed RC, Berwin B, Baker JP and Nicchitta CV** (2003) GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages: a role for endotoxin contamination in NF\_Β activation and nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* 278, 31853–31860.
- **Reeves PH and Coupland G** (2001). Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiol.* 126, 1085–1091.
- **Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B and Bartel DP** (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513-520.
- **Richter K and Buchner J** (2006). hsp90: twist and fold. *Cell* 127, 251–253.
- **Richter K, Haslbeck M and Buchner J** (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40:253–266.
- **Ridley AJ** (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology* 11, 471-477.
- **Rieu I and Laux T** (2009). Signaling pathways maintaining stem cells at the plant shoot apex. *Semin Cell Dev Biol* 20: 1083–1088.
- **Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D and Smith DF** (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *Embo J.* 22:1158-67.
- **Rizzardi K, Landberg K, Nilsson L, Ljung K and Sundås-Larsson A** (2011). TFL2/LHP1 is involved in auxin biosynthesis through positive regulation of YUCCA genes. *Plant J.* 65:897–906.
- **Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C and Pearl LH** (2004). The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell.* 116:87-98.
- **Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV and Fletcher JC** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* 14:969-977.
- **Rutherford SL and Lindquist S** (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* 396:336-42.
- **Sablowski R** (2007). Flowering and determinacy in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 58, 899–907.
- **Sakai H, Krizek BA, Jacobsen SE and Meyerowitz EM** (2000). Regulation of SUP expression identifies multiple regulators involved in Arabidopsis floral meristem development. *Plant Cell* 12, 1607-1618.



- **Sakai H, Medrano LJ and Meyerowitz EM** (1995). Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries. *Nature* 378, 199-203.
- **Samach A, Klenz JE, Kohalmi SE, Risseuw E, Haughn GW and Crosby WL** (1999). The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of Arabidopsis thaliana is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J.* 20, 433–445.
- **Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF and Coupland G.** (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288: 1613–1616.
- **Samakovli D, Margaritopoulou T, Prassinos C, Milioni D and Hatzopoulos P** (2014). Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytologist* DOI: 10.1111/nph.12843.
- **Sangster TA, Bahrami A, Wilczek A, Watanabe E, Schellenberg K, McLellan C, Kelley A, Kong SW, Queitsch C and Lindquist S** (2007). Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in Arabidopsis thaliana with reduced Hsp90 levels. *PLoS ONE* 7:1–14.
- **Sangster TA and Queitsch C** (2005). The Hsp90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol* 8:86–92.
- **Sangster TA, Salathia N, Lee HN, Watanabe E, Schellenberg K, Morneau K, Wang H, Undurraga S, Queitsch C and Lindquist S** (2008a). HSP90-buffered genetic variation is common in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci* 105: 2969–2974.
- **Sangster TA, Salathia N, Undurraga S, Milo R, Schellenberg K, Lindquist S and Queitsch C** (2008b). HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 2963–2968.
- **Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, and Laux T** (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811–814.
- **Sato N, et al.** (2003). Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 847–852.
- **Sattler R** (1973). *Organogenesis of flowers: a photographic textatlas.* Toronto.
- **Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, et al.** (2004) Sculpting the proteome with AAA( $\omega$ ) proteases and disassembly machines. *Cell.*, 119, 9–18.
- **Sawarkar R and Paro R** (2013). Hsp90@chromatin.nucleus: an emerging hub of a networker. *Trends Cell Biol* 23:193–201.
- **Schatlowski N, Creasey K, Goodrich J and Schubert D** (2008). Keeping plants in shape: polycomb-group genes and histone methylation. *Semin Cell Dev Biol* 19:547–553.
- **Schaupp A, Marcinowski M, Grimminger V, Bosl B and Walter S.** (2007). Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. *J. Mol. Biol.* 370, 674–686.
- **Schlesinger MJ, Ashburner M and Tissieres A** (1982). *Heat shock proteins: from bacteria to man.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- **Schnaider T, Oikarinen J, Ishiwatari-Hayasaka H, Yahara I and Csermely P** (1999). Interactions of Hsp90 with histones and related peptides. *Life Sci* 65:2417–2426.
- **Schomburg, FM, Patton DA, Meinke DW and Amasino RM** (2001). FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell* 13, 1427–1436.
- **Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G and Laux T** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, 100, 635–644.
- **Schrader EK, Harstad KG and Matouschek A** (2009). Targeting proteins for degradation. *Nat. Chem. Biol.* 5, 815–822.
- **Scortecci KC, Michaels SD and Amasino RM** (2001). Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *Plant J.* 26, 229–236.

- **Seo JS, Lee YM, Park HG and Lee JS** (2006). The inter tidal copepod *Tigriopus japonicus* small heat shock protein 20 gene (Hsp20) enhances thermotolerance of transformed *Escherichia coli*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 340, 901–908.
- **Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ and Dennis ES** (1999). The FLF MADS box gene: A repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 11, 445–458.
- **Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ and Dennis ES** (2000). The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3753–3758.
- **Shiau AK, Harris SF, Southworth DR and Agard DA** (2006). Structural analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* 127, 329–340.
- **Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL and Meyerowitz EM** (2007). Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* 134, 1051–1060.
- **Siligardi G, et al.** (2002). Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J. Biol. Chem.* 277, 20151–20159.
- **Simon R, Igeno MI and Coupland G** (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384, 59–62.
- **Simpson GG and Dean C** (2002). *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science* 296:285–289.
- **Singh PB and Georgatos SD** (2002). HP1: Facts, open questions, and speculation. *Journal of Structural Biology* 140: 10–16.
- **Smith DF** (1998). Sequence motifs shared between chaperone components participating in the assembly of progesterone receptor complexes. *Biol. Chem.* 379, 283–288.
- **Smyth DR, Bowman JL and Meyerowitz EM** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2, 755–767.
- **Snape JW, Quarrie SA and Laurie DA** (1996). Comparative mapping and its use for the genetic analysis of agronomic characters in wheat. *Euphytica* 89, 27–31.
- **Sollars V, et al.** (2003). Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. *Nature Genet.* 33, 70–74.
- **Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC and Judd WS** (2007). Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56 : 13.
- **Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, Palumbo G, Pimpinelli S and Bozzetti MP.** (2010). Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature* 463:662-5.
- **Spiess C, Meyer AS, Reissmann S and Frydman J** (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol.* 14, 598–604.
- **Steeves TA and Sussex IM** (1989). *Patterns in Plant Development*. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Stephanou A and Latchman DS** (1999). Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors. *Gene Expression* 7, 311–319.
- **Stewart RN and Dermen H** (1970). Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *Am. J. Bot.*, 57,, 816–826.
- **Su PH and Li HM** (2008). *Arabidopsis* stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiol.* 146, 1231–1241.
- **Su YH, Liu YB and Zhang XS** (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol Plant* 4: 616–625.

- **Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD and Zhang XS** (2009). Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 59:448-460.
- **Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F and Coupland G** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410, 1116–1120.
- **Sun TP and Kamiya Y** (1994). The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6, 1509–1518.
- **Sun Y and MacRae TH**, (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell. Mol. Sci.* 62, 2460-2476.
- **Sundås-Larsson A, Landberg K and Meeks-Wagner DR** (1998). The TERMINAL FLOWER2 (TFL2) Gene Controls the Reproductive Transition and Meristem Identity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149 597-605.
- **Sung S, He Y, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L, et al.** (2006). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genet* 38: 706–710.
- **Sung ZR, Chen L, Moon YH and Lertpiriyapong K** (2003). Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. *Curr Op Plant Biol* 6:29–35.
- **Taipale M, Jarosz DF and Lindquist S** (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*11, 515–528.
- **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.
- **Takeda S, Matsumoto N and Okada K** (2004). RABBIT EARS, encoding a SUPERMAN-like zinc finger protein, regulates petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 425–434.
- **Talon M, Koornneef M and Zeevaart JAD** (1990). Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7983–7987.
- **Tariq M, Nussbaumer U, Chen Y, Beisel C and Paro R** (2009). Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 1157–1162.
- **Tatebe H and Shiozaki K** (2003). Identification of Cdc37 as a novel regulator of the stress-responsive mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 23:5132-42.
- **Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Munster T, Winter KU and Saedler H** (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115–149.
- **Theissen G and Saedler H** (2001). Floral quartets. *Nature* 409: 469–471.
- **Thomas B and Vince-Prue D** (1997). *Photoperiodism in plants*. London: Academic Press.
- **Tissieres A, Mitchell HK and Tracy UM** (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 85:389-98.
- **Todd MJ, Viitanen PV and Lorimer GH** (1994). Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* 265, 659–666.
- **Tokuriki N and Tawfik DS** (2009). Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution. *Nature* 459, 668–673.
- **Tsan MF and Gao B** (2009). Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol.* 85:905–910.
- **Tsutsumi S, et al.** (2009). Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 1141–1147.
- **Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G and Colot V** (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 Specifically

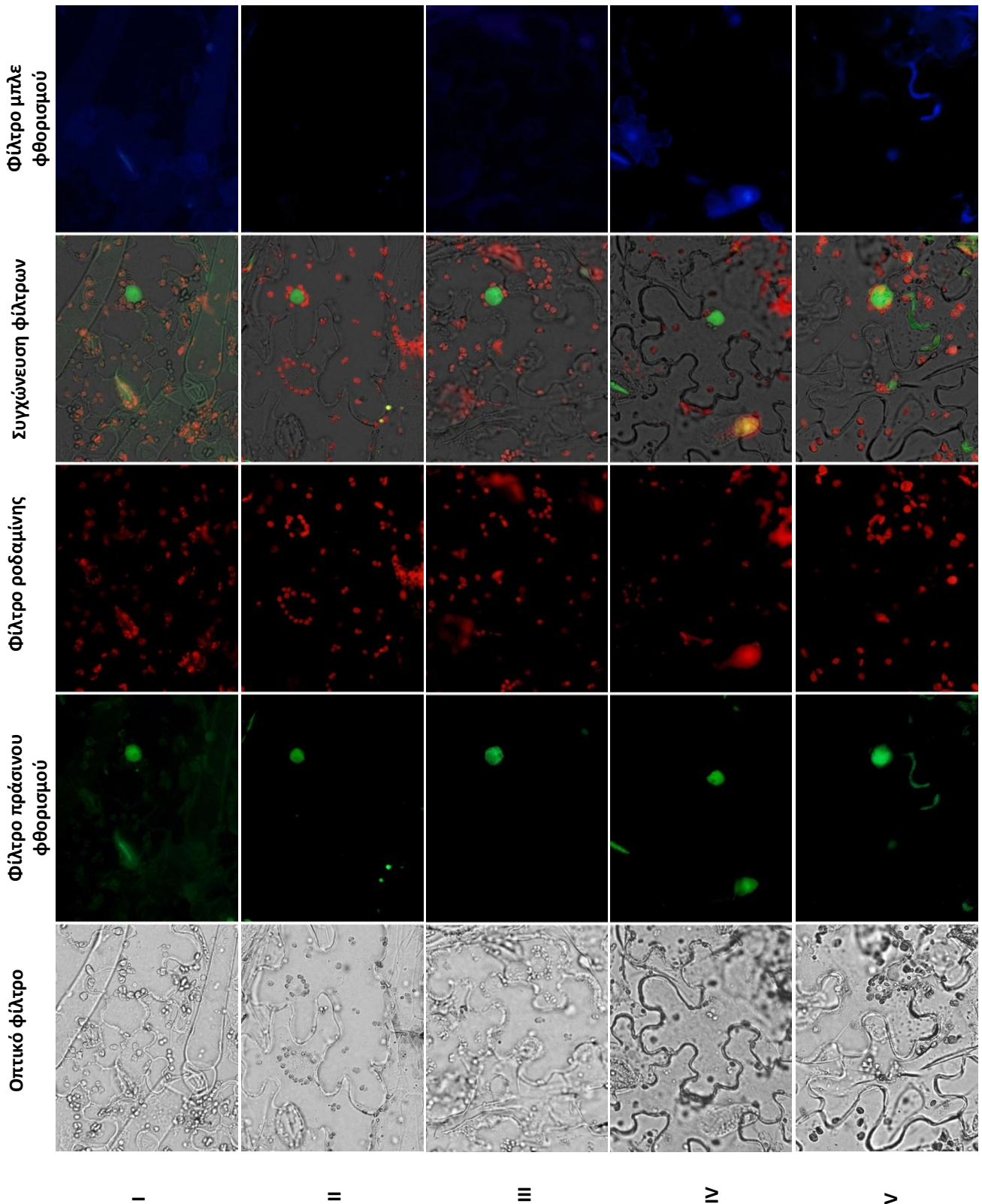
Associates with Genes Marked by Trimethylation of Histone H3 Lysine 27. *PLoS Genet* 3:e86.

- **U Brand, JC Fletcher, M Hobe, EM Meyerowitz and R Simon** (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, 289, 617–619.
- **Vabulas RM, Swasti R, Manajit HH, et al**, (2010). Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a004390.
- **Van der Graaff E, Laux T and Rensing SA**. (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biology* 10: 248.
- **Voisine W, Pedersen JS and Morimoto RI** (2010). Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiology of Disease* 40, 12–20.
- **Wandinger SK, Richter K and Buchner J** (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 18473–18477.
- **Wang W, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A** (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9, 244–252.
- **Wang XJ, Reyes JL, Chua NH and Gaasterland T** (2004). Prediction and identification of Arabidopsis thaliana microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.* 5, R65.
- **Weber JA, Taxman DJ, Lu Q and Gilmour DS** (1997). Molecular architecture of the hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region. *Mol Cell Biol.* 17:3799-808.
- **Weigel D** (1995). The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *Plant Cell* 7, 388-389.
- **Weigel D and Meyerowitz EM** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*;78:203–9.
- **Weigel D and Nilsson O** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377: 495-500.
- **Welch WJ and Feramisco JR** (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 14949–14959.
- **Wellensiek SJ** (1964). Dividing cells as a prerequisite for vernalization. *Plant Physiol.* 39, 832–835.
- **Weller JL, Reid JB, Taylor SA and Murfet IC** (1997). The genetic control of flowering in pea. *Trends Plant Sci.* 2, 412–418.
- **Whitesell L and Lindquist SL** (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Rev. Cancer* 5, 761–772.
- **William DA, Su Y, Smith MR, Lu M, Baldwin DA and Wagner D** (2004). Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *PNAS* 101, 1775-1780.
- **Williams L and Fletcher JC**. (2005). Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol* 8:582-586.
- **Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S and Fletcher JC** (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* 132:3657-3668.
- **Wilson RN, Heckman JW and Somerville CR** (1992). Gibberellin is required for flowering in Arabidopsis thaliana under short days *Plant Physiol.*, 100, 403–408.
- **Wu X, Dabi T and Weigel D** (2005). Requirement of homeobox gene STIMPY/WOX9 for Arabidopsis meristem growth and maintenance. *Current Biology* 15:436.
- **Xing S, Rosso MG and Zachgo S** (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *Development*, 132, 1555–1565.
- **Xu L and Shen WH** (2008). Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 18: 1966–1971.
- **Xu W, et al.** (2005). Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12, 120–126.

- **Xu Y, Singer MA and Lindquist SL** (1999). Maturation of the tyrosine kinase c-Src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 109–114.
- **Xu YL, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA and Zeevaart JAD** (1995). The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6640-6644.
- **Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jonsson H and Reddy G.V.** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev.* 25, 2025–2030.
- **Yang Y and Li Z** (2005). Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol. Cells* 20, 173–182.
- **Yeyati PL, Bancewicz RM, Maule J and van Heyningen V** (2007). Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. *PLoS Genet.* 3, e43.
- **Young JC, Agashe VR, Siegers K and Hartl FU** (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:781-91.
- **Young JC, Moarefi I and Hartl FU** (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* 154:267-73.
- **Young JC, Obermann WM and Hartl FU** (1998). Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem.* 273, 18007–18010.
- **Zemach A, Li Y, Ben-Meir H, Oliva M, Mosquana A, Kiss V, Avivi Y, Ohad N and Grafi G** (2006). Different Domains Control the Localization and Mobility of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 in *Arabidopsis* Nuclei. *Plant Cell* 18: 133-145.
- **Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J and Jacobsen SE** (2007). Wholegenome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5:e129.
- **Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME and Hendrickson WA** (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606–1614.
- **Zou Z, Cao L, Zhou P, Su Y, Sun Y, Li W** (2008). Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 135, 333–339.
- **Γεωργοπούλου Παρασκευή** (2014). Φαινοτυπική ποικιλομορφία και πλαστικότητα σε αποσιωπημένες HS90-RNAi *Arabidopsis* σειρές, Δπλωματική εργασία, Έργ. Μοριακής Βιολογίας Γ.Π.Α.
- **Δημοπούλου Α** (2011). Εμπλοκή των HSP90 στην ανάπτυξη του βλαστού. Μεταπτυχιακή μελέτη, Έργ. Μοριακής Βιολογίας Γ.Π.Α.
- **Μαργαριτοπούλου Θ** (2012). Η δυναμική των HSP90 στον έλεγχο της ανάπτυξης στα φυτά. Διδακτορική διατριβή, Έργ. Μοριακής Βιολογίας Γ.Π.Α.
- **Χαραλαμπίδης Κ, Μηλιώνη Δ, Καλαντίδης Κ, Παπαδοπούλου Κ, Ρήγας Σ, Ρούσσης Α και Χατζόπουλος Π** (2009). Αναπτυξιακή μοριακή βιολογία φυτών. Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, ISBN: 978-960-8002-46-3.

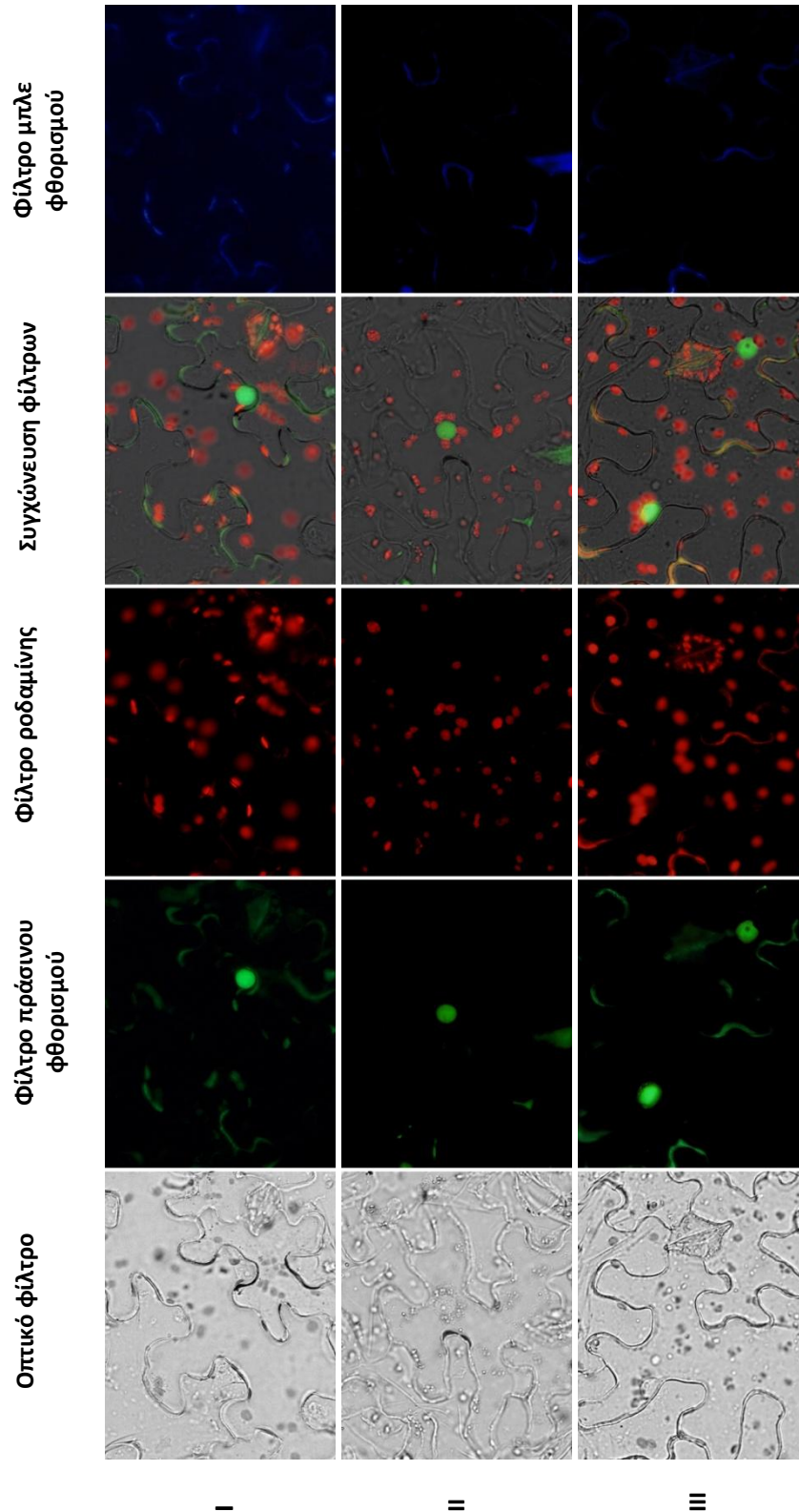
# **6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

TFL2/HSP90.1

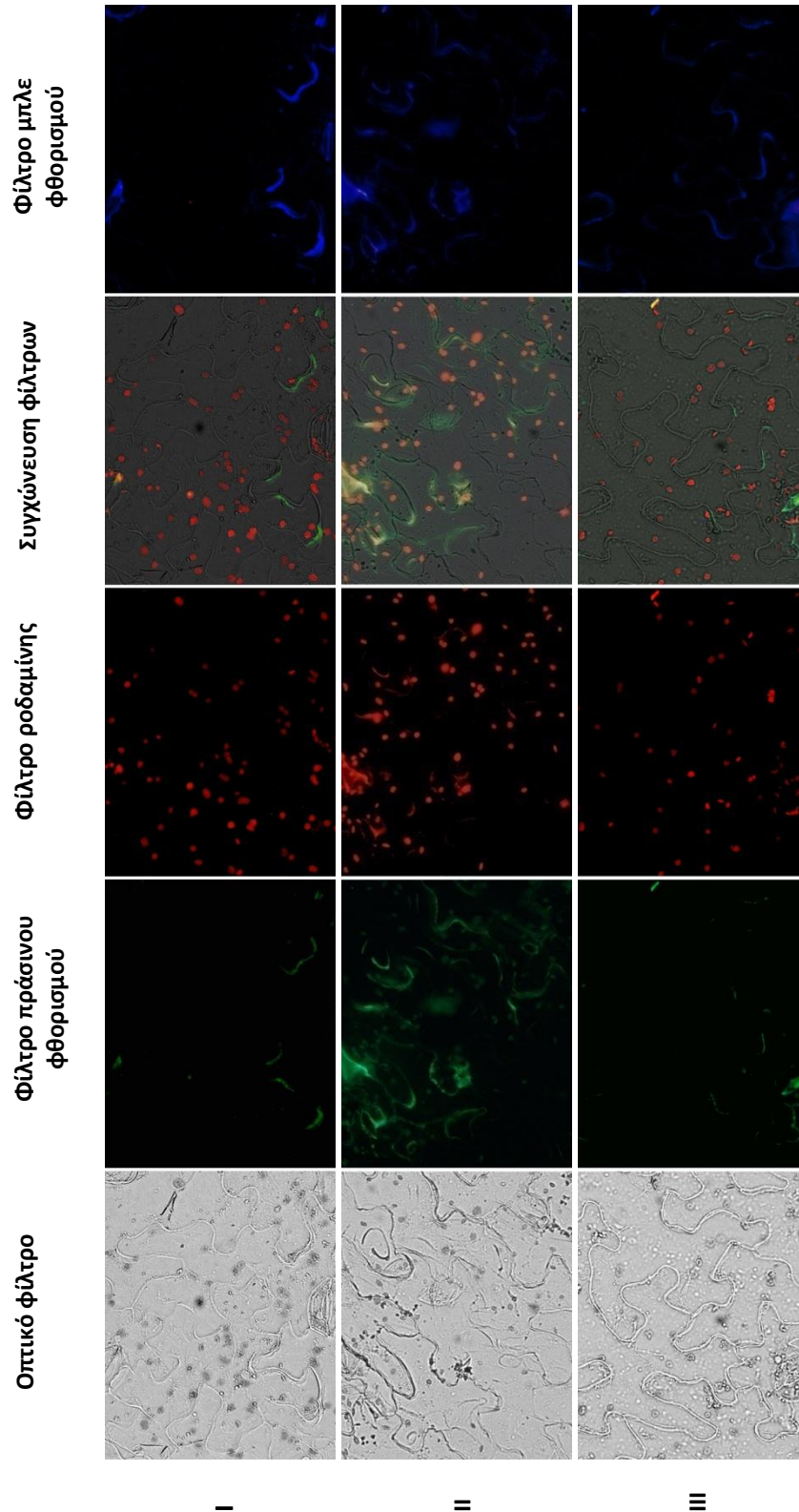




TFL2/HSP90.3



RBE/HSP90.1



RBE/HSP90.3

