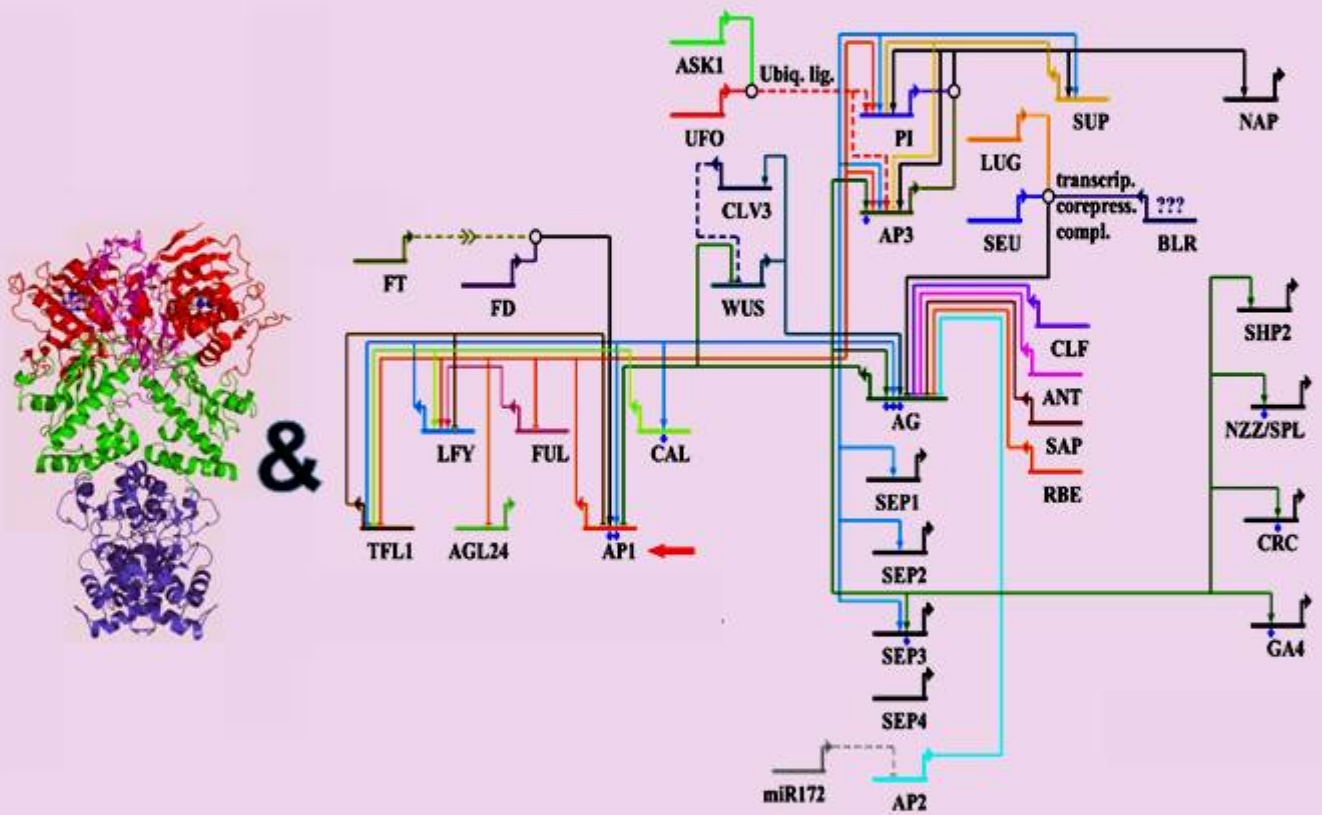


ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η δυναμική των HSP90
στον έλεγχο της ανάπτυξης στα φυτά



Μαργαριτοπούλου Θεώνη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ
Μηλιώνη Δήμητρα, Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Καλαϊτζής Παναγιώτης, Ερευνητής Α', ΜΑΙΧ
Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ
Μηλιώνη Δήμητρα, Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ
Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ
Ρήγας Σταμάτης, Λέκτορας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ
Χαραλαμπίδης Κοσμάς, Επικ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την ολοκλήρωση της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Επικ. Καθηγήτρια Δήμητρα Μηλιώνη για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα και για τις γνώσεις και συμβουλές που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον διευθυντή του Εργαστηρίου, κ. Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με δέχτηκε στο εργαστήριό του. Δεν θα παραλείψω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για το περιβάλλον συναδελφικότητας και συντροφικότητας που αναπτύσσουν στο χώρο του Εργαστηρίου. Ευχαριστώ επίσης τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Κουτογιαννάτο για την αξιόλογη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την πορεία εκπόνησης της διατριβής.

Τελευταία και μη εξαιρετικά, θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την οικογένειά μου, που χωρίς την ηθική και ψυχική τους υποστήριξη δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής αλλά και τον καλό μου φίλο Κώστα Πράσινο για την αμέριστη συμπαράστασή του.

The HSP90 system is an abundant and highly conserved molecular chaperone, with key roles in many pathways ranging from cellular homeostasis and signal transduction to development. However, its engagement in developmental pathways is poorly understood in plants.

Since there are several members of the Hsp90 gene family, an RNAi approach was employed in *Arabidopsis* to comprehensively investigate the function of HSP90 proteins in a tissue specific manner. The *LFY::HSP90RNAi* lines lost their competence to flower suggesting that Hsp90 silencing compromise the regulatory network that controls the timing and/or the ability of flowering. However, short heat-shock treatments alleviated the *LFY::HSP90RNA* interference and flower-like structures were able to develop into flowers. These Hsp90 knockdown lines exhibited late flowering and were chosen for further analysis. Subsequent generations showed extreme bud and flower phenotypes while flowering time was highly affected in light-dependent manner. Many of the key components of flowering pathways were disturbed. Even though transgenic DNA samples showed modifications on the methylation status of the 5SrRNA sequence and the LFY promoter, perturbed flowering proceeded under normal growing conditions. BiFC and yeast-2-hybrid approaches demonstrated that HSP90s interact with two major flowering pathway integrators, SOC1 and AGL24.

These findings reveal that deficiency in the HSP90 chaperone machinery disrupts the reproductive cycle and degrades the epigenetic control. The HSP90 buffering capacity impairment to the point of canalization distortion is discussed.

Το σύστημα των HSP90 πρωτεϊνών αποτελεί ένα άφθονο και υψηλά συντηρημένο σύστημα μοριακού συνοδού, το οποίο διαδραματίζει εξέχοντες ρόλους σε πληθώρα βιολογικών διαδικασιών που κυμαίνονται από την κυτταρική ομοιόσταση και τη μετάδοση σήματος μέχρι την ανάπτυξη. Παρ' όλα αυτά, η εμπλοκή του στα αναπτυξιακά μονοπάτια των φυτών δεν έχει καταστεί ακόμα πλήρως κατανοητή.

Η παρούσα εργασία ασχολείται με το πώς η εξασθένηση της ρυθμιστικής ικανότητας των HSP90 προκαλεί παραμόρφωση στην καναλοποίηση της ανάπτυξης.

Στο φυτό *Arabidopsis* η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από αρκετά μέλη. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της RNA γονιδιακής αποσιώπησης προκειμένου να καταστεί δυνατή η μελέτη της λειτουργίας των HSP90 πρωτεϊνών σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό και ιστοειδικό στάδιο. Οι *LFY::HSP90RNAi* σειρές έχασαν την ικανότητά τους να ανθίζουν, κατάσταση που δηλώνει ότι η αποσιώπηση των Hsp90 γονιδίων διατάραξε τα ρυθμιστικά δίκτυα που ελέγχουν το χρόνο και/ή την ικανότητα της άνθισης. Όμως, βραχυπρόθεσμες εφαρμογές θερμικών σοκ ανέστρεψαν την *LFY::HSP90RNA* αποσιώπηση και σε ορισμένες σειρές οι ανθόμορφες δομές που σχηματίστηκαν μπόρεσαν να εξελιχθούν σε άνθη. Αυτές οι *LFY::HSP90RNAi* σειρές επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Οι επικείμενες γενιές παρουσίασαν εξαιρετικά δραματικούς φαινότυπους τόσο στα κλειστά όσο και στα ανοικτά άνθη. Επίσης, η εφαρμογή διαφόρων συνθηκών φωτοπεριόδου επηρέασε εξαιρετικά το χρόνο άνθισης. Πολλά από τα βασικά συστατικά των μονοπατιών της άνθισης διαταράχθηκαν. Αν και τα απομονωμένα DNA δείγματα από τις διαγονιδιακές σειρές έδειξαν τροποποιήσεις στο πρότυπο μεθυλίωσης των φυτών τόσο στην 5SrRNA ακολουθία όσο και στον LFY προαγωγέα, η άνθιση, παρ' ότι διαταραγμένη, προάγεται κάτω από κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Οι τεχνολογικές προσεγγίσεις των BiFC και yeast-2-hybrid απέδειξαν ότι οι HSP90s αλληλεπιδρούν με δύο κυρίαρχους ρυθμιστές και μεσολαβητές της άνθισης, SOC1 and AGL24.

Τα ευρήματα αυτά αποκαλύπτουν ότι η ανεπάρκεια του συστήματος του HSP90 μοριακού συνοδού διασπά των αναπαραγωγικό κύκλο των φυτών και αλλοιώνει τον επιγενετικό έλεγχο.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	σελ 1
1.α. Μοριακοί συνοδοί	σελ 2
1.α.1. Το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού	σελ 4
1.α.2. Δομικές ιδιότητες	σελ 6
1.α.3. Βοηθητικοί παράγοντες	σελ 8
1.β. Φαινοτυπική πλαστικότητα	σελ 9
1.β.1. Καναλοποίηση	σελ 9
1.β.2. Στοχαστικότητα	σελ 11
1.β.3. Καναλοποίηση στη μύγα <i>Drosophila melanogaster</i>	σελ 12
1.β.4. Καναλοποίηση στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	σελ 14
1.β.5. HSP90 και ανθεκτικότητα στις ασθένειες στα φυτά	σελ 17
1.β.6. Αποκάλυψη επιγενετικής παραλλακτικότητας	σελ 19
1.γ. Άνθιση	σελ 23
1.γ.1. Γενικά	σελ 23
1.γ.2. Προγραμματίζοντας την ταυτότητα	σελ 26
1.γ.2.1. Κατασκευή του γενετικού δικτύου της άνθισης	σελ 27
1.γ.2.2. Μονοπάτι μεγάλης ημέρας	σελ 27
1.γ.2.3. Μονοπάτι γιββερελλικού οξέος	σελ 28
1.γ.2.4. Αυτόνομο μονοπάτι	σελ 29
1.γ.2.5. Μονοπάτι εαρινοποίησης	σελ 30
1.γ.3. Κομβικά γονίδια των μονοπατιών της άνθισης	σελ 31
1.γ.3.1. Soc1	σελ 31
1.γ.3.2. Agl24	σελ 32
1.γ.3.3. Ft	σελ 32
1.γ.4. Γονίδια μερισωματικής ταυτότητας	σελ 33
1.γ.4.1. Leafy	σελ 34
1.γ.4.2. Ap1	σελ 35
1.γ.4.3. Cal	σελ 35
1.γ.5. Το μοντέλο ABCDE	σελ 36
1.δ. Επιγενετική	σελ 38
1.δ.1. Γενικά	σελ 38
1.δ.2. Μεθυλίωση του DNA	σελ 39
1.δ.2.1. Ζώα	σελ 39
1.δ.2.2. Φυτά	σελ 41
1.δ.3. Τροποποιήσεις ιστονών	σελ 45
1.δ.3.1. Ζύμη και μύγα	σελ 45
1.δ.3.2. Φυτά	σελ 47
2. Υλικά και μέθοδοι	σελ 49
2.α. Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού	σελ 50
2.β. Καλλιέργεια σπορόφυτων <i>Arabidopsis thaliana</i>	σελ 50
2.γ. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> και μετασχηματισμός	σελ 51
2.γ.1. Απευθείας μετασχηματισμός <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με τη μέθοδο Freeze-thaw	σελ 51
2.γ.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	σελ 52

2.δ. Μετασχηματισμός φυτών <i>A. thaliana</i> με <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	σελ 53
2.ε. Απομόνωση γενωματικού DNA από φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> με τη μέθοδο CTAB	σελ 53
2.στ. Καθαρισμός DNA με φαινόλη	σελ 54
2.ζ. Απομόνωση RNA από φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i>	σελ 55
2.η. Χειρισμός με DNase	σελ 55
2.θ. Βακτηριακά στελέχη	σελ 56
2.ι. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	σελ 56
2.ι.1. Προετοιμασία “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό.....	σελ 56
2.ι.2. Μετασχηματισμός “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	σελ 57
2.ι.3. Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασχηματισμού (Transform efficiency).....	σελ 57
2.κ. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα	σελ 58
2.λ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης πλασμιδιακού DNA με τη βοήθεια φυγοκέντρου	σελ 58
2.μ. Αντιδράσεις με ένζυμα περιορισμού	σελ 59
2.μ.1 Επίλογή ενζύμων περιορισμού για την ανίχνευση κατά Southern	σελ 59
2.ν. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	σελ 60
2.ξ. Ενοποίηση τμημάτων DNA με πλασμιδιακό φορέα	σελ 61
2.ο. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	σελ 62
2.π. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	σελ 62
2.π.1. PCR αποικιών	σελ 66
2.π.2. Tail PCR	σελ 66
2.ρ. BiFC-SPLITGFP σε <i>Nicotiana benthamiana</i>	σελ 68
2.σ. Σύστημα δύο υβριδίων	σελ 70
2.τ. Μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων κατά Southern	σελ 71
2.υ. Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων	σελ 72
2.φ. Ανίχνευση σήματος υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων	σελ 73
2.χ. Χειρισμός του DNA με Sodium bisulfate	σελ 74
2.χ.1. Ιδιότητες του Sodium Bisulfite.....	σελ 74
3. Αποτελέσματα	σελ 76
3.α. Δημιουργία της κατασκευής αποσιώπησης και φαινοτυπική παρατήρηση των μετασχηματισμένων φυτών	σελ 77
3.α.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των <i>LFY::HSP90RNAi</i> φυτών	σελ 82
3.α.2. Μοριακή ανάλυση των <i>LFY::HSP90RNAi</i> φυτών	σελ 85
3.β. Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των <i>LFY::HSP90RNAi</i> φυτών T2 γενιάς	σελ 88
3.γ. Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των <i>LFY::HSP90RNAi</i> φυτών T3 γενιάς	σελ 82
3.γ.1. Φαινοτυπική παρατήρηση της T3 γενιάς	σελ 93
3.γ.2. Πείραμα επίδρασης φωτοπερίόδου μεγάλης ημέρας	σελ 94
3.γ.3. Πείραμα επίδρασης φωτοπερίόδου μικρής ημέρας	σελ 97
3.γ.4. Μοριακή ανάλυση T3 γενιάς	σελ 99
3.δ. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις	σελ 105

3.δ.1. Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων της άνθισης του <i>Arabidopsis thaliana</i>	σελ 105
3.δ.2. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών <i>in planta</i>	σελ 106
3.δ.3. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης	σελ 110
3.ε. Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης των <i>LFY::HSP90RNAi</i> φυτών	σελ 113
3.ε.1. Αποτελέσματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων κατά Southern	σελ 114
3.στ. Bisulfite sequencing	σελ 121
3.στ.1. Επιλογή γενωματικών περιοχών και σχεδιασμός εκκινητών	σελ 122
3.στ.2. Απομόνωση γενωματικού DNA και χειρισμός με Sodium Bisulfite	σελ 124
3.στ.3. Ανάλυση του προαγωγέα <i>Ap1</i>	σελ 125
3.στ.4. Ανάλυση του προαγωγέα <i>Soc1</i>	σελ 126
3.στ.5. Ανάλυση του προαγωγέα <i>Lfy</i>	σελ 126
3.στ.6. Ανάλυση του προαγωγέα <i>Sup</i>	σελ 129
4. Συζήτηση	σελ 132
4.α. Θεωρητικό υπόβαθρο	σελ 133
4.β. Οι HSP90 επηρεάζουν δραματικά το φαινότυπο της άνθισης	σελ 134
4.γ. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης των Hsp90 γονιδίων διαταράσσει τη λειτουργία των μονοπατιών της άνθισης	σελ 135
4.δ. Οι HSP90 αλληλεπιδρούν με κομβικά συστατικά του μονοπατιού της άνθισης	σελ 137
4.ε. Αλλοίωση της φαινοτυπική πλαστικότητας/καναλοποίησης λόγω της έλλειψης των HSP90.....	σελ 139
4.στ. Η ανεπάρκεια των HSP90 προκαλεί ανωμαλίες στον επιγενετικό έλεγχο	σελ 142
5. Βιβλιογραφία	σελ 146
6. Παράρτημα	σελ 155

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.α. Μοριακοί συνοδοί

Οι μοριακοί συνοδοί είναι πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμμετέχουν, διευκολύνουν και ρυθμίζουν τις αλλαγές στη διαμόρφωση πλειστων πρωτεϊνών, χωρίς όμως να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την τελική δομή των πρωτεϊνών αυτών. Οι μοριακοί συνοδοί προσδένονται και σταθεροποιούν τις διαμορφώσεις των πρωτεϊνών-‘πελατών’ τους και μέσα από κύκλους πρόσδεσης και απελευθέρωσης μπορούν να συνεισφέρουν στην τελική ορθή διαμόρφωση των πρωτεϊνών αυτών και να μειώσουν τη συσσωμάτωσή τους (Dobson 2004). Μέσω του μηχανισμού αυτού, οι μοριακοί συνοδοί διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες. Αναλυτικά, κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, εμπλέκονται στη *de novo* σύνθεση πολυπεπτιδίων (Hartl and Hayer-Hartl 2002), λειτουργούν ως μεταφορείς διαμέσω μεμβρανών (Rapoport 2007) και συμμετέχουν στην αναδίπλωση πρωτεϊνών που έχουν μετουσιωθεί από ποικίλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Nollen and Morimoto 2002). Επίσης, λαμβάνουν μέρος στη συναρμολόγηση ολιγομερών και αποσυναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο την αλλαγή μεταξύ ενεργής και ανενεργής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών-‘πελατών’, την ενδοκυτταρική μεταφορά και την ποιότητα και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αυτών (Ellis 2006).

Η λειτουργική δομή μιας πρωτεΐνης είναι μία από τις πολυάριθμες μορφές που μπορούν να υιοθετηθούν από ένα πολυπεπτίδιο μήκους μερικών εκατοντάδων αμινοξέων. Οι μερικώς μη λειτουργικές δομές των μη ώριμων πρωτεϊνών μπορούν να προκληθούν σε δύο περιπτώσεις: κατά τη διάρκεια κ αμέσως μετά τη σύνθεση των πρωτεϊνών, ή μετά από αποσταθεροποίηση μιας ώριμης πρωτεΐνης. Επίσης, η δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών μπορεί να αλλάξει λόγω λαθών κατά τη μεταγραφή ή τη μετάφραση. Οι καταστάσεις αυτές οδηγούν σε αλλοίωση των πρωτεϊνών, οι οποίες ‘μαρκάρονται’ μέσω της συμπικουτινίωσης και στη συνέχεια οδηγούνται στα πρωτεασώματα για αποικοδόμηση (Glickman and Ciechanover 2002). Βέβαια, η ακρίβεια με την οποία τα κυτταρικά συστήματα επιτυγχάνουν να αναγνωρίσουν τις λανθασμένες δομές και η ικανότητα με την οποία μπορούν να διαχωρίσουν τις πρωτεΐνες αγρίου τύπου που παροδικά βρίσκονται σε κατάσταση εσφαλμένης αναδίπλωσης από τις πρωτεΐνες που έχουν εσφαλμένη αναδίπλωση λόγω μετάλλαξης, δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως ακόμα. Τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι μοριακοί συνοδοί συχνά θεωρούνται ανταγωνιστές των πρωτεασών καθώς και οι δύο αυτές κατηγορίες ενζύμων αναγνωρίζουν αποσταθεροποιημένες πρωτεΐνες (Tomala and Corona, 2008). Η επικρατέστερη υπόθεση είναι ότι οι μοριακοί συνοδοί συνεργάζονται ενεργητικά με το σύστημα αποικοδόμησης του πρωτεασώματος στην επιλογή δομικά ασταθών πρωτεϊνών που τελικά θα αποικοδομηθούν (Esser et al 2004, Arndt et al 2007).

Οι μοριακοί συνοδοί απαντώνται συνήθως σε μεγάλη αφθονία μέσα στα κύτταρα και πολύ πιθανόν να προσδένονται παροδικά σε ελαττωματικές πρωτεΐνες προάγοντας την αναδίπλωσή τους και παρεμποδίζοντας έτσι την αποικοδόμησή τους (Wickner et al 1999). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ειδικότερα, οι μοριακοί συνοδοί, που είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογοι με τους αντίστοιχους των βακτηρίων, είναι περισσότεροι σε αριθμό. Επίσης, είναι πιο εξειδικευμένοι και μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: αυτοί που είναι ενεργοί σε συνθήκες καταπόνησης και αυτοί που συσχετίζονται με την παραγωγή και ωρίμανση νέων πρωτεϊνών. Δηλαδή μπορούμε να πούμε ότι η πρώτη κατηγορία συσχετίζεται με την απόκριση σε καταστάσεις καταπόνησης, ενώ η δεύτερη με την ένταση της μετάφρασης (Albanese et al 2006).

Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 20 διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών με την ιδιότητα του μοριακού συνοδού, οι οποίες είναι συντηρημένες σε όλο το σύνολο των

προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Μείζονος σημασίας αποτελούν οι οικογένειες μοριακών συνοδών που επάγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης και κυρίως θερμικής καταπόνησης. Ονομάζονται ‘θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες’ (HSPs) και χωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Περιλαμβάνουν τις HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 (chaperonins), HSP40 και τις μικρού μοριακού βάρους θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες sHSPs (Εικόνα 1). Η κάθε HSP οικογένεια αναγνωρίζει συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ανώριμη, ασταθής ή και κατεστραμμένη κατάσταση. Οι οικογένειες των HSP60, HSP70 και HSP90 εκτός από τη συνεχή τους συμμετοχή στην αναδίπλωση και ωρίμανση των πρωτεϊνών, διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φαινοτυπικής ποικιλότητας. Από την άλλη, οι μικρές HSPs και οι HSP100 κυρίως εμπλέκονται στην επανάκτηση των πρωτεϊνών μετά από καταστάσεις καταπόνησης (Rutherford, 2003). Οι καλύτερα μελετημένες και κατανοητές οικογένειες, από άποψη λειτουργίας του μηχανισμού δράσης, είναι οι HSP70 και HSP60. Αυτοί οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με μη ή μερικώς αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια και προσδένονται σε εκτεθειμένες υδροφοβικές περιοχές μέσα στις πρωτεΐνες αποτρέποντας τη συσσωμάτωσή τους και διατηρώντας τις σε μία δυναμική κατάσταση αναδίπλωσης μέχρι την απελευθέρωσή τους. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας ειδικά για τα αναπτυσσόμενα πολυπεπτίδια που αναδύονται από το ριβόσωμα (Dobson 2003).

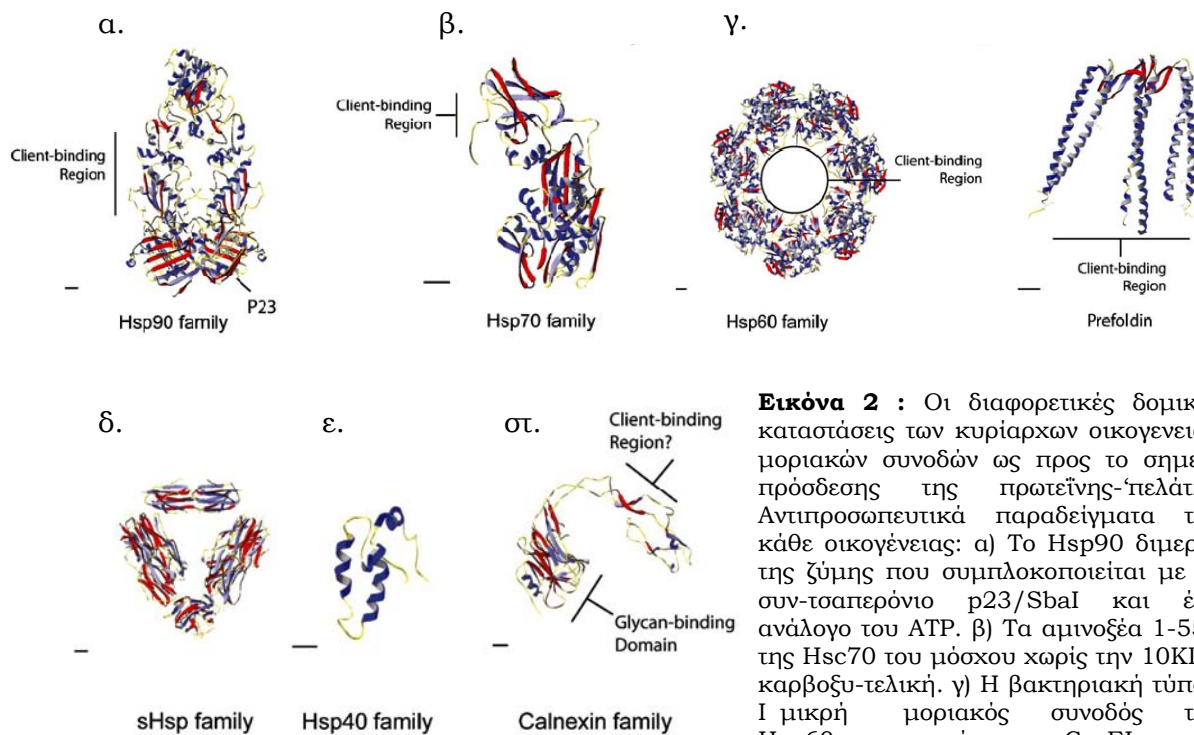
Hsp Οικογένεια			
Οικογένεια (MB)	Προκαρυώτες	Ευκαρυώτες	Λειτουργία
Hsp10 (10KDa)	GroES	Hsp10	Συν-τσαπερόνιο της Hsp90
Hsp40 (40KDa)	DnaJ	Hsp40	Συν-τσαπερόνιο της Hsp70
Hsp60 (60KDa)	GroEL	Hsp60, TRiC	Υποβοήθηση στην αναδίπλωση πρωτεϊνών
Hsp70 (70KDa)	DnaK	Hsp70, Hsc70, Hsp110	Υποβοήθηση στην αναδίπλωση πρωτεϊνών και εμπλοκή στη μεταφορά πρωτεϊνών σε οργανίδια
Hsp90 (90KDa)	HtpG	Hsp83, Hsp89, Hsp90	Σταθεροποίηση λανθασμένα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών και διάσωση της λειτουργίας πρωτεϊνών μετάδοσης σήματος όπως υποδοχείς ορμονών
Hsp100 (100KDa)	ClpA, ClpB, ClpX	Hsp104	Ρυθμίζει την πρωτεϊνική συσσώρευση και την θερμοανθεκτικότητα

Εικόνα 1: Κατηγοριοποίηση των Hsps με βάση το μοριακό τους βάρος

Η κάθε οικογένεια μοριακών συνοδών αναγνωρίζει ποικίλες ενδιάμεσες καταστάσεις μη ορθών πολυπεπτιδίων και η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών της κάθε οικογένειας με τις πρωτεΐνες - “πελάτες” συμβαίνει μέσω διαφορετικών μηχανισμών πρόσδεσης (Εικόνα 2). Οι HSP70 πρωτεΐνες προσδένονται σε περιοχές πεπτιδίων με συγκεκριμένη θέση και μοτίβο υδροφοβικών καταλοίπων σχηματίζοντας έναν ‘σφιγκτήρα’ στην περιοχική αλληλεπίδρασης (Jiang et al 2005). Σε αντίθεση, οι Hsp60 διευκολύνουν την αναδίπλωση εσωκλείοντας τα μη ορθά πολυπεπτίδια σε μία κεντρική κοιλότητα μιας δακτυλιοειδούς κατασκευής που σχηματίζεται από όμοιες ή εξαιρετικά συγγενικές συμμετρικές υπομονάδες (Rye et al 1999).

Αντίθετα με τους καλά χαρακτηρισμένους μοριακούς συνοδούς, όπως η HSP60 και η HSP70, η HSP90 δεν εμπλέκεται στην κανονική αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Nathan et al., 1997). Η HSP90 αναγνωρίζει επιφανειακά υδροφοβικά χαρακτηριστικά που απαντώνται μόνο σε έναν περιορισμένο αριθμό σχεδόν ώριμων αλλά δομικά ασταθών πρωτεϊνών που συμμετέχουν, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες,

σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Αν και οι HSP60 και οι HSP70 αναδιπλώνουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες-στόχους, οι HSP90 στοχεύουν κυρίως υψηλά ειδικευμένους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου καθώς και ρυθμιστές της ανάπτυξης όπως για παράδειγμα κινάσες και συγκεκριμένες τάξεις μεταγραφικών παραγόντων (Richter and Buchner, 2001). Δηλαδή, οι HSP90 επιδεικνύουν μία ξεκάθαρη και εκλεκτική επιλεκτικότητα ως προς τον τύπο των πρωτεϊνών-‘πελατών’ (client-proteins) που συνοδεύουν. Ανάμεσα στο πλήθος των πρωτεϊνών-‘πελατών’ συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες τόσο δομικά όσο λειτουργικά διαφορετικές μεταξύ τους: τελομεράσες (Holt et al 1999), ο οργανωτής αυξίνης N-WASP (Park et al 2005), η συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (Garcia-Cardena et al 1998) αλλά και ένα εύρος υποδοχέων ορμονών, που εκδηλώνουν τη δράση τους στον πυρήνα των κυττάρων (Pratt and Toft 2003). Επίσης, έχει χαρακτηριστεί μια πληθώρα πρωτεϊνών με δράση κίνησης με τις οποίες οι HSP90 αλληλεπιδρούν (Pearl 2005). Βέβαια, ακόμα και μέσα στον ίδιο πληθυσμό πρωτεϊνών-‘πελατών’ που είναι λειτουργικά συγγενείς μπορεί να υπάρχει υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας, δηλαδή πρωτεΐνες με υψηλή ομολογία να εξαρτώνται εντελώς διαφορετικά από τις HSP90 για την ενεργοποίησή τους.



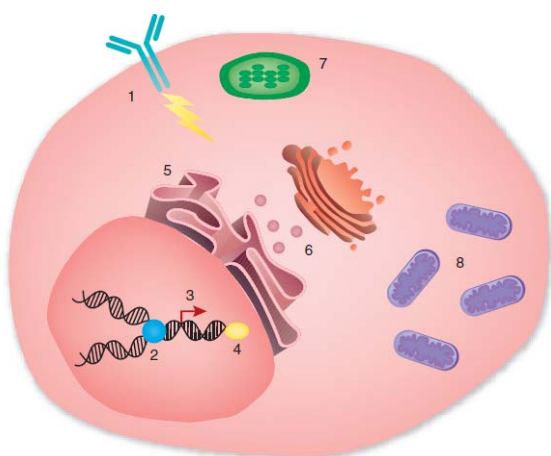
Εικόνα 2 : Οι διαφορετικές δομικές καταστάσεις των κυρίαρχων οικογενειών μοριακών συνοδών ως προς το σημείο πρόσδεσης της πρωτεΐνης-‘πελάτη’. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της κάθε οικογένειας: α) Το Hsp90 διμερές της ζύμης που συμπλοκοποιείται με το συν-τοαπερόνιο p23/SbaI και ένα ανάλογο του ATP. β) Τα αμινοξέα 1-554 της Hsc70 του μόσχου χωρίς την 10KDa καρβοξυ-τελική. γ) Η βακτηριακή τύπου I μικρή μοριακός συνοδός της Hsp60 οικογένειας, GroEL, που αποτελείται από δύο

ομοιοεπταμερικούς δακτυλίους. δ) Η εξαμερής δομή ενός αρχαίου ομολόγου της πρεφολντίνης. ε) Η δωδεκαμερής δομή της Hsp16.3 από το βακτήριο *Mycobacterium Tuberculosis* στην οποία είναι εμφανή οι διμερείς υπομονάδες. στ) Η δομή της περιοχής βιοφωτισμού της καλεξίνης (Kosmaoglou et al 2008).

1.α.1. Το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού

Οι HSP90 πρωτεΐνες απαντώνται σε πολύ μεγάλη αφθονία στα κύτταρα των οργανισμών, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, καθώς αποτελούν το 1-2% των συνολικών διαλυτών κυτταρικών πρωτεϊνών (Lai et al 1984). Η οικογένεια των HSP90 μοριακών συνοδών είναι ευρέως διαδεδομένη από τους κατώτερους ευκαρυώτες μέχρι την κορυφή της ιεραρχίας, τον άνθρωπο. Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSP) 90 ανακαλύφθηκαν αρχικά ως πρωτεΐνες των οποίων η συγκέντρωσή τους αυξάνεται

κάτω από την επίδραση θερμικού σοκ. Αν και ο όρος 'θερμοεπαγόμενος' ταιριάζει απόλυτα στις υπόλοιπες πρωτεΐνες της μεγάλης οικογένειας των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, όσον αφορά τις HSP90 είναι σχετικά ασύμφωνος. Στους περισσότερους, αν όχι σε όλους, τους οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους, οι HSP90 βρίσκονται σε εξαιρετική αφθονία και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, με την επαγωγή τους να μην ξεπερνά σε αύξηση μερικές τάξεις μεγέθους. Έχει εκτιμηθεί ότι οι HSP90 αποτελούν περίπου το 1% του πρωτεώματος μη καταπονημένων κυττάρων, το οποίο τις κατατάσσει μέσα στις πιο άφθονες πρωτεΐνες των οργανισμών (Lai et al 1984). Παρ' όλα αυτά όμως, οι HSP90 θεωρούνται ένα άκρως εξειδικευμένο σύστημα μοριακών συνοδών. Αυτό που τις ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα συστήματα είναι το γεγονός ότι συσχετίζονται με πρωτεΐνες-κλειδιά που είναι ικανές να επάγουν μονοπάτια ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των οργανισμών. Το εύρος των πρωτεϊνών-στόχων των HSP90 περιλαμβάνει υποδοχείς στεροειδών ορμονών, πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια μετάδοσης μηνυμάτων και αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (Calderwood et al., 2006). Πρόσφατες έρευνες που έγιναν στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* παρέχουν στοιχεία που επιδεικνύουν ότι σχεδόν το 10% του πρωτεώματος της ζύμης αλληλεπιδρά με την HSP90 μέσω φυσικού, γενετικού ή χημικού μηχανισμού, δημιουργώντας έτσι ένα δυναμικό δίκτυο στα μονοπάτια μετάδοσης σήματος και στις κυτταρικές δραστηριότητες (Zhao et al., 2005). Επίσης, μεγάλο ποσοστό από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την HSP90 στη ζύμη ανήκουν στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων, αποτέλεσμα που υποδηλώνει την επίδραση που ασκεί η HSP90 στη γενική γονιδιακή έκφραση του οργανισμού. Τυπικά, η HSP90 μέσω μίας ATP-εξαρτώμενης κατάστασης εξασφαλίζει μια δυναμική κατάσταση για τις σχεδόν ασταθείς πρωτεΐνες πριν σταθεροποιηθούν από αλλαγές στη διαμόρφωσή τους (Mayer και Bukau, 1999; Picard, 2002).



Εικόνα 3: Κυτταρικές διαδικασίες εξαρτώμενες από την HSP90. Έχει δείχθει ότι οι HSP90 συμμετέχουν στα ακόλουθα κυτταρικά συστήματα: 1. μονοπάτια μεταγωγής σήματος (όπως υποδοχείς, κινάσες, ογκογονίδια/προ-ογκογονίδια και μιτογονικά μονοπάτια), 2. αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, 3. μεταγραφή, 4. διατήρηση των τελομερών, 5. εισαγωγή και ποιοτικός έλεγχος μέσα στον εκκριτικό μηχανισμό, 6. έλεγχος των κυστικών εκκρίσεων του εκκριτικού μηχανισμού, 7. εισαγωγή μέσα στους χλωροπλάστες, 8. αναδιπλώση στα μιτοχόνδρια (Richter et al., 2007).

Οι HSP90 είναι μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών. Στον άνθρωπο, οι δύο ισόμορφες α και β παρουσιάζουν 60 και 40% ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο με τις ομόλογες στη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*) και στο βακτήριο *Escherichia coli* αντίστοιχα. Επίσης, έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα αρκετών ευκαρυωτικών οργανισμών όπως η ζύμη (Lounion et al, 1996), η *C. elegans* (Birnbay et al 2000) και η *Drosophila* (Yue et al 1999). Στους προκαρυώτες, οι HSP90 συμβάλλουν περισσότερο βοηθητικά. Στο *E.coli* συμβάλλουν στην κανονική λειτουργία του οργανισμού σε όλες τις θερμοκρασίες ανάπτυξης (Bardwell and Craig 1988) και έχει δείχθει ότι διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη θερμοανθεκτικότητα των κυανοβακτηρίων (Tanaka and Nakamoto 1999). Γονίδια της οικογένειας των *Hsp90* έχουν επίσης απομονωθεί από αρκετά φυτικά είδη όπως η ντομάτα, το καλαμπόκι, η ελαιοκράμβη, η σίκαλη, το *Catharanthus* και το *Arabidopsis*.

Συγκρίσεις μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών των φυτικών HSP90 και ακολουθιών προερχόμενων από ομόλογα ζύμης ή ζώων, έδειξαν ομοιότητες που κυμαίνονταν μεταξύ 63-71%, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων φυτικών HSP90 ανέδειξαν 88-93% ομοιότητα (Krishna and Gloor 2001). Όσον αφορά την παρουσία των HSP90 πρωτεϊνών σε κυτταρικά οργανίδια, έχει βρεθεί ότι στον άνθρωπο, το ενδοπλασματικού δικτύου (ER) ομόλογο Grp94, που ονομάζεται επίσης και gp96, και το προκαρυωτικό μιτοχονδριακό ομόλογο Trap1, παρουσιάζουν ποσοστά ομολογίας της τάξης του 49 και 35% όμοια με τις αντίστοιχες κυτταροπλασματικές μορφές (Picard D, 2002).

Στο *Arabidopsis thaliana*, έχουν χαρακτηριστεί 7 γονίδια της οικογένειας των *Hsp90*. Τα κυτταροπλασματικά μέλη (*Hsp90.1*, *Hsp90.2*, *Hsp90.3* και *Hsp90.4*) παρουσιάζουν μεταξύ τους ποσοστό ομολογίας της τάξης του 85% σε αμινοξικό επίπεδο, σε αντίθεση με τα οργανιδιακά μέλη (*Hsp90.5*, *Hsp90.6* και *Hsp90.7*) που παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας της τάξης του 45% (Krishna and Gloor 2001) (Εικόνα 3). Η μεγάλη ομοιότητα που χαρακτηρίζει τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας μπορεί πιθανώς να οδηγεί και σε αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες, χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί μέσω της μελέτης T-DNA μεταλλαγμάτων για καθένα από τα τέσσερα μέλη (Samakonli et al., 2007). Ενώ στο *Arabidopsis* κανένα μετάλλαγμα για καθένα από τέσσερα γονίδια ξεχωριστά δεν είναι θανατογόνο, μετάλλαξη σε άλλους οργανισμούς που περιέχουν μόνο ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για HSP90 πρωτεΐνη προκαλεί θνησιμότητα (Rutherford και Lindquist, 1998). Παρόλο που η δράση που ασκούν οι HSP90 πρωτεΐνες στο *Arabidopsis* είναι παρόμοια με αυτή των ομόλογών τους στα ζωικά συστήματα, ο υψηλός αριθμός των κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας υποδηλώνει ότι η ακτίνα στην οποία δρουν είναι ακόμα μεγαλύτερη.

	AtHsp90.1	AtHsp90.2	AtHsp90.3	AtHsp90.4	AtHsp90.5	AtHsp90.6	AtHsp90.7
AtHsp90.1	100	80	50	70	90	80	30
AtHsp90.2		100	60	70	80	60	20
AtHsp90.3			100	40	70	50	10
AtHsp90.4				100	80	60	20
AtHsp90.5					100	80	80
AtHsp90.6						100	90
AtHsp90.7							100

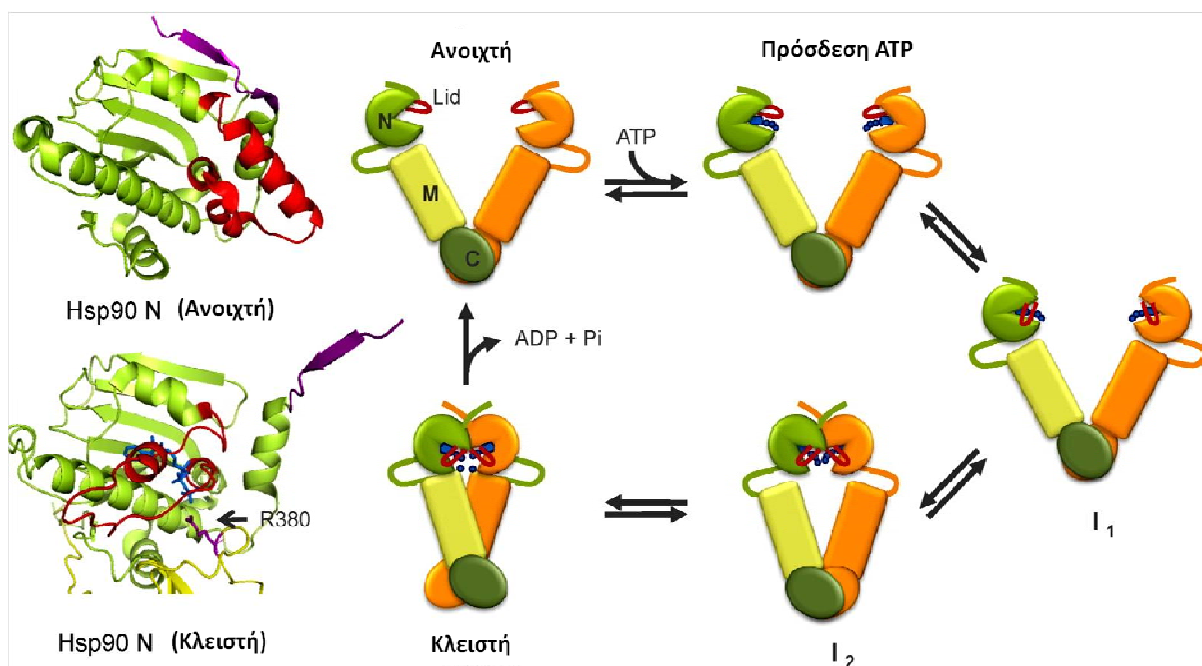
Εικόνα 4: Ποσοστό % ομολογίας σε αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των μελών της οικογένειας των Hsp90 γονιδίων (Krishna and Gloor 2001) .

1.α.2. Δομικές ιδιότητες



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δομικής διαμόρφωσης της Hsp90 στη ζύμη. Η περιοχή που ενώνει την N-τελική με την C-τελική περιοχή ποικίλει αρκετά τόσο σε μέγεθος όσο και σύνθεση μεταξύ των ειδών (Pearl και Prodromou 2006).

Η υψηλά συντηρημένη δομή της πρωτεΐνης HSP90 αποτελείται από τις παρακάτω διακριτές περιοχές: την αμινο-τελική (N-τελική) περιοχή πρόσδεσης του ATP, τη μεσαία περιοχή πρόσδεσης των πρωτεϊνών-τελατών' και την καρβόξυ-τελική (C-τελική) περιοχή όπου είναι η περιοχή διμερισμού (Εικόνα 4). Με εξαίρεση τις HtrG (*E.coli*) και TRAP1 (άνθρωπος), η N-τελική και μεσαία περιοχή συνδέονται μεταξύ τους με έναν φορτισμένο σύνδεσμο και στην C-τελική περιοχή περιέχεται το πενταπεπτιδίο MEEVD που είναι το σημείο πρόσδεσης των TPR επαναλαμβανόμενων περιοχών (TPR repeats) οι οποίες απαντώνται σε πολλά συν-τσαπερόνια που αποτελούν βοηθούς των μοριακών συνοδών (Pratt et al 2004). Ενώ η C-τελική περιοχή είναι απαραίτητη για το δομικό διμερισμό της HSP90, η N-τελική περιοχή υπόκειται παροδικό διμερισμό καθοδηγούμενη από την πρόσδεση του ATP. Πρόσφατα, ένα μοντέλο κινητικής πραγματικού χρόνου βασισμένο στο μηχανισμό FRET (Fluorescent resonance energy transfer) πρότεινε πέντε ενδιάμεσες καταστάσεις που πιθανόν να αντιπροσωπεύουν τα ποικίλα στάδια του κύκλου της HSP90 στη ζύμη (Hahn et al., 2009) (Εικόνα 5). Η πρόσδεση του ATP στο ανοικτό διμερές οδηγεί σε περιστροφή περίπου 120° της περιοχής 'lid' που αποτελείται από τα αμινοξέα 94-125, με αποτέλεσμα η περιοχή 'lid' να σκεπάσει την περιοχή πρόσδεσης του ATP (κατάσταση I1). Στη συνέχεια, η αλλαγή της χωροθέτησης της περιοχής 'lid' προκαλεί την ανταλλαγή των αμινο-τελικών β-αλυσίδων κάθε μονομερούς, καταλήγοντας στην ακριβή ένωση των N-τελικών περιοχών (Κατάσταση I2).



Εικόνα 5: Ο ATP κύκλος του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού. Εκτίμηση των πέντε πιθανών ενδιάμεσων σταδίων του διμερούς με τη βοήθεια μοντέλων κινητικής. Η πρόσδεση του ATP επάγει την εναπόθεση της περιοχής 'lid' (απεικονίζεται με κόκκινο) μέσα στην περιοχή πρόσδεσης του ATP (διαμόρφωση I1) και την ανταλλαγή των N-τελικών προεξέχοντων αλυσίδων κάθε μονομερούς (διαμόρφωση I2). Περαιτέρω αλλαγές στη διαμόρφωση οδηγούν στη συμπίεσμένη και σπειροειδή κλειστή διαμόρφωση. Επίσης, στα αριστερά απεικονίζονται οι ανοικτές και κλειστές κρυσταλλικές δομές της HSP90 με την περιοχή 'lid' να απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και οι προεξέχοντες N-τελικές αλυσίδες να απεικονίζονται με μωβ (Hahn et al., 2009).

Ο διμερισμός των N-τελικών περιοχών ακολουθείται από περισσότερες αλλαγές στη διαμόρφωση, οδηγώντας σε μία συμπίεσμένη σπειροειδή δομή (Ali et al 2006). Σε αυτή την κλειστή κατάσταση, ο καταλυτικός βρόγχος της κεντρικής περιοχής

αλληλεπίδρα με τη 'lid' περιοχή επιτρέποντας την αλληλεπίδραση της ενεργής περιοχής, που ονομάζεται Arg380, με τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP, οδηγώντας στην υδρόλυση του β-γ-φωσφοδιεστερικού δεσμού του ATP. Η υδρόλυση του ATP επαναφέρει την HSP90 σε ανοικτή διαμόρφωση με αποσυνδεδεμένες τις N-τελικές περιοχές και ελεύθερη την περιοχή 'lid'. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση που περιλαμβάνονται στον κύκλο ATP της HSP90 λαμβάνουν χώρα σχετικά αργά, σημειώνοντας τη διακίνηση ενός μορίου ATP κάθε λεπτό για την HSP90 στη ζύμη (Panaretou et al 1998). Μελέτες έχουν δείξει ότι μερικά συν-τσαπερόνια της HSP90 ρυθμίζουν τον κύκλο της στοχεύοντας στις ενδιάμεσες καταστάσεις της. Ο ATP κύκλος της HSP90 είναι απαραίτητος για τη λειτουργία της στη ζύμη, υποδηλώνοντας ότι το άνοιγμα και το κλείσιμο του διμερούς σχετίζεται υψηλά με την αναδίπλωση ή την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών-΄πελατών΄ της (Hahn 2009).

Όπως είναι φανερό, η HSP90 προκειμένου να λάβει την τελική λειτουργική της διαμόρφωση, υπόκειται μια πληθώρα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν τη λειτουργία της. Ανάμεσα σε αυτές, εκτός από τον ATP κύκλο, είναι η υπερφωσφορυλίωση καταλοιπίων σερίνης και θρεονίνης που έχει δείχθει ότι ρυθμίζουν αρνητικά τη λειτουργία της (Zhao et al., 2005) και αποφωσφορυλίωσή της από την φωσφατάση Ppt1 στη ζύμη (Wandinger et al., 2006). Αν και έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά σημεία φωσφορυλίωσης, ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους (Ogiso et al., 2004).

Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί ότι ρυθμίζει τη λειτουργία της HSP90 είναι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις μέσω ακετυλίωσης (Scroggins et al., 2007), μιας και αναστολές της δράσης των αποακετυλασών ιστονών προκαλούν αναστολή στη λειτουργία της HSP90. Επίσης, έχει βρεθεί και η περιοχή στη νουκλεοτιδική της αλληλουχία που υπόκειται ακετυλίωση. Μετάλλαξη στη συγκεκριμένη περιοχή, που ονομάζεται K294, αποκαλύπτει ότι η ακετυλίωση της συγκεκριμένης περιοχής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση τόσο των πρωτεϊνών-στόχων όσο και των βοηθητικών παραγόντων.

1.α.3. Βοηθητικοί παράγοντες

TPR-μοτίβου πρωτεΐνες

Μέσα στα κύτταρα των οργανισμών η HSP90 λειτουργεί ως το κύριο συστατικό μίας δυναμικής οργάνωσης πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, περιλαμβάνοντας μια πληθώρα βοηθητικών παραγόντων, από τους οποίους έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 12. Οι βοηθητικοί παράγοντες χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με το πώς αλληλεπιδρούν με την HSP90, πώς επηρεάζουν τον ATP κύκλο της και πώς επιδρούν στην πρόσδεση του κάθε υποστρώματος.

Η μεγαλύτερη κατηγορία βοηθητικών παραγόντων που έχει προσδιοριστεί και ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα είναι οι TPR-μοτίβου πρωτεΐνες. Οι παράγοντες αυτοί περιέχουν στην ενεργή δομή τους μια ελικοειδή διαμόρφωση, που σχηματίζεται από επαναλήψεις δομών φουρκέτας 34 αμινοξέων, η οποία προσδέεται στο πενταπεπτιδίο MEEVD του C-τελικού άκρου της HSP90 (Carrello et al 1999). Βέβαια, η παρουσία του μοτίβου σε μια πρωτεΐνη δεν συνεπάγεται αυτόματα στο γεγονός ότι αποτελεί βοηθητικό παράγοντα της HSP90. Πράγματι, τουλάχιστον σε μια ταυτοποιημένη TPR-μοτίβου πρωτεΐνη που συνεργάζεται με την HSP90, τη Sgt1, δεν απαιτείται η χρησιμοποίηση του μοτίβου προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πρόσδεσή της (Lee et al 2004). Οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας αποτελούν μια ιδιαίτερη ομάδα με ελάχιστες βιοχημικές ομοιότητες πέραν του TPR-μοτίβου. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη WISp39 φαίνεται να δρα ως ειδικός παράγοντας ενσωμάτωσης μιας πρωτεΐνης-

“πελάτη” (Jascur et al 2005), ενώ οι πρωτεΐνες Hop/Sti1/p60 και ο υποδοχέας της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου Tom70 φαίνεται να διευκολύνουν την ενσωμάτωση του συμπλόκου της HSP90 σε μεγαλύτερα πολυπρωτεϊνικά συστήματα (Young et al 2003). Αρκετές TPR-μοτίβου πρωτεΐνες έχουν ενσωματωμένες και επιπρόσθετες ενζυμικές λειτουργίες όπως οι ανοσοφιλίνες (immunophilins) Cyp40 και οι FKBP's που είναι πεπτιδο-πρότυλο-ισομεράσες, οι PP5 και Ser/THr που κατέχουν ιδιότητα φωσφατάσης και η CHIP που είναι μια E3/E4 λιγάση ουμπικουτινίωσης (Pearl and Prodromou, 2006).

Παρόλο που ο βιολογικός ρόλος πολλών βοηθητικών παραγόντων στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών- “πελατών” από την HSP90 παραμένει μέχρι και σήμερα συγκεχυμένος, υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τη φύση τόσο των αλληλεπιδράσεων όσο και των πιθανών βιολογικών μηχανισμών. Τρεις διαφορετικοί βοηθητικοί παράγοντες, οι Hop/Sti1, Cdc37 και p23 έχει βρεθεί ότι παίζουν κατασταλτικό ρόλο στον ATP κύκλο της HSP90 και δύο, η Aha1 και η Cpr6, παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση (Panaretou et al 2002).

Παράγοντες θερμικού σοκ (Heat Shock Factors, HSF)

Οι παράγοντες θερμικού σοκ (HSFs) αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές της απόκρισης κάτω από θερμική καταπόνηση στους ευκαρυώτες. Εμπλέκονται στην αντίληψη και σηματοδότηση της καταπόνησης και επίσης συμμετέχουν στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών, περιλαμβάνοντας και την ανάπτυξη. Οι λειτουργικές τους ιδιότητες αποδίδονται στις εξαιρετικά συντηρημένες δομικές περιοχές τους: στην περιοχή πρόσδεσης του DNA και στην περιοχή ολιγομερισμού. Συγκεκριμένα, όταν παρουσιαστούν ερεθίσματα καταπόνησης οι HSFs σχηματίζουν την ομοτριμερή ενεργή μορφή που τους καθιστά ικανούς να προσδεθούν τα στοιχεία θερμικού σοκ (Heat shock elements, HSEs) που βρίσκονται στους προαγωγείς των *hsp* γονιδίων. Στη συνέχεια, όταν η έκφραση των Hsp γονιδίων είναι ικανοποιητική ή έχουν επανέλθει φυσιολογικές συνθήκες, τα ενεργά τριμερή μετατρέπονται ξανά σε ανενεργά μονομερή.

Στα φυτά, οι HSFs αποτελούν υπερικογενεία η οποία χωρίζεται σε τρεις τάξεις: A-, B- και C-. Στο *Arabidopsis* συγκεκριμένα, απαντούνται 15 μέλη της A τάξης και 5 μέλη της B τάξης. Από αυτά, τα μέλη της A τάξης χαρακτηρίζονται ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές των γονιδίων θερμικής καταπόνησης. Ειδικά, οι ATHSFA1a και ATHSFA1b του *Arabidopsis* είναι χαμηλού επιπέδου συνεχόμενα εκφραζόμενες πρωτεΐνες, που ενεργοποιούνται προκειμένου να προσδεθούν στο DNA και να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων θερμικού σοκ αμέσως μετά την εμφάνιση θερμικού σοκ (Yamada et al., 2007).

1.β. Φαινοτυπική πλαστικότητα

1.β.1. Καναλοποίηση

Η ιδέα της καναλοποίησης είναι μια απροσδιόριστη έννοια και ερμηνεύεται διαφορετικά ανάλογα με το επιστημονικό υπόβαθρο του κάθε μελετητή (Gibson and Wagner, 2000). Οι αναπτυξιακοί βιολόγοι, όπως ο Wilkins (1986), ορίζουν την καναλοποίηση ως «η σταθεροποίηση των αναπτυξιακών μονοπατιών μέσω πολλαπλών γενετικών παραγόντων του γενώματος, δημιουργώντας ένα είδος γενετικής ρύθμισης». Η αντίληψη αυτή έρχεται σε συμφωνία με την ερμηνεία εμβρυολόγων, όπως ο Shmalhausen (1986) και ο Waddington (1956), η οποία σχετίζεται με την εκπληκτική σταθερότητα των πολύπλοκων αναπτυξιακών διαδικασιών. Κανένας δεν αρνείται το

γεγονός ότι όντως υπάρχει ένας ρυθμιστικός μηχανισμός ο οποίος συνίσταται από ένα δίκτυο εξαιρετικά ενδιαφέροντων βιοχημικών μηχανισμών που ενορχηστρώνουν τη ρύθμιση αυτή και ότι τα αποτελέσματα της ρύθμισης είναι εμφανή τόσο όταν μελετούνται αναπτυξιακά όσο και από εξελεγκτικά (Gerhart et al., 1997). Βέβαια, όσον αφορά τους γενετιστές που μελετούν την εξέλιξη, αυτοί δίνουν μια πιο περιορισμένη ερμηνεία στον όρο καναλοποίηση. Δηλαδή, ενώ θεωρούν ότι η ρύθμιση αναφέρεται στην ικανότητα να διατηρείται ένα χαρακτηριστικό σταθερό με χαμηλή διακύμανση, θέτουν ερωτήσεις σχετικά με το αν μπορούν τα χαρακτηριστικά να εξελιχθούν ώστε να ποικίλουν ακόμα λιγότερο και πως μπορεί αυτό να γίνει εφικτό (Gibson and Wagner, 2000).

Στη φύση, ένας οργανισμός αγρίου-τύπου που αναπτύσσεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, λόγω της έμφυτης γενετικής του παραλλακτικότητας, έχει την ικανότητα να παράγει φαινοτύπους που να μην επηρεάζονται από περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές. Παρόλα αυτά όμως, κατά την πορεία της εξελικτικής διαδικασίας των οργανισμών, έρχονται στο φως φαινότυποι που αποκλίνουν αρκετά από το φαινοτυπικό μέσο όρο του κάθε οργανισμού. Όπως προαναφέρθηκε, στη δεκαετία του 1950, ο βιολόγος και γενετιστής CH Waddington ήταν από τους πρώτους που ανέφεραν την εμφάνιση αποκλιόντων χαρακτηριστικών στα άτομα ενός πληθυσμού κάτω από συνθήκες περιβαλλοντικού στρες σε ποικίλους οργανισμούς (Waddington, 1942; 1953; 1956). Το αξιοσημείωτο των χαρακτηριστικών αυτών είναι ότι η εμφάνισή τους ανεξαρτητοποιείται και μπορούν να εμφανίζονται ακόμα και όταν έχει πλέον εκλείψει η αιτία που τα προκάλεσε. Στην προσπάθειά του ο Waddington να εξηγήσει την προφανή κληρονομία των χαρακτηριστικών αυτών, που παρουσιάστηκαν αρχικά λόγω περιβαλλοντικών διαταράξεων, πρότεινε την παρακάτω υπόθεση. Τα χαρακτηριστικά αυτά, που εμφανίζονται κάτω από ειδικές συνθήκες, βρίσκονται κάτω από διαρκή έλεγχο εναντίον των ποικίλων περιβαλλοντικών διαταραχών και εσωτερικών γενετικών πολυμορφισμών και κυμαίνονται σε ανεκτά επίπεδα για τον οργανισμό. Η υπόθεση αυτή ονομάστηκε 'καναλοποίηση' (canalization). Έχει προταθεί ότι η 'καναλοποίηση' μέσω της φυσικής επιλογής σταθεροποιεί τους φαινοτύπους και μειώνει την ποικιλομορφία τους. Η κατάσταση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της έκφρασης αρκετών χαρακτηριστικών, κατορθώνοντας έτσι η καναλοποίηση να διατηρεί τις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης για τον οργανισμό παρ' όλες τις περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές. Όταν όμως διαταράσσεται η ρυθμιστική ικανότητα των οργανισμών λόγω ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών, τότε μπορεί να αλλοιωθεί ο 'καναλοποιημένος' φαινότυπος και να αποκαλυφθούν φαινότυποι που δεν εμφανίζονταν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα χαρακτηριστικά που αποκαλύπτονται είναι κληρονομήσιμα και αφομοιώνονται γενετικά ακόμα και όταν δεν υπάρχει γενετική βάση πίσω από την εμφάνισή τους (Waddington, 1953, 1956; Sollars et al., 2003; Sato και Siomi, 2010).

Είναι φανερό ότι κάθε διαδικασία που μειώνει το ποσοστό της παραλλακτικότητας ενός χαρακτηριστικού, μειώνει και την ικανότητα του οργανισμού για εξέλιξη ως προς το χαρακτηριστικό αυτό, αφού ο ρυθμός της εξέλιξης κάτω από φυσική επιλογή είναι ανάλογος με την ποσότητα της προστιθέμενης γενετικής ποικιλότητας (Fisher, 1930). Βραχυπρόθεσμα λοιπόν, η καναλοποίηση τείνει να μειώσει την ικανότητα για εξέλιξη των επηρεασμένων χαρακτηριστικών, ενώ μακροπρόθεσμα, μπορεί να συνεισφέρει στην εξελικτική σταθερότητα (Gibson and Wagner, 2000). Από την άλλη μεριά όμως, η καναλοποίηση έχει την ικανότητα να αυξάνει ενδεχομένως την εμφάνιση φαινοτυπικών διαφοροποιήσεων κατά την εξελικτική διαδικασία. Δηλαδή, παρόλο που μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης νέων χαρακτηριστικών στον οργανισμό, συγχρόνως επιτρέπεται η σταδιακή εμφάνιση χαρακτηριστικών που ήταν ανέκιστα να αποκαλυφθούν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η κληρονομούμενη παραλλακτικότητα θεωρείται ότι κατέχει κυρίαρχη θέση στις εξελικτικές διαδικασίες, με την καναλοποίηση

να καταλαμβάνει το ρόλο του κεντρικού εκφραστή της. Βέβαια, θα πρέπει να υπάρχει και ένας μηχανισμός ικανός διεκπεραιώνει το έργο αυτό. Οι Meiklejohn και Hartl (2002), προτείνουν την ιδέα του εξελικτικού ρυθμιστή ή αλλιώς «επαγόμενου διοικητή» (inducible canalizer). Με τους όρους αυτούς προσπαθούν να χαρακτηρίσουν μηχανισμούς που επάγονται όταν οι οργανισμοί βρίσκονται κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και τους παρέχουν τη δυνατότητα να αποκαλύψουν γενετικά χαρακτηριστικά που ήταν ανίκανα να εμφανιστούν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να προσαρμοσθούν και να κληρονομηθούν. Ως ένας τέτοιου είδους ρυθμιστικός μηχανισμός έχει προταθεί ότι λειτουργεί το σύστημα μοριακού συνοδού των HSP90 πρωτεϊνών (Rutherford και Lindquist, 1998). Συμπερασματικά, έρευνες έχουν δείξει ότι το σύστημα μοριακού συνοδού των HSP90 πρωτεϊνών έχει την ικανότητα να λειτουργήσει ως ρυθμιστής εναντίον πληθώρας περιβαλλοντικών και γενετικών διαταράξεων που επηρεάζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού, λειτουργώντας έτσι σαν ένα καθολικό σύστημα που περιορίζει τις όποιες πιθανές φαινοτυπικές αποκλίσεις του οργανισμού αυτού (Samakovli et al., 2007).

1.β.2. Στοχαστικότητα

Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, η ρύθμιση των μονοπατιών της ανάπτυξης, του μεταβολισμού και η πρόοδος ενός οργανισμού μέσω του κυτταρικού κύκλου οργανώνονται με τη βοήθεια πολύπλοκων δικτύων βιοχημικών αντιδράσεων. Μέσα σε αυτά τα ρυθμιστικά δίκτυα, η γενετική δραστηριότητα ελέγχεται με μοριακά μηνύματα τα οποία καθορίζουν πότε και πόσο συχνά το κάθε γονίδιο θα μεταγραφεί. Βέβαια, υπάρχουν και συμπληρωματικά μηνύματα που μπορεί να προέρχονται είτε από το περιβάλλον (εξωτερικά ερεθίσματα), είτε από άλλα κύτταρα μέσα στον οργανισμό (εσωτερικά ερεθίσματα). Τα μηνύματα αυτά έχουν την ικανότητα να επιδρούν πάνω στις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν ή και να κατευθύνουν τις μελλοντικές κυτταρικές διαδικασίες. Μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως ρυθμιστής σε μια αναπτυξιακή διαδικασία δεν είναι απαραίτητο ότι λειτουργεί αποκλειστικά και μόνο στη διαδικασία αυτή. Πολύ πιθανό να λειτουργεί σε συνδυασμό και με άλλα εσωτερικά ή εξωτερικά μηνύματα ώστε να ελέγχει πολλά περισσότερα γονίδια και διαδικασίες, γεγονός που υποδεικνύει πόσο πολύπλοκα και περιπλεγμένα δίκτυα αλληλεπιδράσεων είναι δυνατό να υπάρχουν. Σε αυτά τα δίκτυα, μια πρωτεΐνη μπορεί να ελέγχει γονίδια που παράγουν άλλους ρυθμιστές, οι οποίοι με τη σειρά τους ελέγχουν άλλα γονίδια και ούτω καθ' εξής (McAdams και Arkin, 1997).

Στα βιοχημικά ρυθμιστικά δίκτυα, τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των διαδοχικών γεγονότων καθορίζονται από τις αναπόφευκτες καθυστερήσεις κατά την αφομοίωση ή μείωση των συγκεντρώσεων των διαφόρων προϊόντων της κάθε διεργασίας. Τα περισσότερα δίκτυα συνδέονται γενετικά μιας και η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ενός δικτύου μπορεί να ελέγχει την έκφραση γονιδίων του ίδιου ή και διαφορετικών δικτύων. Η χρονική καθυστέρηση σε αυτά τα συνδεδεμένα γενετικά δίκτυα εξαρτάται από το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει μια πρωτεΐνη στην απαιτούμενη συγκέντρωση προκειμένου να μπορέσει να ασκήσει έλεγχο στα επόμενα γονίδια ή μονοπάτια που ακολουθούνται. Αντιστρόφως, η χρονική καθυστέρηση προκειμένου να απενεργοποιηθεί το γονίδιο και να σταματήσει η παραγωγή της πρωτεΐνης εξαρτάται από το χρόνο που χρειάζεται για να μειωθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάτω από το λειτουργικό όριο. Όμως, γεννάται το ερώτημα του τι είναι αυτό που καθορίζει το χρόνο που απαιτείται προκειμένου να φτάσει μια πρωτεΐνη στη συγκέντρωση ενεργοποίησης και πώς οι διάφορες παρεκκλίσεις του χρόνου αυτού μπορούν να επηρεάσουν τις κυτταρικές διεργασίες μέσα σε έναν οργανισμό. Στην προσπάθειά τους οι ερευνητές να

εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό, πρότειναν την ερμηνεία ότι το πρότυπο της αύξησης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών είναι στοχαστικό, δηλαδή ότι είναι το αποτέλεσμα τυχαίων διαδικασιών (Yarchuk et al., 1992). Με άλλα λόγια μπορεί να ειπωθεί ότι ο μέσος αριθμός των πρωτεϊνών που εκφράζονται από ένα γονίδιο είναι το προϊόν ενός μέσου ρυθμού ενεργοποίησης της μεταγραφής και ενός μέσου αριθμού παραγόμενων πρωτεϊνών ανά μεταγράφημα, καταστάσεις οι οποίες διαφέρουν από κύτταρο σε κύτταρο λόγω της στοχαστικότητας. Οι McAdams και Arkin (1997) προτείνουν ότι η στοχαστικότητα που παρατηρείται σε όλους τους θεμελιώδεις μηχανισμούς της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων, αποτελεί τη γενεσιουργό δύναμη της στοχαστικότητας που παρατηρείται στις κυτταρικές λειτουργίες.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί η διαφορά μεταξύ γενετικής παραλλακτικότητας και στοχαστικών φαινομένων. Λέγοντας γενετική παραλλακτικότητα ενός πληθυσμού εννοούμε τις διαφορές που εμφανίζονται στην έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Η γενετική παραλλακτικότητα αποτελεί βασικό παράγοντα της εξέλιξης αφού δίνει στα άτομα την ικανότητα να προσαρμόζονται στο περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται, συγχρόνως όμως τείνει να διατηρήσει τη φαινοτυπική ομοιομορφία μέσα, για παράδειγμα, σε έναν αυτογονιμοποιούμενο πληθυσμό φυτών. Δηλαδή, το τελικό αποτέλεσμα της γενετικής παραλλακτικότητας οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ γενότυπου και περιβάλλοντος με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό των ακραίων φαινοτυπικών αποκλίσεων. Παράλληλα, κύριο χαρακτηριστικό των οργανισμών αποτελεί και η ύπαρξη στοχαστικών μηχανισμών. Δηλαδή υπάρχουν μηχανισμοί που ορίζουν τη στοχαστική έκφραση των γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός πολυκύτταρου οργανισμού. Τα στοχαστικά αυτά φαινόμενα λαμβάνουν χώρα μέσα στον οργανισμό, δεν εξαρτώνται από το περιβάλλον και έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμορφισμών μέσα σε έναν πληθυσμό. Επίσης, η στοχαστική ανάπτυξη είναι πιο ευέλικτη και είναι αυτή που επιτρέπει την καλύτερη προσαρμογή ενός οργανισμού στις περιβαλλοντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του, δημιουργώντας έτσι μία καινούρια βάση για εξέλιξη (Samakovli et al., 2007).

1.β.3. Καναλοποίηση στη μύγα *Drosophila melanogaster*

Στη *Drosophila*, αρκετά από τα δομικά χαρακτηριστικά του σώματος της επηρεάζονται όταν αλλοιωθεί η λειτουργία των HSP90 μέσω μετάλλαξης, φαρμακευτικής αναστολής ή περιβαλλοντικού στρες. Τα αποτελέσματα της διαταραχής αυτής είναι η εμφάνιση μορφολογικών ανωμαλιών, οι οποίες μάλιστα λαμβάνουν κληρονομήσιμο χαρακτήρα (Rutherford και Lindquist, 1998).

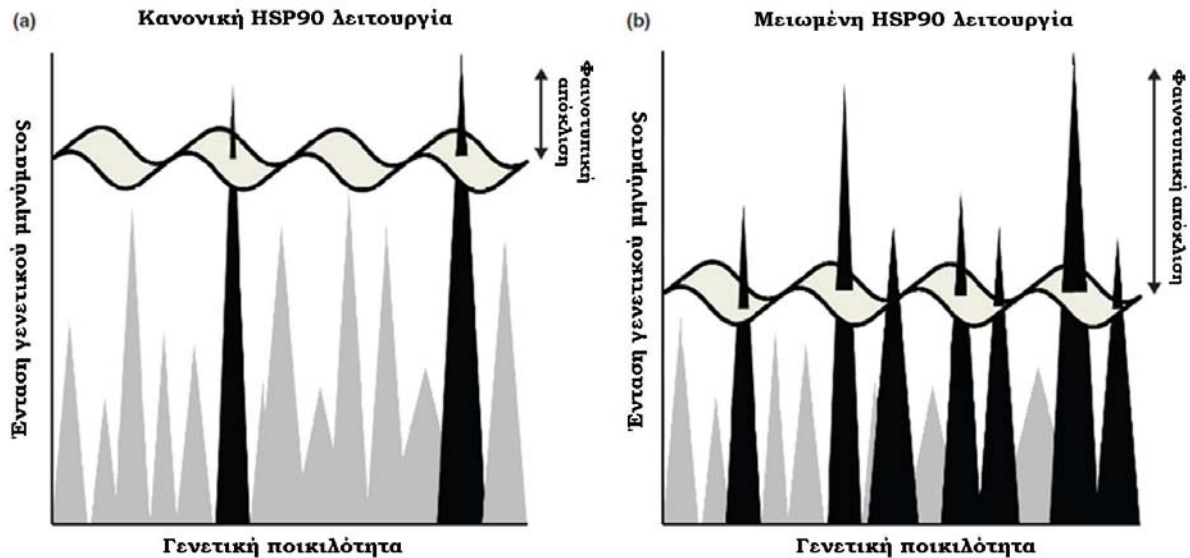
Στη *Drosophila*, ενώ πολλά ποιοτικά χαρακτηριστικά έχουν ένα συγκεκριμένο εύρος διακύμανσης σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, η επακριβής τοποθέτηση των λεπιδωτών και θωρακικών τριχών στο σώμα της μύγας είναι σχεδόν αμετάβλητη τόσο μέσα στον ίδιο πληθυσμό όσο και μεταξύ πληθυσμών και είναι άκρως συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων ειδών μύγας (Simpson et al., 1999). Λόγω αυτής της αυστηρής συντηρητικότητας, ο αριθμός των τριχών αυτών έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για μελέτες μοντέλων καναλοποίησης (Rendel, 1967; Pineiro, 1992). Μεταγενέστερα μοντέλα προτείνουν ότι η γενετική ρύθμιση είναι ένα παραπροϊόν της περιβαλλοντικής καναλοποίησης, το οποίο έχει τη δυνατότητα να εξελιχθεί κάτω από ισχυρή και συνεχή επιλεκτική πίεση (Wagner et al., 1997; Meiklejohn and Hartl, 2002). Τα μοντέλα αυτά προβλέπουν ότι από τη στιγμή που η γενετική και η περιβαλλοντική καναλοποίηση συνδέονται τόσο στενά μεταξύ τους, θα πρέπει να βρίσκονται κάτω από τους ίδιους μηχανισμούς ρύθμισης (Wagner et al., 1997; Eshel

and Matessi, 1998; Ancel and Fontana, 2000; Meiklejohn and Hartl, 2002). Η HSP90 οικογένεια πρωτεϊνών αποτελεί ένα σύστημα που βρίσκεται στο επίκεντρο των επιδράσεων που ασκούν η γενετική ποικιλότητα και οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις και θα μπορούσε αναμενόμενα να θεωρηθεί υποψήφια για τον προαναφερόμενο κοινό μηχανισμό ρύθμισης (Meiklejohn and Hartl, 2002). Η άποψη αυτή υποστηρίζεται και από τους Milton et al. (2006) που μελέτησαν χαρακτηριστικά των τριχών και των φτερών σε μεταλλάγματα *Drosophila* όπου είχε αλλοιωθεί η έκφραση των HSP90 πρωτεϊνών. Παρατήρησαν ότι ενώ ο αριθμός των λεπιδωτών και θωρακικών τριχών στα μεταλλαγμένα έντομα επηρεάστηκε δραματικά από την έλλειψη των HSP90, άλλα χαρακτηριστικά όπως ο κυμαινόμενος εκ φύσεως τύπος των τριχών και το μέγεθος των φτερών αλλά και η εκ φύσεως ασυμμετρία μεταξύ δεξιού και αριστερού φτερού παρέμειναν σχετικά ανεπηρέαστα. Σημαντική παρατήρηση των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων αποτέλεσε το γεγονός ότι τόσο το μέγεθος όσο και η κατεύθυνση της φαινοτυπικής αλλοίωσης δεν μπορούσε να προβλεφθεί, μιας και παρουσιάστηκε τρομερή ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών γεγονότων. Συμπερασματικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού παρουσιάζει ένα είδος εκλεκτικότητας ως προς τα χαρακτηριστικά που ρυθμίζει, προτιμώντας ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται σταθερά και κληρονομούνται αυστηρά στον άγριο πληθυσμό. Η ρυθμιστική εκλεκτικότητα του HSP90 συστήματος ίσως να επιδεικνύει μια συστηματοποιημένη και αναγκαστική διάκριση μεταξύ του βιολογικού ελέγχου που ασκείται στην ποικιλομορφία των αμετάβλητων ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών και του ελέγχου που ασκείται σε πιο ελαστικά ποσοτικά χαρακτηριστικά, μιλώντας πάντα για οργανισμούς που αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες.

Ένα καλά μελετημένο σύστημα που αποδεικνύει ότι το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού θέτει όρια στην εμφάνιση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και είναι το μονοπάτι μετάδοσης σήματος των mitogen-ενεργοποιούμενων κινασών πρωτεϊνών (MAPK) (Koshland et al., 1982; Ferrell, 1996; Rutherford, 2000; Nijhout et al., 2003). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ελάττωση της δράσης της HSP90 πρωτεΐνης σε αγρίου τύπου γενετικά υπόβαθρα επηρεάζει αρκετά μονοπάτια μεταγωγής σήματος αλλοιώνοντας έτσι το μορφολογικό αποτέλεσμα στα άτομα του πληθυσμού και επιτρέποντας την εμφάνιση ανώμαλων χαρακτηριστικών. Στη συνέχεια, μέσο συνεχούς επιλογής, υπάρχει η δυνατότητα της αύξησης της εμφάνισης των χαρακτηριστικών αυτών μέσα στον πληθυσμό. Επίσης, είναι δυνατή η εγκαθίδρυση των χαρακτηριστικών αυτών ξεπερνώντας την αρχική αιτία εμφάνισής τους και πλέον τα χαρακτηριστικά να εκφράζονται ανεξάρτητα της έλλειψης της HSP90. Επομένως, είναι φανερό ότι το σύστημα μοριακού συνοδού της HSP90 όχι μόνο δημιουργεί ένα δίκτυο που ρυθμίζει την καναλοποίηση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στον άγριο τύπο, αλλά τελικά καταστέλλει και την εμφάνιση ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που οδηγούν σε πολυμορφισμούς μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σταθεροποίηση και η κληρονόμηση των μορφολογικών αλλαγών στις επόμενες γενιές, ακόμα και όταν η έκφραση της HSP90 επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα, παρέχοντας μία βάση για εξέλιξη νέων χαρακτηριστικών (Cowen και Lindquist, 2005). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η λειτουργική HSP90 πρωτεΐνη συμπεριφέρεται ως ρυθμιστής των διαδικασιών που ελέγχουν τις αναπτυξιακές διαδικασίες ενός οργανισμού και είναι υπεύθυνη για το τελικό φαινοτυπικό αποτέλεσμα του οργανισμού. Δηλαδή, η HSP90 πρωτεΐνη μέσω της δράσης της διατηρεί σε λανθάνουσα κατάσταση φαινότυπους που αποκλίνουν από τα φυσιολογικά όρια της ανάπτυξης του οργανισμού και τους απελευθερώνει μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Sollars et al., 2003). Η κατάσταση αυτή δίνει τη δυνατότητα στον οργανισμό να διατηρήσει ένα σταθερό φαινότυπο παρ' όλες τις πιθανές γενετικές διαφοροποιήσεις ή περιβαλλοντικές διαταραχές που μπορεί να υποστεί (Waddington, 1953).

Βέβαια, μέχρι και σήμερα η μελέτη του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού στη *Drosophila* είναι πολύπλοκη υπόθεση. Ο λόγος έγκειται σε μελέτες που

έχουν δείξει ότι η ρυθμιστική ικανότητα της HSP90 πρωτεΐνης περιορίζεται σε συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά και δεν επηρεάζει τα υπόλοιπα. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι υπάρχουν ποικίλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και ότι η HSP90 είναι ένας από αυτούς (Sato και Siomi, 2010).



Εικόνα 6: Μοντέλο του ρυθμιστικού ρόλου της HSP90 στην καναλοποίηση: Η HSP90 αποκρύπτει τις γενετικές μεταλλάξεις. α) όταν τα επίπεδα της HSP90 είναι φυσιολογικά, η υποκείμενη γενετική παραλλακτικότητα (γκρι κορυφές) παραμένει κρυφή και τα γενετικά μηνύματα του οργανισμού εκφράζονται κανονικά (μαύρες κορυφές) έχοντας ως αποτέλεσμα ένα φαινότυπο που κυμαίνεται μέσα σε επιτρεπτά όρια. β) Όταν η έκφραση της HSP90 αλλοιώνεται, τότε αποκαλύπτεται η κρυφή γενετική παραλλακτικότητα με αποτέλεσμα την εμφάνιση γενετικών μηνυμάτων (μαύρες κορυφές) που κανονικά δεν θα έπρεπε να εκφράζονται. Αυτή η διαφοροποιημένη έκφραση των γενετικών μηνυμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλους φαινοτύπους (Sato και Siomi, 2010).

1.β.4. Καναλοποίηση στο φυτό *Arabidopsis thaliana*

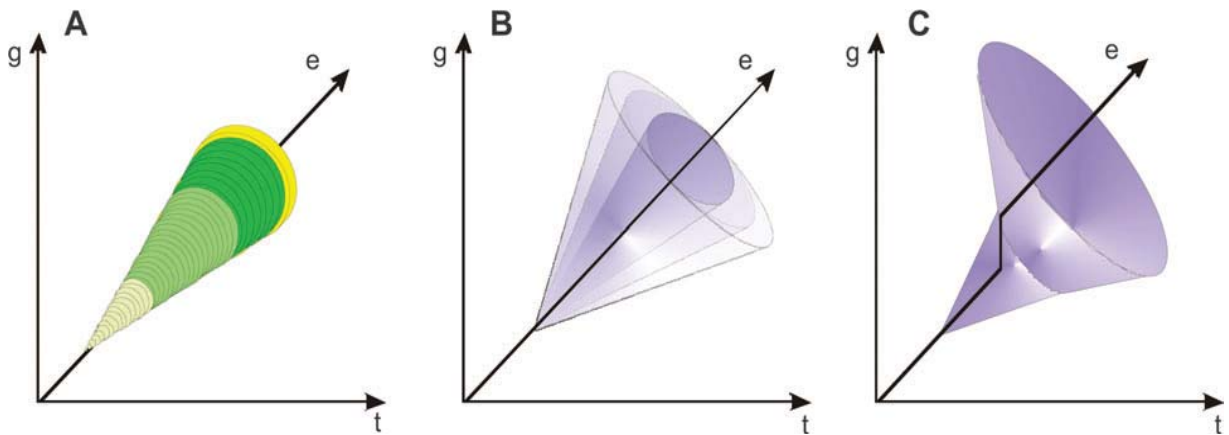
Τα φυτά για να μπορέσουν να αναπτυχθούν, να επιβιώσουν στο περιβάλλον και να αναπαραχθούν, πρέπει να υπερνικήσουν δύο περιορισμούς μείζονος σημασίας. Πρώτον, όντας οργανισμοί ανίκανοι να μετακινηθούν, όπως και οι μονοκύτταροι μύκητες, πρέπει να έχουν την ικανότητα να μπορούν να αισθάνονται τις αλλαγές του περιβάλλοντος που αναπτύσσονται και να αντιδρούν σε αυτές. Δεύτερον, όπως τα ζώα, που έχουν βέβαια την ικανότητα της μετακίνησης, τα ανώτερα φυτά είναι πολύπλοκοι πολυκύτταροι οργανισμοί που για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξή τους θα πρέπει να περάσουν μέσα από τη διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων τους. Είναι γνωστό ότι, στα ζωικά συστήματα, ο δεύτερος περιορισμός εμπλέκει τις HSP90 (Sangster και Queitsch, 2005). Ο συνδυασμός των δύο αυτών καταστάσεων που έχουν να αντιμετωπίσουν τα φυτά ενισχύει τη σημαντικότητα και την πιθανή εμπλοκή του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού, το οποίο είναι γνωστό για την ικανότητα του να ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, να συμμετέχει σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες και να προάγει την αναπτυξιακή σταθερότητα των οργανισμών.

Στο αυτογονιμοποιούμενο φυτικό είδος *Arabidopsis thaliana*, όπως έχει αναφερθεί, υπάρχουν επτά γονίδια που κωδικοποιούν για τις HSP90 πρωτεΐνες. Δύο από τα οργανιδιακά μέλη έχει δείχθει ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη. Μετάλλαξη στο χλωροπλαστικό γονίδιο *hsp90.5* αλλοιώνει την απόκριση στο κόκκινο φως, την αντοχή

στη χλώριο και καθυστερεί την ανάπτυξη των χλωροπλαστών (Cao et al., 2003). Μετάλλαξη στο γονίδιο *hsp90.7*, που τοποθετείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, επηρεάζει τη διατήρηση του ακραίου μεριστώματος (Ishiguro et al., 2002). Όσον αφορά τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας (*hsp90.1-4*), η λειτουργία τους δεν είναι πλήρως κατανοητή μιας και μέχρι στιγμής έχει μόνο δείξει ότι μεταλλάξεις τους επηρεάζουν μονοπάτια απόκρισης σε βιοτροφικά παράσιτα, μικροβιακά παθογόνα και ιούς. Οι μοναδικές πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως υποστρώματά του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού στο *Arabidopsis*, μέχρι σήμερα, είναι οι R πρωτεΐνες που λειτουργούν στην άμυνα των φυτών ενάντια όλων των παραπάνω παθογόνων (Sangster et al., 2007; Salathia και Queitsch, 2007).

Προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργία των HSP90 στο *Arabidopsis*, η έκφρασή τους μεταβλήθηκε με τη βοήθεια φαρμακευτικής καταστολής ή περιβαλλοντικής καταπόνησης και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φαινοτυπικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού όταν βρίσκεται στο στάδιο του αρτίβλαστου 9 ημερών (Queitsch et al., 2002). Η μειωμένη λειτουργία των *Hsp90* γονιδίων δημιούργησε έναν πίνακα μορφολογικών χαρακτηριστικών η μελέτη των οποίων οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα. Μεγάλη εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι φαινότυποι που προκλήθηκαν από την έλλειψη των HSP90 στο *Arabidopsis* δεν είναι τόσο ακραίοι και αφύσικοι όπως στη *Drosophila*. Γενικά, είναι δύσκολο να μπορέσει να προβλέψει κανείς το χαρακτηριστικό εκείνο που είναι ικανό να προσαρμοστεί και να εξελιχθεί μέσω της φυσικής επιλογής. Φυτά που παρουσιάζουν τροποποιημένα χαρακτηριστικά, όπως αλλοιωμένο σχήμα φύλλων ή διαφορές στην επιμήκυνση του υποκοτυλίου, πολύ πιθανόν να βρίσκονται σε σημαντική πλεονεκτική θέση σε σχέση με τα φυτά κανονικού φαινότυπου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του οργανισμού αλλά και την απόκρυψη ή την εμφάνιση ιδιαίτερων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών σε συνδυασμό με την αντίδραση στις περιβαλλοντικές αλλαγές (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2004). Ένα δεύτερο συμπέρασμα αποτελεί το γεγονός ότι η HSP90 πρωτεΐνη προφανώς επηρεάζει την πλαστικότητα της ανάπτυξης. Ο όρος πλαστικότητα αναφέρεται στην ικανότητα των φυτών να εμφανίζουν παραλλακτικότητα στο φαινότυπο ανάλογα με τις περιστάσεις και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται. Δηλαδή, πιθανώς η HSP90 πρωτεΐνη να δρα στο σημείο όπου λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση μεταξύ του γενότυπου του οργανισμού και του περιβάλλοντος, γεγονός που της δίνει ένα τρομερό πλεονέκτημα ως προς τη συμμετοχή της στις αναπτυξιακές διαδικασίες και στο πως τις επηρεάζει. Τρίτο συμπέρασμα που έδωσε η μελέτη των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων της αλλοίωσης της έκφρασης της HSP90, ήταν το γεγονός ότι ίσως η HSP90 να ρυθμίζει τη σταθερότητα της ανάπτυξης ενάντια στοχαστικών διαδικασιών. Δηλαδή, πιθανώς η HSP90 να αποτελεί το ρυθμιστή που ελέγχει τη σειρά και τη λειτουργία των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη του οργανισμού, αποτρέποντας λανθάνουσες εκφράσεις και εμφανίσεις χαρακτηριστικών που αποκλείουν από τον αναμενόμενο και οριοθετημένο φαινότυπο.

Η ετεροζυγωτία αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες στη διατήρηση όχι μόνο της γενετικής ποικιλότητας αλλά και της φαινοτυπικής ευρωστίας. Όμως, η ετεροζυγωτία για κάθε ξεχωριστό άτομο μέσα στον πληθυσμό του *Arabidopsis* είναι εξαιρετικά χαμηλή και γίνεται ακόμα χαμηλότερη στα αυτο-γονιμοποιούμενα είδη. Για το λόγο αυτό, δεν είναι ξεκάθαρο αν η λειτουργία της HSP90 περιορίζει τις μορφολογικές αποκλίσεις ως αποτέλεσμα της ρύθμισης της ετεροζυγωτίας σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους ή αν περιορίζει μέσω ενός καθολικού και ισχυρού μηχανισμού τις υπάρχουσες στοχαστικές διεργασίες που ελέγχουν το φαινότυπο αποτέλεσμα του φυτού (Samakovli et al., 2007).



Εικόνα 7: Καναλοποίηση των μορφογενετικών διαδικασιών α) Οι φαινοτυπικοί πολυμορφισμοί περιορίζονται μέσα στον κώνο. Κάθε χωρικό σημείο μέσα στον κώνο αντιπροσωπεύει μία μορφή ενός εμβρύου (λευκό), νεαρού φυταρίου (ανοικτό πράσινο), φυτού (πράσινο), ή σημεία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου και ανάπτυξης του άνθους (κίτρινο) που στοχαστικά συνδέεται με οποιοδήποτε σημείο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι περιμετρικοί κύκλοι θεωρούνται ως τα περιοριστικά όρια που θέτουν οι HSP90. β) Αν οι κύκλοι περιορισμού διευρυνθούν λόγω μείωσης του επιπέδου λειτουργίας των HSP90, τότε η διάμετρος του κώνου αυξάνει επιτρέποντας να εμφανιστούν περισσότερες από το κανονικό φαινοτυπικές παραλλαγές αυξάνοντας έτσι το μέγεθος του πολυμορφισμού. γ) Όταν το περιβάλλον αλλάζει αιφνίδια σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο της ανάπτυξης, τότε η διάμετρος του κώνου διευρύνεται ακόμα περισσότερο και η καναλοποίηση της ανάπτυξης αλλάζει κατεύθυνση. Η αλλαγή αυτή τελικά επιτρέπει την εμφάνιση περισσότερων διαταραχών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και την παραγωγή νέων πολυμορφικών χαρακτηριστικών. Η σπουδαιότητα του φαινομένου είναι εντυπωσιακή όταν μειώνεται η λειτουργία της HSP90 γιατί τελικά τα όρια που περιορίζουν την ανάπτυξη διευρύνονται τρομερά και οι διαταραχές στην ανάπτυξη μεγιστοποιούνται (Samakovli et al., 2007).

Υπάρχουν πολλές έρευνες μέχρι σήμερα που υποδηλώνουν ότι οι HSP90 πιθανώς συμβάλλουν στις ταχείες εξελικτικές διαδικασίες. Έχει παρατηρηθεί, τόσο στη μύγα *Drosophila melanogaster* όσο και στο φυτό *Arabidopsis thaliana* ότι η μορφολογική παραλλακτικότητα ενισχύεται σε μεγάλο βαθμό κάτω από μειωμένη λειτουργία των HSP90 (Rutherford and Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002). Και στους δύο οργανισμούς, οι αλλοιωμένοι φαινότυποι, οι οποίοι εξαρτώνται από τις HSP90, διέφεραν μεταξύ διαφορετικών γενετικών υποβάθρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ήδη υπάρχουσα κρυφή γενετική παραλλακτικότητα εξαρτάται από τις HSP90 και εκφράζεται φαινοτυπικά. Οι Rutherford και Lindquist (1998) προσδιόρισαν ότι το χαμηλό ποσοστό εμφάνισης των χαρακτηριστικών αυτών μπορούσε να αυξηθεί με τεχνητή επιλογή για τα χαρακτηριστικά αυτά και τελικά να οδηγηθούν στην εξάλειψη των χαρακτηριστικών αυτών. Παρόμοια πειράματα αποκάλυψαν ότι ορισμένα HSP90-εξαρτώμενα χαρακτηριστικά στη *Drosophila melanogaster* προέρχονταν από ένα συνδυασμό γενετικών αλλά και επιγενετικών υποβάθρων (Sollars V et al., 2003). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι πολλά από αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούσαν να αποκαλυφθούν κάτω από μέτριες περιβαλλοντικές αλλαγές. Συνοψίζοντας, όλα τα δεδομένα μαζί οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι HSP90 μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των περιβαλλοντικών αλλαγών με την αποκάλυψη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, τα οποία έχουν τη βάση τους σε γενετικές διαφορές. Δηλαδή, οι HSP90 μπορεί να δρουν ως ρυθμιστές των τροποποιήσεων που συμβαίνουν κατά την εξελικτική διαδικασία (Sangster et al., 2007).

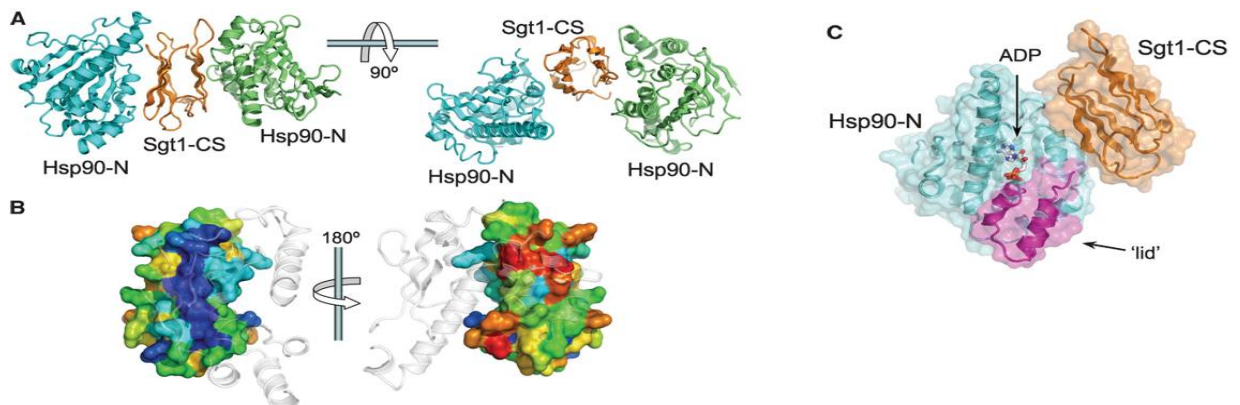
Παρόλο που στη *Drosophila* η μελέτη της ρυθμιστικής ικανότητας της HSP90 περιορίζεται στην παρατήρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών, στο *Arabidopsis* επεκτείνεται πέρα της γενετικής παραλλακτικότητας. Εκμεταλλευόμενοι τα μοναδικά πλεονεκτήματα του φυτικού συστήματος πολλοί ερευνητές κατάφεραν να

ποσοτικοποιήσουν τη ρυθμιστική ικανότητα της HSP90 στα μονοπάτια περιβαλλοντικής αντίδρασης και να αποδείξουν το ρόλο της HSP90 στην πλαστικότητα και την περιβαλλοντική καναλοποίηση (Sangster et al., 2004).

1.β.5. HSP90 και ανθεκτικότητα στις ασθένειες στα φυτά

Τα φυτά στο περιβάλλον που αναπτύσσονται εκτίθενται συνεχώς σε επιθέσεις πληθώρας μικροβιακών παθογόνων, εντόμων και νηματωδών. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αμυντικών μηχανισμών που τους επιτρέπει να αντισταθούν αυτές τις επιθέσεις. Ο κυριότερος μηχανισμός αντίδρασης σε αυτού του είδους επιθέσεις είναι η πρωτεΐνο-ειδική αλληλεπίδραση των φυτικών R (Resistance) γονιδίων ανθεκτικότητας με τα γονίδια μολυσματικότητας των παθογόνων (Flor et al., 1971). Η αναγνώριση των πρωτεϊνών μολυσματικότητας των παθογόνων από τις R πρωτεΐνες θέτει σε εκκίνηση μια σειρά διαδοχικών γεγονότων οδηγώντας σε περιορισμένο κυτταρικό θάνατο στο σημείο της μόλυνσης που είναι γνωστός ως αντίδραση υπερευαισθησίας (HR). Η HR συνοδεύεται από ραγδαία οξειδωτική έκρηξη, ιοντική ροή, ενδυνάμωση κυτταρικών τοιχωμάτων, φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και ενεργοποίηση πολλών γονιδίων άμυνας (Dangl και Jones, 2001).

Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν αποδείξει το ρόλο των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων του *Arabidopsis* στην ανθεκτικότητα εναντίον ασθενειών. Οι Liu et al., (2004) έδειξαν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των δύο πιο βασικών γονιδίων της αμυντικής αντίδρασης των φυτών, *Sgt1* (Εικόνα 8) και *Rar1*, καθώς και με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας N που προσδίδει ανθεκτικότητα για τον ιό του μωσαϊκού του καπνού. Οι Takahashi et al. (2003), εξέτασαν τη συμμετοχή των *Hsp90* γονιδίων στα μονοπάτια ανθεκτικότητας στο *Arabidopsis* και συγκεκριμένα την επίδραση που ασκούν τα *Hsp90* γονίδια στα R γονίδια ανθεκτικότητας *Rpm1* και *Rps2*. Όταν φυτά μολύνθηκαν με *Pseudomonas syringae*, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του *hsp90.1* αλλά όχι των υπολοίπων *hsp* γονιδίων. Εφαρμογή τζελνταναμυκίνης (GDA), που αποτελεί αναστολέα των *Hsp90* γονιδίων, μείωσε την PRS2-επαγόμενη βακτηριακή ανθεκτικότητα και την HR, ενώ η RPM1-επαγόμενη HR παρέμεινε ανεπηρέαστη και η βακτηριακή ανθεκτικότητα παρουσίασε μόνο μια μικρή μείωση. Επιπρόσθετα, μεταλλάγματα με πλήρως απενεργοποιημένο το *Hsp90.1* γονίδιο παρουσίαζαν προβλήματα στην RPS2-επαγόμενη ανθεκτικότητα αλλά όχι στην RPM1-επαγόμενη ανθεκτικότητα. Σε μια διαφορετική δημοσίευση, οι Hubert et al. (2003) παρουσίασαν ότι κυρίαρχα μεταλλάγματα για το *hsp90.2* γονίδιο του *Arabidopsis* παρουσιάζουν μειωμένη ανθεκτικότητα στην RPM1-επαγωγή αλλά όχι στην RPS2-. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχουν πιθανότητες οι σχεδόν όμοιες κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες του *Arabidopsis* να αποκλίνουν σε λειτουργία.



Εικόνα 8: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Hsp90-N-Sgt1-CS. (A) Απεικόνιση της στερεοδιαμόρφωσης των περιοχών αλληλεπίδρασης των αντίθετων β-πτυχωτών περιοχών της πρωτεΐνης Sgt1-CS με τις επικείμενες περιοχές της Hsp90-N. (B) Συντηρητικός χρωματισμός της επιφάνειας της Sgt1-CS πρωτεΐνης (μπλε-κόκκινο: περισσότερο-λιγότερο συντηρημένη περιοχή). Η επιφάνεια που εμφανίζεται στα αριστερά είναι υψηλά συντηρημένη με μια επιμήκης περιοχή πλήρως σταθερών καταλοίπων τα οποία σχηματίζουν την περιοχική αλληλεπίδραση με την Hsp90 πρωτεΐνη. Ο υψηλός βαθμός συντηρητικότητας υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα στην περιοχική αυτή είναι πραγματική βιολογικά. (C) Περίληψη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Hsp90-N-Sgt1-CS βασισμένη στη συντηρημένη επιφάνεια αλληλεπίδρασης. Η περιοχική πρόσδεση του ADP περιορίζεται στην εσωτερική κοιλότητα της Hsp90-N και το κινούμενο 'lid' τμήμα που κλείνει στην κατάσταση ενεργοποίησης της Hsp90 από το ATP σημειώνονται στο σχήμα (Zhang et al., 2008).

Η αλληλεπίδραση του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού με τις R πρωτεΐνες πιθανόν να μην είναι μονοδιάστατη και να συσχετίζεται και με κάποια άλλη λειτουργική πλευρά των HSP90. Οι R πρωτεΐνες διατηρούν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού στη γονιδιωματική τους ακολουθία, κατάσταση που ισχύει ίσως λόγω της συνεχόμενης πάλης μεταξύ των φυτών και των παθογόνων, παρουσιάζοντας ένα κλασικό παράδειγμα φαινοτυπικής πλαστικότητας. Συγκεκριμένα, η LLR περιοχή, που είναι η περιοχική σύνδεσης των HSP90 με τις R πρωτεΐνες, βρίσκεται κάτω από συνεχή διαφοροποίηση (Bergelson et al., 2001). Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι HSP90 συμμετέχουν στον έλεγχο της εμφάνισης πιθανών φαινοτυπικών αποκλίσεων που μπορεί να εκδηλωθούν τόσο στο *Arabidopsis* όσο και στη *Drosophila* (Queitsch et al., 2002; Sollars et al., 2003; Sangster et al., 2004). Όπως έχει αναφερθεί, αλλοίωση της ρυθμιστικής ικανότητας των HSP90 μέσω περιβαλλοντικών καταπονήσεων, χρήση φαρμάκων ή μεταλλάξεων, προκαλεί εμφάνιση των πολυμορφισμών αυτών, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η HSP90-εξαρτώμενη απόκρυψη και απελευθέρωση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μπορεί να επηρεάσει την εξελικτική πορεία του οργανισμού (Sangster και Queitsch, 2005). Επίσης, δεν μπορεί να περάσει απαρατήρητο το γεγονός ότι η HSP90-εξαρτώμενη επαγωγή των R πρωτεϊνών μπορεί να επιτρέπει ανεπαίθητες δομικές αλλαγές στις R πρωτεΐνες και να βοηθά στη διαφοροποίηση των γονιδιωματικών τους ακολουθιών, χαρακτηριστικό που παρατηρείται πολύ έντονα μέσα στην οικογένεια αυτή (Schulze-Lefert, 2004). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση στον καπνό του R γονιδίου *RPS4* του *Arabidopsis* έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της HR (Zhang et al., 2004), που λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια των ενδογενών *hsp90* και *SGT1* γονιδίων του καπνού. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι το συντηρημένο HSP90 σύμπλοκο κατέχει την ικανότητα να συνδέει τις συνεχόμενα διαφοροποιούμενες και ετερόλογες R πρωτεΐνες με τα άκρως συντηρημένα σινιάλα ενεργοποίησης των μονοπατιών ανθεκτικότητας. Συμπερασματικά, τα δεδομένα δείχνουν ότι οι HSP90 αποτελούν ένα σύστημα που έχει την ικανότητα να ελαχιστοποιεί τον αντίκτυπο τυχόν μεταλλάξεων που μπορεί να συμβούν σε μονοπάτια που απαιτούνται για την αμυντική αντίδραση εναντίον ενός νέου μολυσματικού παράγοντα (Sangster και Queitsch, 2005).

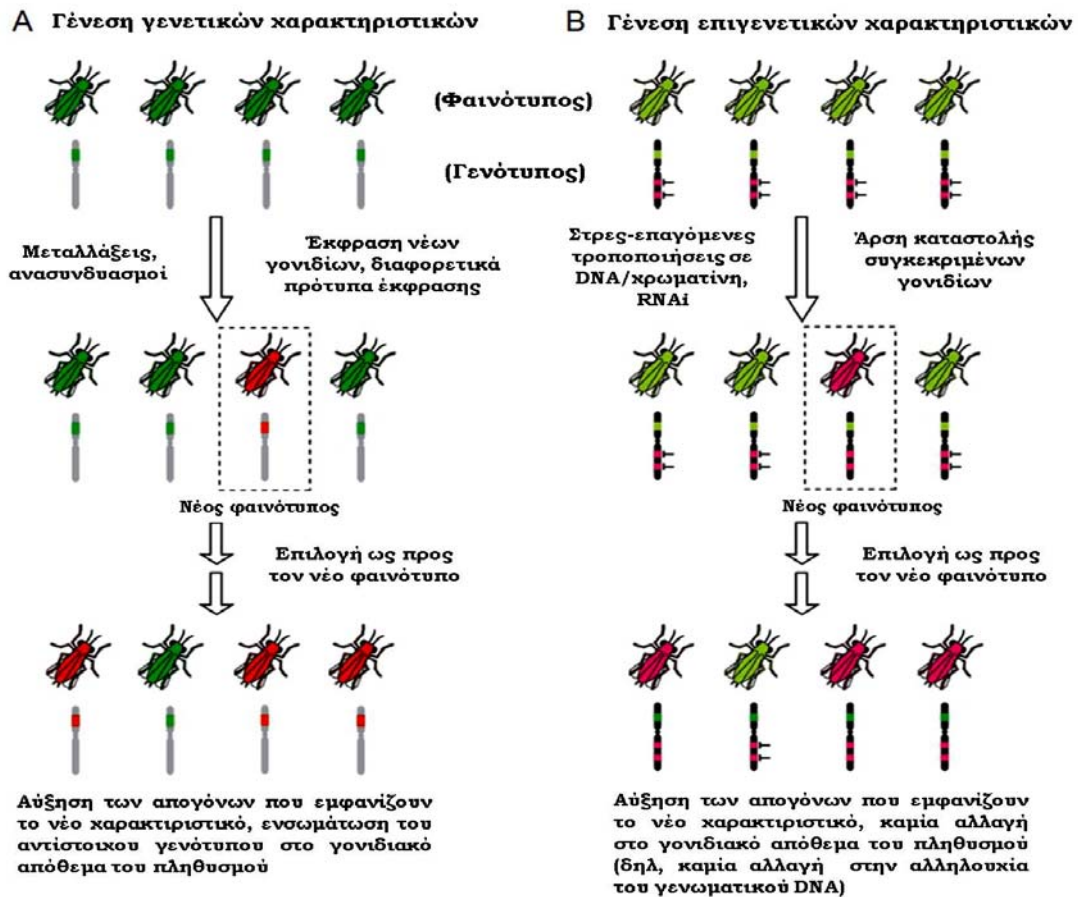
Η επαγωγή αμυντικών αντιδράσεων είναι ένα κλασικό παράδειγμα της φαινοτυπικής πλαστικότητας. Πέρα όμως από τα όρια της άμυνας, το σύμπλοκο των HSP90 πρωτεϊνών έχει την ικανότητα να ανταποκρίνεται στο περιβάλλον μέσω της προτεινόμενης εμπλοκής του σε μονοπάτια που αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον και να το αντιλαμβάνεται επάγοντας τους κατάλληλους φαινοτυπικούς πολυμορφισμούς. Ως παράδειγμα αναφέρεται η κατάσταση κατά την οποία όταν νεαρά φυτάρια *Arabidopsis* μεγαλώνουν στο σκοτάδι παρουσία του φαρμάκου τζελνταναμυκίνη (GDA), επηρεάζεται δραματικά η επιμήκυνση των υποκοτυλίων τους (Queitsch et al., 2002). Ομοίως, το εύρος της επιμήκυνσης της ρίζας, η απόκριση στη βαρύτητα και το πρασίνισμα του φυτού παρουσία φωτός επίσης εξαρτώνται από τις HSP90. Επίσης, όταν οι HSP90 αναστέλλονται παρατηρείται αύξηση στην ποικιλότητα των χαρακτηριστικών, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο μοριακού συνοδού των HSP90 πιθανώς να

σταθεροποιεί την ανάπτυξη στα φυτά (Queitsch et al., 2002). Κάτι αντίστοιχο όμως δεν έχει παρατηρηθεί στη μύγα *Drosophila melanogaster* (Milton et al., 2003). Αυτή η διαφορά πιθανώς να αντικατοπτρίζει τη στενή σχέση που υπάρχει μεταξύ του μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος και των αναπτυξιακών διαδικασιών των φυτών. Δηλαδή, τα φυτά για να μπορούν να αντιλαμβάνονται τις αλλαγές του περιβάλλοντος και να προσαρμόζονται σε αυτές, αξιοποιούν την ικανότητα αντίληψης του περιβάλλοντος δια μέσω των HSP90 πρωτεϊνών, και έτσι ανασκευάζουν τη στερεοτυπική τους μορφολογία ή αντιδρούν στα εξωτερικά ερεθίσματα (Sangster και Queitsch, 2005).

1.β.6. Αποκάλυψη επιγενετικής παραλλακτικότητας

Όπως έχει αναφερθεί στις προηγούμενες ενότητες, η αναστολή της δράσης των HSP90 πρωτεϊνών, στα φυτά και στα ζώα, επάγει την εμφάνιση και, στη συνέχεια, κληρονόμηση ασυνήθιστων φαινοτύπων. Οι φαινότυποι αυτοί μέσω της αυτογονιμοποίησης των απογόνων των επόμενων γενεών έχουν την ικανότητα να αυξήσουν τα ποσοστά εμφάνισής τους μέσα στον πληθυσμό, χωρίς όμως να ακολουθούν τον Μενδελιανό τρόπο κληρονόμησης (Wong και Houry, 2006). Μέχρι και σήμερα, δεν έχει βρεθεί ένα ακριβές μοριακό μοντέλο που να εξηγεί το φαινόμενο αυτό. Αν και υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την άποψη ενός γενετικού μοριακού μοντέλου ρύθμισης των οργανισμών από τις HSP90 (Rutherford και Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007), υπάρχουν επίσης αρκετά δεδομένα που ερμηνεύουν καλύτερα το φαινόμενο αυτό μέσω της ύπαρξης ενός επιγενετικού μοριακού μοντέλου ρύθμισης (Sollars et al., 2003). Δηλαδή, υπάρχουν αποτελέσματα που ενισχύουν την άποψη ότι οι HSP90 συμβάλλουν στη ρύθμιση της εκδήλωσης και κληρονόμησης των χαρακτηριστικών αυτών ρυθμίζοντας τα επιγενετικά πρότυπα των οργανισμών.

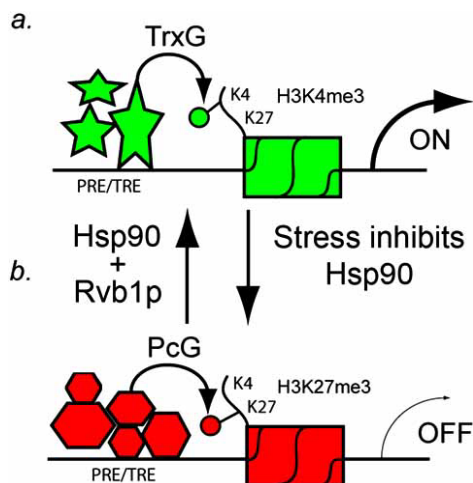
Την άποψη αυτή ενισχύει η έρευνα των Zhao et al. (2005) που πραγματοποίησαν στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και δείχνει ότι ανάμεσα στο πλήθος των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν είτε φυσικά είτε γενετικά με τις HSP90 υπάρχουν και αρκετές πρωτεΐνες που ανήκουν στα INO80 και SWR-C σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έντονα ότι πιθανός να υπάρχει λειτουργική σύνδεση μεταξύ των HSP90 και των μηχανισμών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τουλάχιστον στη ζύμη. Από τη στιγμή βέβαια που οι HSP90 αποτελούν μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών μεταξύ όλων των οργανισμών, από τα κατώτερα αρχαιοβακτήρια έως τον άνθρωπο, είναι λογικό να υποθέσει κάποιος ότι και στους υπόλοιπους οργανισμούς θα υπάρχει ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων (Wong και Houry, 2006).



Εικόνα 9: Μία συσχέτιση μεταξύ γενετικής και επιγενετικής στην απόκτηση νέων χαρακτηριστικών. Α) Μέσω της γενετικής οδού, ένα νέο χαρακτηριστικό, που εμφανίζεται ως νέος φαινότυπος, εκδηλώνεται από μη-επιβλαβείς μεταλλάξεις και/ή ανασυνδυασμούς γονιδίων αλλάζοντας έτσι το γένωμα των απογόνων. Θετική επιλογή για το νέο χαρακτηριστικό έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της αναλογίας των απογόνων που το εκδηλώνουν, μέσα στον πληθυσμό, αλλά και ενσωμάτωση του νέου γονιδίου, που είναι υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό αυτό, στο γονιδιακό υπόβαθρο του πληθυσμού. Β) Μέσω της επιγενετικής οδού, ένα νέο χαρακτηριστικό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της έκφρασης γονιδίων που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι ανενεργά. Περιβαλλοντικές καταπονήσεις επάγουν τροποποιήσεις στο DNA, στις ιστόνες, στη δομή της χρωματίνης και/ή στη λειτουργία του RNAi μηχανισμού, οι οποίες τροποποιούν το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των επηρεασμένων απογόνων. Κληρονόμηση του γονικού επιγενώματος και θετική επιλογή για το νέο χαρακτηριστικό έχει ως αποτέλεσμα στην αύξηση της αναλογίας των απογόνων που περιέχουν το νέο επιγένομα, αν και δεν έχει γίνει καμία αλλαγή στο γενετικό υπόβαθρο των ατόμων του πληθυσμού (Wong και Houry, 2006).

Οι Sollars et al. (2003) έκαναν μια σημαντική ανακάλυψη όσον αφορά την εμπλοκή των HSP90 σε μοριακά μοντέλα επιγενετικής ρύθμισης. Αλλοιώνοντας την έκφραση του *hsp90* γονιδίου στη *Drosophila*, είτε με γενετική μετάλλαξη είτε με φαρμακευτική αναστολή, παρατήρησαν ότι εμφανίστηκε ένας πολύ ιδιαίτερος φαινότυπος στο μάτι της μύγας, που ήταν κληρονομήσιμος στις επόμενες γενιές ελλείπει πλέον της επιλεκτικής πίεσης, και συγχρόνως υπήρξε αλλαγή στην κατάσταση της χρωματίνης που επηρέαζε καθολικά τα επίπεδα ακετυλίωσης της H3 ιστόνης μέσα στον οργανισμό. Συγχρόνως, παρατήρησαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *trithorax* της οικογένειας TrxG, που αποτελούν πρωτεΐνες χρωματίνης που ρυθμίζουν μαζί με μέλη της Polycomb ομάδας πρωτεΐνων την τύχη των κυττάρων κατά την ανάπτυξη μέσω ελέγχου επιγενετικών μονοπατιών, εμφάνιζαν τον ίδιο ακριβώς φαινότυπο. Όταν τα έντομα επιλέχθηκαν μέχρι και έξι γενιές για το νέο χαρακτηριστικό, τότε τους δόθηκε τροφή που περιείχε αναστολείς αποακετυλασών (HDAC). Μεγάλο ενδιαφέρον

παρουσίασε η παρατήρηση ότι έντομα που προέκυψαν είτε από μετάλλαξη της HSP90 πρωτεΐνης, είτε από φαρμακευτική αναστολή της, είτε από μεταλλάξεις του *trithorax* γονιδίου κατάφεραν να αντιστρέψουν το φαινότυπο. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι η αλλαγή αυτή στην κατάσταση της χρωματίνης ήταν υπεύθυνη για την επιγενετική κληρονόμηση του φαινοτύπου στο μάτι και ότι η HSP90 συσχετίζεται με την κληρονόμηση του χαρακτηριστικού αυτού. Πιο πρόσφατα, περαιτέρω ανάλυση του φαινομένου απέδειξε ότι προκειμένου να μπορεί να εκφραστεί το γονίδιο *trithorax*, απαιτείται η HSP90 για να διατηρεί την περιοχή της χρωματίνης ενεργή (Tariq et al., 2009). Μέσα από τις μελέτες αυτές φαίνεται πως η HSP90 μπορεί να επηρεάσει ένα σπουδαίο και εξελικτικά υψηλά συντηρημένο επιγενετικό δίκτυο που ελέγχει κυρίως αναπτυξιακά και κυτταρικά μονοπάτια ενός οργανισμού.



Εικόνα 10: Ρύθμιση της μεθυλίωσης των ιστονών από τα PcG και TrxG σύμπλοκα. α) Οι TrxG πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκο πάνω σε στοιχεία ενεργοποίησης (PRE/TRE). Η TRITHORAX είναι μια πρωτεΐνη του συμπλόκου που τρι-μεθυλιώνει τη λυσίνη 4 της ιστόνης H3, που είναι ένα επιγενετικό χαρακτηριστικό των ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων. Στο μοντέλο αυτό, η HSP90 αλληλεπιδρά με τη Rvb1p πρωτεΐνη αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και/ή τη TRITHORAX προκειμένου να διατηρείται ενεργή η χρωματίνη. β) Όταν απενεργοποιηθεί η λειτουργία της HSP90 λόγω στρες, τότε πραγματοποιείται αντικατάσταση των TrxG πρωτεϊνών από τις PcG στα σημεία που υπάρχουν τα στοιχεία ενεργοποίησης των συμπλόκων (PRE/TRE). Το PcG πρωτεϊνικό σύμπλοκο περιέχει την E(z) πρωτεΐνη η οποία τρι-μεθυλιώνει τη λυσίνη 27 της ιστόνης H3, που αποτελεί δείκτη ανεργής χρωματίνης και καταστολής της μεταγραφής (Ruden και Lu, 2008).

Εκτός από αυτά, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα στη βιβλιογραφία που αποδεικνύουν τη συμμετοχή επιγενετικών στοιχείων στην κληρονόμηση φαινοτύπων που επάγονται από τις HSP90. Έχει προταθεί ότι στοχευόμενη μεθυλίωση του DNA και τροποποιήσεις της χρωματίνης που μπορεί να συνδέονται λειτουργικά με τις HSP90, είναι επιγενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα πρότυπα ενεργοποίησης ή αποσίωπησης ενός γονιδίου κληρονομούνται χωρίς να υπάρξει καμία αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *CARM1*, το οποίο συμμετέχει στη μεθυλίωση της αργινίνης 17 στην ιστόνη H3, το οποίο συσχετίζεται με τον υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής (Beato και Klug, 2000). Ο ER ρυθμίζεται από τις HSP90 με τον εξής τρόπο: η παρουσία οιστρογόνων επάγει την απελευθέρωση του ER από τις HSP90, ο οποίος μπορεί να ενωθεί πλέον με τα οιστρογόνα και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων που εξαρτώνται από αυτόν. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η μεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης 4 στην ιστόνη 3 (SMYD3) στον άνθρωπο, που προκειμένου να δρα ικανοποιητικά απαιτεί την παρουσία των HSP90 (Hamamoto et al., 2004). Επίσης, η μελέτη του πρωτεώματος της ζύμης (Zhao et al., 2005) αποκάλυψε ότι η HSP90 αλληλεπιδρά με τις Tah1p και Pih1p πρωτεΐνες, που συσχετίζονται με τον Rvb1p παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.

Παρόλο που η κληρονόμηση των HSP90-επαγόμενων φαινοτύπων και η αύξηση της εμφάνισής τους μέσα στους πληθυσμούς όπου παρατηρούνται αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο φαινόμενο, ίσως τον πιο καθοριστικό παράγοντα του φαινομένου να αποτελεί η σταθερότητα της κληρονόμησης (Sollars et al., 2003; Sangster et al., 2004). Αυτό γιατί καταστάσεις έλλειψης ισορροπίας στην εμφάνιση ενός επιγενετικού

γεγονότος λόγω αναστρέψιμων βιοχημικών τροποποιήσεων στο DNA και/ή στις ιστόνες θα παρουσιάζουν προβλήματα στη διατήρηση της κατάστασης της χρωματινής από μια γενιά στην επόμενη. Προκειμένου λοιπόν να γίνει εφικτή η σταθερή κληρονομία του φαινοτύπου ενός οργανισμού απαιτείται συνεργασία τόσο γενετικών όσο και επιγενετικών μηχανισμών (Sangster et al., 2004; 2007). Δηλαδή, ενώ η παραγωγή ενός νέου φαινοτύπου κάτω από συνθήκες καταστολής των HSP90 πρωτεϊνών μπορεί να οφείλεται σε επιγενετικούς μηχανισμούς, η φαινοτυπική επιλογή που θα οδηγήσει στη συσσώρευση όλων εκείνων των καθοριστικών παραγόντων που εξυπηρετούν στην καναλοποίηση (διοχέτευση) του φαινοτύπου έχει γενετική βάση.

Βέβαια, ο μηχανισμός μέσα από τον οποίο οι HSP90 πραγματοποιούν την καναλοποίηση των φαινοτύπων βρίσκεται κάτω από διαρκή και έντονη μελέτη. Από την έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής, εικάζεται ότι οι HSP90 δρουν ως ρυθμιστές της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας, ότι μετάλλαξη σε κάθε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για HSP90 πρωτεΐνες οδηγεί σε εμφάνιση φαινοτυπικών διαταραχών που βρίσκονταν κάτω από κατάσταση καταστολής και ότι οι HSP90 ελέγχουν τη λειτουργία των στοχαστικών μηχανισμών μέσω ελαχιστοποίησης των πιθανών διαταραχών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Πιο πρόσφατα, έχει προταθεί η ιδέα ότι οι HSP90 διαμεσολαβούν στην καναλοποίηση των χαρακτηριστικών των οργανισμών μέσω επιγενετικών ρυθμίσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πέραν των γονιδίων *trithorax*, αποτελεί και το γονίδιο *piwi*, το οποίο απαιτείται για την αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων και λειτουργεί και ως επιγενετικός ρυθμιστής στη *Drosophila* (Specchia et al., 2010; Gangaraju et al., 2011). Για να μπορεί η PIWI πρωτεΐνη να λειτουργεί ικανοποιητικά, δηλαδή να καταστέλλει τη δημιουργία νέων γονοτύπων από μεταλλάξεις και να αποσιωπά τους ήδη υπάρχοντες γενετικούς πολυμορφισμούς μέσω επιγενετικών μηχανισμών, πρέπει να υπόκειται μετα-μεταφραστική ρύθμιση από την HSP90 πρωτεΐνη.

1.γ. Άνθιση

1.γ.1. Γενικά

Τα ανθοφόρα φυτά αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο επιτυχημένες και ιδιαίτερες ομάδες οργανισμών του πλανήτη με πάνω από 250.000 υπάρχοντα είδη στη φύση και χιλιάδες ακόμα ποικιλίες που παράχθηκαν από βοτανολόγους μέσω υβριδισμών και άλλων μεθόδων αναπαραγωγής. Η σημαντικότερη πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν τα φυτά είναι η επιτυχημένη αναπαραγωγή μέσα στο απρόβλεπτο περιβάλλον το οποίο μεγαλώνουν. Για το λόγο αυτό, είναι ικανά να καθορίσουν πότε εμφανίζονται οι ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξή τους και τότε να παράγουν *de novo* γαμέτες στα όργανα του κάθε άνθους. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν φυτά, όπως οι ορχιδέες, τα τριαντάφυλλα και τα σκυλάκια, που έχουν πολύ ιδιαίτερα άνθη, τα περισσότερα άνθη περιέχουν τέσσερα ευδιάκριτα είδη οργάνων και η ανάπτυξή τους ελέγχεται από υψηλά συντηρημένους μοριακούς μηχανισμούς (Krizek και Fletcher, 2005).

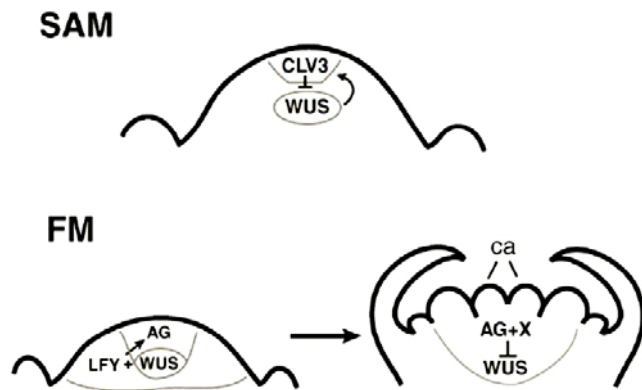
Τη σημαντικότερη αναπτυξιακή μετάβαση στα φυτά, που έχουν βέβαια την ικανότητα να ανθίζουν, αποτελεί η αλλαγή από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης. Η κατάλληλη χρονική στιγμή για τη μετάβαση αυτή είναι πρωτίστης σημασίας ώστε να υπάρξει μεγιστοποίηση της αναπαραγωγικής επιτυχίας, το οποίο μεταφράζεται σε ιδανικό αριθμό σπορίων για το φυτό. Κάθε φυτικό είδος έχει αναπτύξει ιδιαίτερους μηχανισμούς για την αναπαραγωγή. Πολλά φυτικά είδη ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικά σιγάλα που ελέγχουν το χρόνο άνθισης, όπως είναι η φωτοπερίοδος ή οι συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών, αλλά υπάρχουν και διάφοροι μηχανισμοί καταπόνησης που έχουν την ικανότητα να επάγουν την άνθιση, όπως είναι ο υπερπληθυσμός, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, ζέστη ή ξηρασία. Επίσης, υπάρχουν και ενδογενή σιγάλα που ρυθμίζουν την άνθιση.

Οι πολλαπλές πληροφορίες που εισέρχονται στα φυτά παίρνουν τέτοια μορφή ώστε να ρυθμίσουν την τύχη του κορυφαίου βλαστικού μεριστώματος. Η ικανότητα των φυτών να προσαρμόζουν μορφολογικά την ανάπτυξή τους ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον τονίζει μια θεμελιώδη διαφορά που έχουν τα φυτά σε σχέση με τα ζώα. Στα φυτά, το κύριο μέρος της ανάπτυξης συμβαίνει μετα-εμβρυικά μέσω συνεχούς παραγωγής βλαστικών κυττάρων από τα κορυφαία μεριστώματα της ρίζας και του βλαστού (Simpson και Dean, 2002). Τα πρωτογενή κύτταρα που θα δώσουν στη συνέχεια φύλλα ή άνθη εμφανίζονται στις πλευρικές καταβολές του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού και η μετάβαση από τη βλαστική στην ανθική κατάσταση του φυτού ελέγχεται από μια ομάδα γονιδίων που είναι γνωστά ως γονίδια ταυτότητας μεριστώματος (Εικόνα 10).

Η αναπαραγωγική επιτυχία ενός φυτού έγκειται στην ικανότητά του να παράγει άνθη, η οποία αποτελεί εντυπωσιακή αναπτυξιακή αλλαγή στον κύκλο ανάπτυξης του φυτού (Simpson και Dean, 2002). Κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης του φυτού, το κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα (SAM, Shoot Apical Meristem) εγκαθιδρύει την αρχιτεκτονική του βλαστού μέσω της δημιουργίας επαναληπτικών σειρών αρχέγονων βλαστικών κυττάρων που αναπτύσσονται σε φύλλα ή/και πλευρικούς βλαστούς (κλάδοι) οι οποίοι έχουν δικό τους κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα (Poethig, 1990). Μετά από τη μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης, σχεδόν από όλα τα κορυφαία μεριστώματα παράγονται άνθη. Η ανάπτυξη του αναπαραγωγικού βλαστού διαφέρει από το βλαστικό στα εξής σημεία:

- Το άνθος έχει αρκετούς τύπους εξειδικευμένων ανθικών οργάνων από τους οποίους ο αριθμός, η διαμόρφωση και η μορφολογία είναι ξεχωριστά για κάθε είδος.

- Η έναρξη και η ανάπτυξη πλευρικών βλαστών βρίσκονται σε κατάσταση καταστολής στον ανθικό βλαστό.
- Αντίθετα με τους περισσότερους βλαστούς, οι ανθικοί βλαστοί είναι καθορισμένοι και σταματούν να αυξάνονται μετά από την έναρξη της δημιουργίας των τελευταίων αναπαραγωγικών οργάνων (Pidkowich et al., 1999).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση του κορυφαιού βλαστικού μεριστώματος (SAM) και του ανθικού μεριστώματος (FM). Στο κορυφαίο αδιαφοροποίητο βλαστικό μερίστωμα (SAM) η αλληλεπίδραση των γονιδίων *Clv3* και *Wus* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή νέων κυττάρων στη μεριστωματική ζώνη και τη δημιουργία φύλλων κατά τη βλαστική ανάπτυξη. Στο διαφοροποιημένο ανθικό μερίστωμα (FM) είναι εμφανής η παρουσία του γονιδίου *Lfy* από την αρχή της διαφοροποίησης που οριοθετεί και την αλλαγή της ταυτότητας του μεριστώματος. Στη συνέχεια, το *Lfy* σε συνδυασμό με το *Wus* και το *Ag* αλληλεπιδρούν προκειμένου να αρχίσει η διαδικασία δημιουργίας των ανθικών οργάνων (Fletcher, 2002).

Τα φυτικά είδη παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλότητα στον χρόνο άνθισης, με τη στιγμή της ανθικής αλλαγής να ελέγχεται από υπεράριθμους περιβαλλοντικούς και ενδογενείς παράγοντες (Izawa et al., 2003). Ο συνδυασμός αυτός δίνει τη δυνατότητα στα φυτά να μπορούν να εξισορροπούν την ανάπτυξή τους από γενιά σε γενιά με τις επιθυμητές περιβαλλοντικές συνθήκες. Όπως είναι κατανοητό, η ανθική ανάπτυξη απαιτεί το συντονισμό ενός πολύπλοκου πολυπαραγοντικού δικτύου.

Την τελευταία εικοσαετία έχει γίνει αξιοσημείωτη πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών που χρησιμοποιούν τα φυτά για να καθορίσουν το χρόνο και το είδος του μεριστώματος προκειμένου να ενεργοποιηθεί η άνθιση. Αν και τα άνθη που παράγονται από κάθε φυτικό είδος διαφέρουν δραματικά μεταξύ τους, οι γενετικοί και μοριακοί μηχανισμοί που βρίσκονται πίσω από τη ρύθμιση της δημιουργίας του άνθους είναι εξαιρετικά συντηρημένοι.

Από τη δεκαετία του '90 τα πρώτα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του άνθους κλωνοποιήθηκαν από τα φυτά μοντέλα *Arabidopsis thaliana* και *Antirrhinum majus*. Από τότε, τεράστια πρόοδος έχει γίνει προκειμένου να κατανοηθεί ο μηχανισμός της άνθισης και να καθοριστούν τα γενετικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη διαμόρφωση του άνθους (Theissen, 2001). Ο ρόλος αρκετών γονιδίων που ρυθμίζουν τη χωροταξική και χρονική έκφραση των γονιδίων ανθικής ταυτότητας έχει αποσαφηνιστεί. Επιπλέον, η ανακάλυψη των microRNAs που ελέγχουν αρκετά γονίδια ειδικά για τη μορφοποίηση του άνθους έχει αποκαλύψει ένα νέο επίπεδο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στην ανάπτυξη του άνθους. Επίσης, οι τεχνολογίες των μικροσυστοιχιών και ανοσοκαθίζησης χρωματίνης έχουν αξιοποιηθεί για την ταυτοποίηση γονιδίων στόχων των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη μορφοποίηση του άνθους. Η ανακάλυψη του ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη μορφοποίηση του άνθους δρουν σε πλήρως οργανωμένα σύμπλοκα, ανοίγει νέους δρόμους στη βιοχημική έρευνα (Krizek και Fletcher, 2005). Επιπρόσθετα, νέα γονίδια έχουν χαρακτηριστεί που πιθανώς εγκαθιδρύουν το πρότυπο της ανθικής μορφοποίησης, δημιουργούν τους ποικίλους κυτταρικούς τύπους και ιστούς των τεσσάρων τύπων οργάνων του άνθους και εμπλέκονται στον καθορισμό της τελικής μορφής τους. Η κατανόηση της άνθισης είναι επίσης ένα πεδίο υψηλής

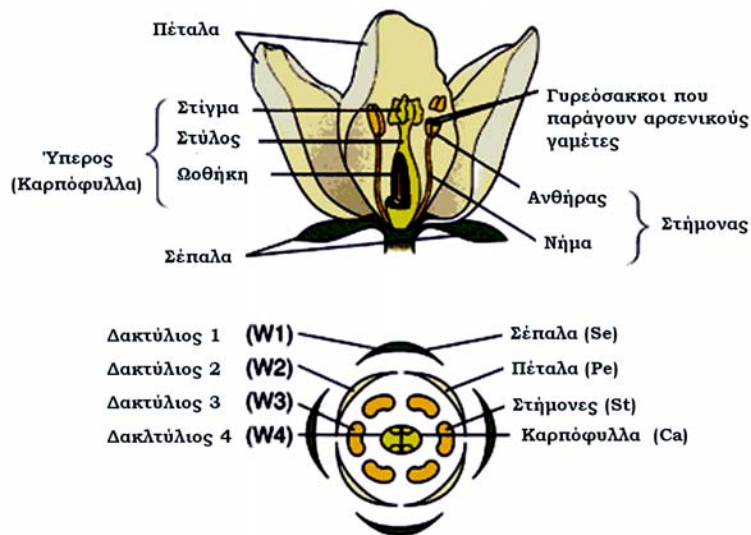
σημασίας για τη γεωργία, μιας και μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση χαρακτηριστικών όπως είναι η απόδοση του σπόρου και η ωρίμανση του καρπού.



Εικόνα 12: Τα φυτά μοντέλα *Arabidopsis thaliana* και *Antirrhinum majus*

Η ανάπτυξη των ανθοφόρων φυτών είναι μια καλά συντηρημένη ακολουθία από το έμβρυο μέχρι το πλήρες αναπτυγμένο φυτό μέσω συνεχών σχηματισμών οργάνων από τα μεριστώματα (Steeves και Sussex, 1989). Τα περισσότερα φυτικά έμβρυα, που στη συνέχεια θα δώσουν άνθη κατά την ανάπτυξη, υφίστανται ένα συντηρημένο σχέδιο κυτταρικών διαιρέσεων για να μορφοποιηθούν μια απλή δομή που αποτελείται από έναν ακτινωτό άξονα και από έναν κορυφαίο-βασικό άξονα (Jurgens, 2001). Ο ακτινωτός άξονας εγκαθιδρύει την εξωτερική επιδερμίδα, τον υποκείμενο φλοιό και τον κεντρικό προ-αγγειακό ιστό. Ο κορυφαίος άξονας καθορίζει το κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα, το οποίο αποτελείται από μια μικρή ομάδα βλαστικών κυττάρων που συνεχώς διαιρούνται και αναπληρώνονται (Fletcher, 2002). Τα βλαστικά κύτταρα παράγουν θυγατρικά κύτταρα που εκτοπίζονται στην περιφέρεια του μεριστώματος όπου εισέρχονται σε ειδικά μονοπάτια διαφοροποίησης. Μόνο ένας μικρός αριθμός οργάνων παράγονται κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης του φυτού. Κατά το φύτεμα όμως, το κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα ξεκινάει την παραγωγή αρχέγονων κυττάρων για τη δημιουργία φύλλων στις καταβολές κάτω από ένα καλά οργανωμένο πρότυπο. Μετά το πέρας της περιόδου της βλαστικής ανάπτυξης, όπου το φυτό μεγιστοποιεί τις φωτοσυνθετικές δραστηριότητες για την ανάπτυξή του, αρχίζει η ανάπτυξη των ανθέων μέσω ενός συνδυασμού ενδογενών και περιβαλλοντικών σιγιάλων. Κατά τη διάρκεια της ανθικής μετάβασης, το κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα μετατρέπεται σε αναπαραγωγικό μερίστωμα που παράγει τους δευτερογενείς ανθοφόρους και τα ξεχωριστά άνθη.

Τα περισσότερα άνθη αποτελούνται από τέσσερις διακριτούς τύπους οργάνων που εμφανίζονται σε ομόκεντρους κύκλους που ονομάζονται δακτύλιοι. Οι δύο εξωτερικοί δακτύλιοι περιέχουν σειρά όργανα και σχηματίζουν το περιάνθιο. Τα σέπαλα σχηματίζουν τον πρώτο δακτύλιο και αποτελούν την εξωτερική προστατευτική επικάλυψη του αναπτυσσόμενου άνθους. Τα πέταλα εμφανίζονται στο δεύτερο δακτύλιο και συχνά είναι μεγάλα και επιδεικτικά για να έλκουν τους επικονιαστές. Οι εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από όργανα που είναι υπεύθυνα για την αναπαραγωγή. Οι στήμονες εμφανίζονται στον τρίτο δακτύλιο και παράγουν γύρη, που εξελίσσεται στο αρσενικό γαμετόφυτο. Τα καρπόφυλλα, που είναι γνωστά και ως ύπερος, εμφανίζονται στο κέντρο και παράγουν τις ωθήκες που περιέχουν τα θηλυκά γαμετόφυτα, δηλαδή τον εμβρυόσακο. Συχνά τα καρπόφυλλα συμπύσσονται για να σχηματίσουν το γυναικείο. Μετά τη γονιμοποίηση, το γυναικείο αναπτύσσεται στον καρπό που φέρει τους σπόρους.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των ανθικών οργάνων και των ομοκεντρικών δακτυλίων που αποτελούν το άνθος στο *Arabidopsis thaliana*.

Η μορφοποίηση του άνθους συμβαίνει μέσω μιας σειράς διαδοχικών βημάτων. Πρώτα, καθορίζεται η τύχη του κορυφαιού μεριστώματος μέσω της δραστηριότητας των γονιδίων ανθικής ταυτότητας. Στη συνέχεια, το ανθικό μεριστώμα τροποποιείται σύμφωνα με το πρότυπο των δακτυλίων για τις καταβολές των οργάνων μέσω της δραστηριότητας των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ταυτότητα των οργάνων. Τρίτον, τα γονίδια αυτά ενεργοποιούν με τη σειρά τους άλλα γονίδια εξειδικευμένα στη δημιουργία των ιστών και των κυτταρικών τύπων που αποτελούν τους διαφορετικούς τύπους οργάνων του άνθους. Κάθε ένα από αυτά τα βήματα βρίσκεται κάτω από αυστηρό γενετικό έλεγχο και καθένα περιλαμβάνει περίπλοκα δίκτυα θετικών και αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων που επικαλύπτονται σε ποικίλα επίπεδα προκειμένου να ρυθμίσουν την μορφοποίηση του άνθους.

1.γ.2. Προγραμματίζοντας την ταυτότητα

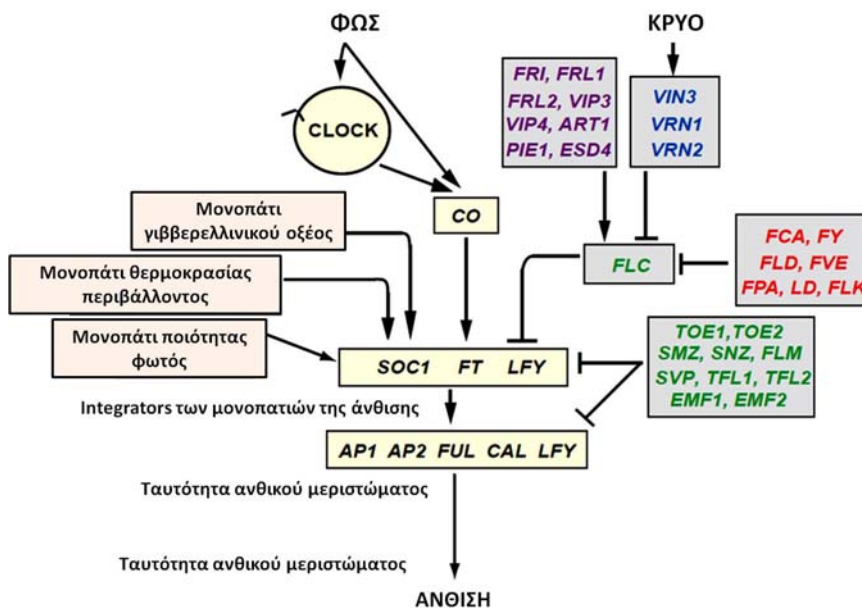
Η άποψη ότι τα άνθη αποτελούνται από τροποποιημένα φύλλα καταγράφηκε πρώτα στα κείμενα του Goethe (Goethe, 1790), αλλά από το '90 και μετά υπάρχουν αποδείξεις, φυσιολογικού και γενετικού περιεχομένου, που υποστηρίζουν την άποψη αυτή. Για παράδειγμα, προσεκτική μορφολογική παρατήρηση στο *Arabidopsis* έχει δείξει ότι οι ανθικές καταβολές εκδηλώνονται στις ίδιες καταβολές που παράγονταν τα φύλλα κατά τη βλαστική φάση ανάπτυξης. Κάτω από τις κατάλληλες επαγωγικές συνθήκες, οι καταβολές της βλαστικής φάσης μπορούν να μετατραπούν σε ανθικές καταβολές ή και να παράγουν χιμαιρικά όργανα (Long και Barton, 2000). Επίσης, υπάρχουν στη βιβλιογραφία αποδείξεις ότι μεταλλάξεις σε φυτά που αφορούν την ταυτότητα του ανθικού μεριστώματος (FMI, Floral Meristem Identity) έχουν ως αποτέλεσμα τα φυτά να συνεχίζουν να παράγουν φύλλα και βλαστούς ακόμα και μετά τη μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης.

Η ταυτότητα του ανθικού μεριστώματος αντιπροσωπεύεται από ένα σύνολο χαρακτηριστικών, με τη δημιουργία του άνθους να είναι ένα από αυτά και να αποτελείται από τουλάχιστον τέσσερις διακριτές διαδικασίες: τον καθορισμό της σωστής θέσης των αναδυόμενων καταβολών, τον καθορισμό του ορθού χρόνου για τη μορφοποίηση των ανθέων, την απόδοση ανθικής ταυτότητας στις καταβολές και την ανάπτυξη του άνθους με βάση το σωστό πρότυπο (Weigel, 1995). Παρόλο που θα περίμενε κανείς αυτές οι διαδικασίες να λαμβάνουν χώρα διαδοχικά ή μια μετά την άλλη, υπάρχουν πολλές αποδείξεις που υποστηρίζουν ότι υπάρχει λειτουργική

αλληλεπίδραση μεταξύ τους αποδίδοντας έτσι στο όλο σύστημα ευρωστία και προσαρμοστικότητα για το σχηματισμό των ανθέων (Blazquez et al., 2006).

1.γ.2.1. Κατασκευή του γενετικού δικτύου της άνθισης

Μελέτες στο *Arabidopsis* έχουν δείξει ότι η μετάβαση στην άνθιση ελέγχεται από πολύπλοκα γενετικά δίκτυα και ότι υπάρχουν τέσσερα βασικά αλληλοεξαρτώμενα μονοπάτια που παρακολουθούν την πληθώρα των φυσικών, χημικών και βιολογικών σιγνάλων/πληροφοριών για την έναρξη της άνθισης (Εικόνα 3). Τα μονοπάτια μεγάλης ημέρας και εαρινοποίησης ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικά σιγνάλα όπως είναι η ποιότητα του φωτός και η θερμοκρασία, ενώ το αυτόνομο μονοπάτι και το εξαρτώμενο από το γιββερελλικό οξύ ανταποκρίνονται στην ενδογενή αναπτυξιακή κατάσταση του φυτού (Moon et al., 2005).



Εικόνα 14: Το γενετικό ρυθμιστικό δίκτυο που ελέγχει την άνθιση στο *Arabidopsis*. Το βέλη υποδηλώνουν θετικές ρυθμιστικές σχέσεις ενώ οι μπάρες αρνητικές. Τα μονοπάτια της άνθισης ελέγχουν την έκφραση των κομβικών γονιδίων *Soc1*, *Ft* και *Leafy*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τα γονίδια μεριστωματικής ταυτότητας *Ap1* (*Apetala1*), *Ap2* (*Apetala2*), *Ful* (*Fruitfull*), *Cal* (*Cauliflower*) και *Leafy* που μετατρέπουν το βλαστικό μεριστώμα σε αναπαραγωγικό (Henderson και Dean, 2004).

1.γ.2.2. Μονοπάτι μεγάλης ημέρας

Προκειμένου να αντιληφθούν και να αντιδράσουν στις αλλαγές της φωτοπεριόδου, τα φυτά πρέπει να έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται τη διάρκεια του φωτός και να την συνδέουν με έναν εσωτερικό μηχανισμό που χρησιμεύει ως μετρητής της (κίρκαδικό ρολόι). Στο *Arabidopsis*, τα ιώδη/υπεριώδη φυτοχρώματα και τα UV/κυανά κρυπτοχρώματα που απορροφούν φως είναι οι κύριοι φωτο-υποδοχείς που εμπλέκονται στην αντίληψη του μήκους ημέρας (Boss et al., 2004). Η αντίληψη του φωτός από αυτούς τους υποδοχείς μηδενίζει το κίρκαδικό ρολόι ξανά και ξανά ώστε να παραμένει συγχρονισμένο με το περιβάλλον. Η λειτουργία αυτή ονομάζεται φωτοπεριοδισμός.

Η φωτοπερίοδος μεγάλης ημέρας έχει την ικανότητα να προάγει την άνθιση στο *Arabidopsis* μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα *Constans* (*Co*). Το *Co* διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην ερμηνεία των πληροφοριών που προέρχονται από το περιβάλλον προκειμένου να επιτευχθεί η αντίληψη του μήκους ημέρας. Είναι γονίδιο που απαιτείται για την ενεργοποίηση των κομβικών (*Integrators*)

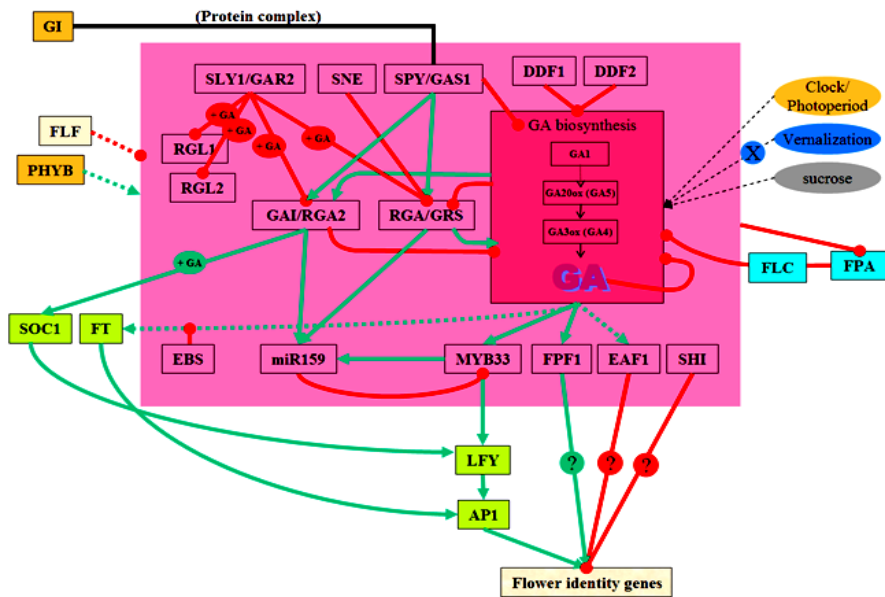
γονιδίων της άνθισης αλλά και για την απευθείας ενεργοποίηση του γονιδίου *Ft* (*Flowering Locus T*). Το mRNA του *Co* εκδηλώνει ρυθμική ημερήσια έκφραση που ελέγχεται από το κερκαδικό ρολόι και ρυθμίζεται μέσω διαφόρων φωτο-υποδοχέων που επιδρούν στη σταθερότητα της πρωτεΐνης του. Τα φυτοχρώματα και τα κρυπτοχρώματα είναι οι δύο ομάδες των φωτο-υποδοχέων: το *PhytochromeB* (*PhyB*) προάγει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του *CO*, ενώ τα *PhytochromeA* (*PhyA*), *Cryptochrome1* (*Cry1*) και *Cryptochrome2* (*Cry2*) την σταθεροποιούν. Αυτές οι ανταγωνιστικές δραστηριότητες έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του *CO* μόνο το βράδυ (Valverde et al., 2004).

Η πρωτεΐνη του *CO*, που είναι λειτουργική μόνο κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας, προάγει την άνθιση μέσω της άμεσης ενεργοποίησης των κομβικών γονιδίων της άνθισης, όπως είναι το *Suppressor of Overexpression of Constans1* (*Soc1*, ή αλλιώς *Agl20*) και *Ft*, αλλά και μέσω έμμεσης ενεργοποίησης του *Leafy*. Επίσης, σε μεταλλάξεις του *co* έχουμε καθυστερημένη άνθιση κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας, αλλά σε συνθήκες μικρής ημέρας η άνθιση λαμβάνει χώρα κανονικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν επηρεάζεται το αυτόνομο μονοπάτι.

1.γ.2.3. Μονοπάτι γιββερελλικού οξέος

Οι γιββερελλίνες (GAs) αποτελούν την οικογένεια γονιδίων που ρυθμίζει πολλές διαδικασίες της ανάπτυξης του φυτού. Στο σπόρο και στο μικρό φυτό είναι υπεύθυνες για την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, τη βλάστηση και την ανάπτυξη. Στο ώριμο φυτό είναι σημαντικές για την ανάπτυξη του φύλλου και του βλαστού, την άνθηση, την παραγωγή των ανθέρων και τον αριθμό των σπορίων (Pharis και King, 1985).

Μελέτες στο *Arabidopsis* έχουν δείξει ότι φυτά που είναι ανίκανα να συνθέσουν την ορμόνη γιββερελλικό οξύ (GA) δεν ανθίζουν όταν μεγαλώνουν σε συνθήκες μικρής ημέρας (Wilson et al., 1992). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι GAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της άνθησης σε συνθήκες μικρής ημέρας, ενώ σε συνθήκες μεγάλης ημέρας ο ρόλος τους δεν είναι πρωτεύουσας σημασίας αφού τα ίδια μεταλλάγματα απλώς καθυστερούν οριακά να ανθίσουν σε σχέση με του αγρίου τύπου (Reeves και Coupland, 2001). Έχει δειχθεί ότι ένας από τους λόγους που τα φυτά αδυνατούν να ανθίσουν σε συνθήκες μικρής ημέρας είναι γιατί δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν το γονίδιο μεριστωματικής ταυτότητας *Leafy* (Blazquez et al., 1998). Η επίδραση των GAs στο *Leafy* ασκείται μέσω μιας συγκεκριμένης περιοχής στον προαγωγέα του γονιδίου που αποτελεί περιοχή πρόσδεσης της GA-myb πρωτεΐνης (Blazquez και Weigel, 2000). Όταν η περιοχή αυτή μεταλλαχτεί τότε ο προαγωγέας του *Leafy* αδυνατεί να ενεργοποιηθεί το γονίδιο σε συνθήκες μικρής ημέρας, ενώ εξακολουθεί να ανταποκρίνεται στα μηνύματα της άνθισης όταν τα φυτά μεγαλώνουν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας.



Εικόνα 15: Μοντέλο των μονοπατιών προαγωγής της άνθισης μέσω των γιββερελλινών ορμονών στο *Arabidopsis*.

Επίσης, συνεχόμενη έκφραση του *Leafy* σε φυτά με μεταλλαγμένο το γονίδιο υπεύθυνο για τη σύνθεση των γιββερελλινών (*ga1-3*) έχει την ικανότητα να προάγει την άνθιση (Blazquez et al., 1998), κάτι που συμβαίνει και όταν εκφράζεται συνεχώς το γονίδιο *Soc1*. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι GAs επάγουν την άνθιση σε συνθήκες μικρής ημέρας μέσω της ρύθμισης των *Leafy* και *Soc1* και ότι ο έλεγχος των δύο αυτών γονιδίων είναι εν μέρει ανεξάρτητος (Moon et al., 2003).

1.γ.2.4. Αυτόνομο μονοπάτι

Το αυτόνομο μονοπάτι απαιτείται στα φυτά προκειμένου να αποτραπεί η άνθιση πριν το φυτό ολοκληρώσει την βλαστική του ανάπτυξη. Χωρίς το αυτόνομο μονοπάτι οι βλαστοί που αναπτύσσονται, μόλις βγουν από το κώμα, θα άνθιζαν αμέσως εάν οι περιβαλλοντικές συνθήκες το επέτρεπαν.

Το αυτόνομο μονοπάτι ονομάστηκε έτσι λόγω της έλλειψης συμμετοχής του είτε στο μονοπάτι μεγάλης ημέρας είτε στο μονοπάτι γιββερελλικού οξέος. Τα γονίδια που περιλαμβάνει το μονοπάτι αυτό δεν λειτουργούν σε μια γραμμική σειρά αλλά υπάρχουν πολλές υποομάδες που έχουν όλες έναν κοινό στόχο, το γονίδιο *Flc* (*Flowering Locus C*). Το αυτόνομο μονοπάτι προάγει την άνθιση ανεξάρτητα από τα σιγάλα που δέχεται το φυτό από το περιβάλλον καταστέλλοντας την έκφραση του *Flc* το οποίο λειτουργεί ως καταστολέας της άνθισης (Michaels και Amasino 2001).

Μεταλλάξεις που εκδηλώνουν φαινότυπο καθυστερημένης άνθισης κάτω συνθήκες μεγάλης αλλά και μικρής μέρας έκαναν δυνατή την ταυτοποίηση γονιδίων του μονοπατιού αυτού. Τα βασικά γονίδια που χαρακτηρίστηκαν είναι τα: *Flowering locus A (Fca)*, *Fpa*, *Fve* και *Luminidependens (Ld)*. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μεταλλάξεων είναι η συσσώρευση mRNA του γονιδίου *Flc*, υποδηλώνοντας ότι ο ρόλος των γονιδίων αυτών έγκειται στην καταστολή της έκφρασης του *Flc* (Twyman, 2003). Το γονίδιο *Flc* κωδικοποιεί για έναν MADS-box μεταγραφικό παράγοντα που παρεμποδίζει, μάλλον έμμεσα, την έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Ενώ το *Ld* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, τα *Fca* και *Fpa* κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που προσδένονται σε RNA. Τα προϊόντα αυτά ίσως να ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του *Flc* και σε μεταγραφικό και σε μετά- μεταγραφικό επίπεδο. Ενώ τα προαναφερόμενα γονίδια προάγουν την άνθιση, το γονίδιο *Early Flowering in Short days (Efs)*

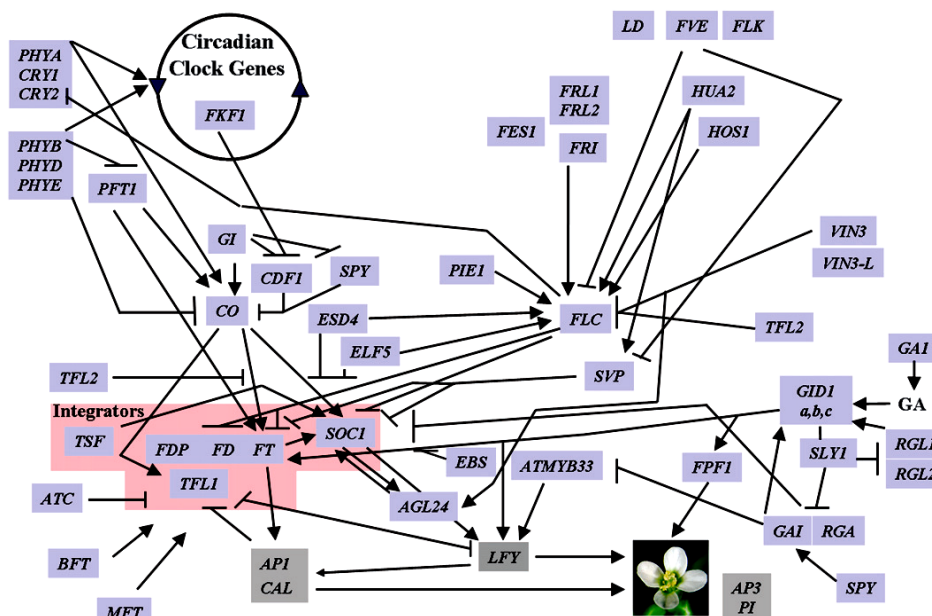
κωδικοποιεί για έναν καταστολέα της άνθισης στο αυτόνομο μονοπάτι, μιας και δεν παρατηρείται φαινότυπος πρόωρης άνθισης σε μεταλλάγματα που μεγαλώνουν σε συνθήκες μικρής ημέρας.

1.γ.2.5. Μονοπάτι εαρινοποίησης

Μια μεγάλη περίοδος χαμηλών θερμοκρασιών (κάτω από 10°C) προάγει την άνθιση σε πολλά φυτικά είδη και σε ορισμένους οικότυπους του *Arabidopsis*. Αποτελεί μια πολύ χρήσιμη στρατηγική αναπαραγωγής λόγω της αναβολής που προκαλεί στην άνθιση μέχρι να έρθει η άνοιξη. Αυτή η απόκριση εαρινοποίησης είναι επιστατική του αυτόνομου μονοπατιού, δηλαδή η εαρινοποίηση υπερνικά το φαινότυπο καθυστερημένης άνθισης των *fca*, *fpa* και *ld* μεταλλαγμάτων (Twyman, 2003).

Μόλις αποκτηθεί, η κατάσταση της εαρινοποίησης «απομνημονεύεται» από το φυτό κατά τη διάρκεια της μετέπειτα ανάπτυξης, ενδεικτικό ενός επιγενετικού τρόπου δράσης. Αρκετές πρωτεΐνες που αυτόνομου μονοπατιού δρουν παράλληλα με αυτό της εαρινοποίησης καταστέλλοντας το *Flc* γονίδιο (Henderson και Dean, 2004).

Η μοριακή βάση αυτής της παρατήρησης έγκειται στη διασταύρωση των μονοπατιών εαρινοποίησης και αυτόνομου στο *Flc* γονίδιο. Η έκφραση του *Flc* ρυθμίζεται αρνητικά σε χαμηλές θερμοκρασίες και αν και δεν έχουν χαρακτηριστεί άμεσοι ρυθμιστικοί παράγοντες, ένα σημαντικό γονίδιο ελέγχου στο μονοπάτι αυτό είναι το *Fri* (*Frigida*). Σε φυσικούς οικότυπους καθυστερημένης άνθισης, το *Fri* προάγει τη συσσώρευση mRNA του γονιδίου *Flc*, ενώ κατά τη διάρκεια της εαρινοποίησης λειτουργεί για να μειώσει την έκφρασή του *Flc*. Η αρνητική ρύθμιση του *Flc* διατηρείται ακόμα και όταν ανεβεί η θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη λειτουργία του γονιδίου *Vrn2* (*Vernalization Response 2*), το οποίο κωδικοποιεί για μια πυρηνική πρωτεΐνη της οικογένειας Polycomp που έχει την ικανότητα να διατηρεί τη δομή της χρωματινής σταθερή κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η καταστολή του γονιδίου *Flc* εγκαθίσταται μέσω διαδικασιών που εξαρτώνται από την καταστολή της δραστηριότητας του *Fri*, αλλά διατηρείται μέσω ενός επιγενετικού τρόπου ρύθμισης. Επίσης, ο επιγενετικός έλεγχος του χρόνου άνθισης στο *Arabidopsis* επιβεβαιώνεται και από παρατηρήσεις μεταλλαγμάτων σε γονίδια που ελέγχουν τη μεθυλίωση του DNA στο φυτό, που και αυτά εκδηλώνουν φαινότυπο καθυστερημένης άνθισης (Twyman, 2003).



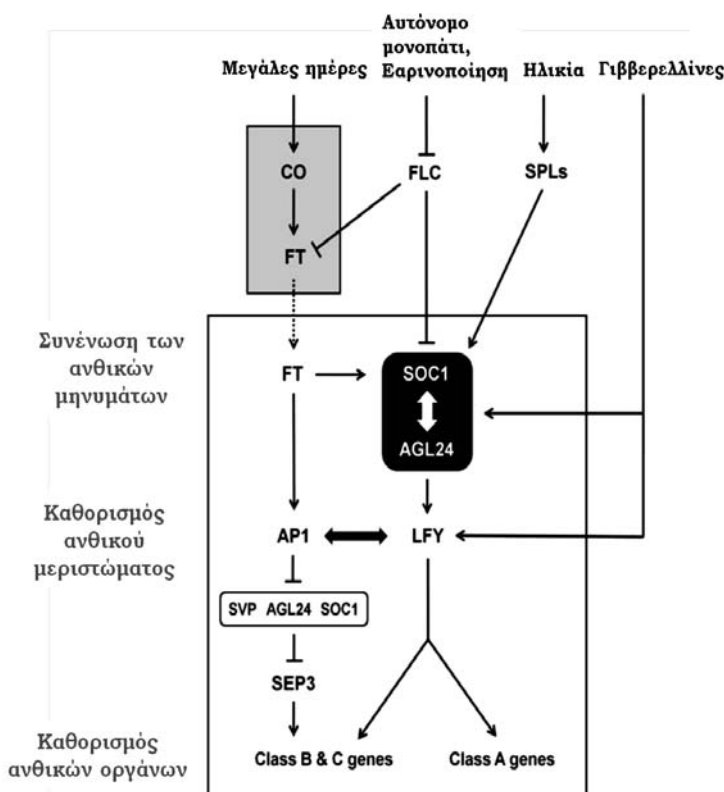
Εικόνα 16: Το γενετικό δίκτυο του χρόνου άνθισης. Τα γονίδια που εμπλέκονται προκειμένου να ολοκληρωθεί ο μηχανισμός της άνθισης καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους εμφανίζονται με μπλε. Με γκρι εμφανίζονται γονίδια που λειτουργούν στα αρχικά στάδια του ABCDE μοντέλου και είναι απαραίτητα για τον καθορισμό της ταυτότητας του ανθικού μεριστώματος (Ehrenreich et al., 2009).

1.γ.3. Κομβικά γονίδια των μονοπατιών της άνθισης

1.γ.3.1. SOC1

Το γονίδιο *Soc1* (ή αλλιώς *Agl20* ή *Suppressor of CO Overexpression*) κωδικοποιεί για ένα MADS-box μεταγραφικό παράγοντα και είναι συντηρημένο μεταξύ των Αγγειοσπέρμων, τόσο στα Μονοκοτυλήδονα όσο και στα Δικοτυλήδονα (Lee et al., 2008). Ονομάστηκε έτσι γιατί το *Soc1* μετάλλαγμα δεν απομονώθηκε από γενετική σάρωση για μεταλλάγματα που καθυστερούν στο χρόνο άνθισης, αλλά από μια ανεξάρτητη μελέτη σάρωσης για καταστολείς της έκφρασης του γονιδίου *Constans* (*Co*) (Samach et al., 2000). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το *Soc1* κωδικοποιεί για μια πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη που ρυθμίζει όχι μόνο το χρόνο άνθισης αλλά και το ανθικό πρότυπο και τον καθορισμό της ανθικής ταυτότητας του μεριστώματος (Melzer et al., 2008), δράσεις που έχουν πιστοποιηθεί πειραματικά και σε άλλα φυτικά είδη πέρα του *Arabidopsis*. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το *Soc1* πιθανώς να διαδραματίζει ρόλο γενικού ρυθμιστή στην οργανογένεση του φυτού (Lee και Lee, 2010).

Το γονίδιο εκφράζεται κυρίως στα φύλλα και στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα, με την έκφραση του να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου και να παρατηρείται απότομη αύξηση στο μερίστωμα κατά την ανθική μετάβαση. Η έκφραση του *Soc1* απουσιάζει από το στάδιο 1 του ανθικού μεριστώματος και ξανά-εμφανίζεται στο κέντρο παλαιότερων ανθικών μεριστωμάτων.



Εικόνα 17: Η δραστηριότητα του *Soc1* ανιχνεύεται σε πολλά μονοπάτια της άνθισης (μεγάλης ημέρας, αυτόνομο, εαρινοποίησης) τα οποία συνδέει και συνδυάζει προκειμένου να επαχθεί η άνθηση. Επίσης δέχεται μηνύματα που προέρχονται από την ηλικία του φυτού και τις γιββερελλίνες. Το *Soc1* αλληλεπιδρά με το *Agl24* και ρυθμίζουν θετικά το ένα το άλλο μέσω μια κλειστής κυκλικής ρύθμισης (μαύρο κουτί). Όταν τα δύο γονίδια εκφράζονται στο κορυφαίο μερίστωμα ενεργοποιούν το *Leafy*, που είναι γονίδιο ανθικής ταυτότητας του μεριστώματος. Στη συνέχεια το *Leafy* ξεκινά την ανάπτυξη των οργάνων του άνθους επάγοντας γονίδια της Α τάξης. Επιπρόσθετα με τη ρύθμιση του χρόνου άνθισης τα *Soc1* και *Agl24* εμπλέκονται και στην καταστολή πρόωρης ανάπτυξης ανθικών οργάνων μέσω της καταστολής του *Sep3*, γονιδίου που απαιτείται για την ενεργοποίηση γονιδίων της Β και C τάξης. Με αυτόν τον τρόπο τα *Soc1* και *Agl24* διασφαλίζουν ότι η επαγωγή της

άνθισης και η ανάπτυξη του άνθους θα λάβουν χώρα στο σωστό χρόνο και χώρο. Το γκρι κουτί αντιπροσωπεύει τον αγγειακό ιστό του φύλλου όπου συμβαίνει η επαγωγή του *Ft* από το *Co* (Lee και Lee, 2010).

1.γ.3.2. AGL24

Η πολυμελής οικογένεια των MADS-box μεταγραφικών παραγόντων στο *Arabidopsis* διαδραματίζει πρωτεύον ρόλο στη μετάβαση από τη βλαστική στην ανθική φάση ανάπτυξης. Το γονίδιο *Agl24* (*Agamous-like 24*) είναι μέλος μιας γονιδιακής οικογένειας που έχει βρεθεί ότι προάγει την άνθιση (Michaels et al., 2003). Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα και ρυθμίζεται θετικά στο αναπαραγωγικό πλέον μερίστωμα κατά την ανθική μετάβαση. Μελέτες με τη χρήση κατάλληλων διαγονιδιακών κατασκευών έχουν δείξει ότι σε *35S:Agl24* και *Agl24RNAi* σειρές η θετική ρύθμιση της έκφρασης του *Agl24* οδηγεί σε πρόωμη άνθιση και ότι ελάττωση της έκφρασης του *Agl24* οδηγεί σε καθυστερημένη άνθιση. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι το *Agl24* αποτελεί προαγωγέα της άνθισης με την ποσότητά του να διαδραματίζει περιοριστικό παράγοντα (Liu et al., 2008).

Η έκφραση του *Agl24* ανιχνεύεται ελάχιστα στο κέντρο των αναδυόμενων ανθικών μεριστωμάτων και είναι παρούσα στα ανθικά αναπαραγωγικά όργανα στα επόμενα στάδια σχηματισμού των ανθέων (Yu et al., 2004). Απευθείας καταστολή του γονιδίου από άλλα γονίδια ελέγχου του χρόνου άνθισης, όπως είναι το *Soc1* και το *Svp*, ή από το *Ap1*, που είναι γονίδιο μεριστωματικής ταυτότητας, έχει ως αποτέλεσμα το φυτό να μην μπορεί να συνεχίσει το αναπτυξιακό του σχέδιο. Τα δεδομένα αυτά συνεισφέρουν στην άποψη ότι το *Agl24* συμβάλλει στον προσδιορισμό της ταυτότητας του ανθικού μεριστώματος (Liu et al., 2008). Επίσης, πολύ σημαντικές είναι οι μελέτες που υποδεικνύουν ότι η AGL24 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τη SOC1 στο κορυφαίο μερίστωμα κατά τη μετάβαση από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης και ότι ρυθμίζουν θετικά το ένα το άλλο (Liu et al., 2008). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το συνδυασμό διαφόρων μηνυμάτων που αντιλαμβάνονται οι δύο αυτές πρωτεΐνες ρυθμίζοντας θετικά την ίδια τους την έκφραση ως ενός ποσοτικού ορίου που φαίνεται ότι απαιτείται για τη μετάβαση του κορυφαίου μεριστώματος από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης.

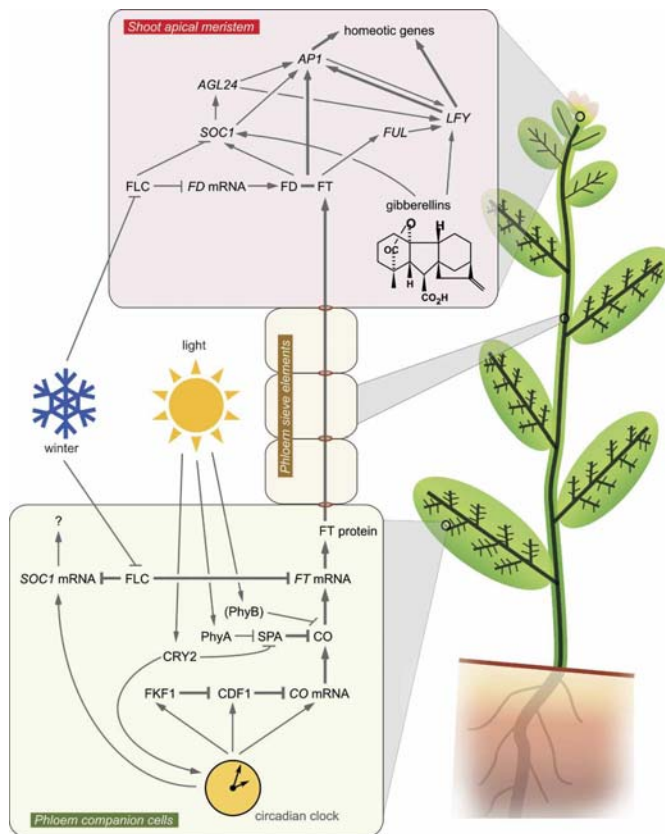
1.γ.3.3. FT

Το μονοπάτι της φωτοπερίόδου στο *Arabidopsis* αρχικά καθορίστηκε βάσει μεταλλαγμάτων που παρουσίαζαν φαινότυπο καθυστερημένης άνθησης. Παραδείγματα τέτοιων μεταλλαγμάτων αποτελούν τα μεταλλάγματα των *gigantea* (*gi*), *constans* (*co*) και *ft* (*flowering locus t*). Έχει δειχθεί ότι το *Gi* κωδικοποιεί για μια μεγάλη πυρηνική πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας που απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του *Co* (Suarez-Lopez et al., 2001). Είναι γνωστό ότι το *Co* κωδικοποιεί για μια πυρηνική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του *Ft* και του *Soc1*. Όσον αφορά το *Ft*, το *Co* επάγει την έκφραση του mRNA του *Ft* στον ιθμαγγειώδη ιστό των κοτυληδόνων και των φύλλων του *Arabidopsis* κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας (Abe et al., 2005). Η πρωτεΐνη FT, που παράγεται στο φλοιώμα, μετακινείται προς το κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα όπου απαιτείται προκειμένου να επαχθεί η διαδικασία της μετάβασης στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης και να ξεκινήσει η άνθιση.

Βέβαια, το *Ft* είναι ένα γονίδιο που δέχεται σιγνάλα της άνθησης όχι μόνο από το μονοπάτι μεγάλης ημέρας, αλλά και από τα υπόλοιπα (εαρινοποίησης, αυτόνομο και μονοπάτι γιββερελινών). Μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν ως αποτέλεσμα

ισχυρό φαινότυπο καθυστερημένης άνθισης, ενώ υπερέκφραση του γονιδίου οδηγεί σε πρόωρη άνθιση, ανεξάρτητη από το μήκος ημέρας και τη θερμοκρασία (Blazquez et al., 2003). Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο *Ft* ενεργοποιείται από το *Co* στο μονοπάτι της φωτοπερίόδου, ενώ στα μονοπάτια εαρινοποίησης και αυτόνομο το γονίδιο *Flc* ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του *Ft* (Herpworth et al., 2002).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του γονιδίου που δείχνει τη σημαντικότητά του ως κομβικό γονίδιο της άνθισης είναι η ρύθμισή του μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση του *Ft* επηρεάζεται από τροποποιήσεις των ιστονών. Η θέση στο χρωμόσωμα όπου βρίσκεται το *Ft* φαίνεται να εμπλουτίζεται με τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 7 (H3K27), που οδηγεί στην απενεργοποίηση του γονιδίου, ενώ μείωση της έκφρασης του συμπλόκου Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της τριμεθυλίωσης της H3K27 μέσα στη χρωματινική περιοχή του *Ft* και κατά συνέπεια την απελευθέρωση της έκφρασής του (Jiang et al., 2008). Επίσης, καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *Lhp1* (Like Heterochromatin Protein 1), που έχει την ικανότητα να προσδένεται στην H3K27 και να προκαλεί σίγαση της χρωματινής, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του *Ft* (Takada και Goto, 2003).



Εικόνα 18: Κομβικές ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις στο φύλλο και στο κορυφαίο μεριστώμα του *A.thaliana*. Οι συνεχείς γραμμές αντιπροσωπεύουν απευθείας αλληλεπιδράσεις (ρύθμιση των επιπέδων του mRNA αναφέρεται σε μεταγραφικό έλεγχο). Το φως κατέχει διπλό ρόλο: ρυθμίζει το κικκαδικό ρολόι και διατηρεί τη σταθερότητα της πρωτεΐνης του CO. Υπάρχει κυτταρική συνέχεια από το φλοιώμα στο κορυφαίο μεριστώμα που παρέχεται από τις ενδοκυτταρικές συνδέσεις μέσω των πλασμοδεσμάτων. Κατά τη διάρκεια της βλαστικής φάσης ανάπτυξης το κορυφαίο μεριστώμα παράγει φύλλα. Μετά την επαγωγή της άνθισης αλλάζει χαρακτήρα και παράγει άνθη (Kobayashi και Weigel, 2007).

1.γ.4. Γονίδια μεριστωματικής ταυτότητας

Η ταυτοποίηση των θεμελιωδών παραγόντων που ελέγχουν την ταυτότητα του ανθικού μεριστώματος απασχολεί πολλά χρόνια τους ερευνητές, οι οποίοι προσπαθούν μέσα από μελέτη μεταλλάξεων να χαρακτηρίσουν τα γονίδια αυτά. Με άλλα λόγια, τα κύρια στοιχεία που έχουμε μέχρι σήμερα σχετικά με την εμπλοκή συγκεκριμένων πρωτεϊνών στον καθορισμό της ταυτότητας του μεριστώματος στηρίζεται σε μελέτες μεταλλάξεων που έχουν να κάνουν με καταστολή της δράσης ενός γονιδίου

ή υπερέκφρασή του. Μέσω των πειραμάτων που έχουν γίνει μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί μια μικρή ομάδα γονιδίων που αναφέρονται ως γονίδια ταυτότητας μεριστώματος και θα αναλυθούν παρακάτω.

1.γ.4.1. LEAFY

Το γονίδιο *Leafy* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του άνθους και χαρακτηρίζεται ως γονίδιο χρόνου άνθισης αλλά και ως γονίδιο ταυτότητας μεριστώματος. Κατ' αρχήν, διαμεσολαβεί στα επαγωγικά μηνύματα της άνθισης, συμπεριλαμβανομένων των φωτοπεριοδικών μηνυμάτων μέσω του *Ft* αλλά και των γιββερελινών, που το δίνουν το ρόλο του κομβικού γονιδίου της άνθισης. Επίσης, καθορίζει την ταυτότητα του ανθικού μεριστώματος. Η έκφρασή του προηγείται της ανθικής μετάβασης. Ανιχνεύεται πρώτα σε νεαρές καταβολές φύλλων και αυξάνεται η έκφρασή του μέχρι να φτάσει τη μέγιστη τιμή στα νεαρά ανθικά μεριστώματα (Blazquez et al., 1997). Φυτά όπου το γονίδιο εκφράζεται συνεχώς έχουν την ικανότητα να ανθίζουν νωρίτερα (Blazquez et al., 1997), ενώ φυτά στα οποία έχει σιγάσει το γονίδιο παράγουν φύλλα ή βλαστούς στις καταβολές που κανονικά θα έπρεπε να παράγουν άνθη (Weigel et al., 1992), δείχνοντας έτσι ότι το γονίδιο *Leafy* συμμετέχει στον καθορισμό του χρόνου άνθισης. Δομές παραπλήσιες με άνθος εμφανίζονται τελικά στους ανθοφόρους βλαστούς των *Leafy* μεταλλαγμάτων πιθανώς λόγω της έκφρασης του *Ap1*, ενός άλλου γονιδίου ταυτότητας ανθικού μεριστώματος, που μπορεί να ενεργοποιηθεί ανεξάρτητα από το *Leafy* (Weigel και Meyerowitz, 1994). Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι το *Leafy* γονίδιο δεν είναι μόνο απαραίτητο αλλά και επαρκές για να αποδώσει ανθική ταυτότητα στις ανερχόμενες καταβολές μιας και εκτοπική και συνεχής έκφρασή του στο *Arabidopsis* έχει ως αποτέλεσμα τον πρόωρο μετασχηματισμό φύλλων και πλευρικών βλαστών σε άνθη αγρίου τύπου (Weigel και Nilsson, 1995). Το *Leafy* φαίνεται να λειτουργεί ως κομβικός αποδέκτης των σιγνάλων των μονοπατιών της άνθισης αφού ελέγχει όχι μόνο το χρόνο άνθισης αλλά και την έναρξη της μετάβασης της ταυτότητας του κορυφαίου μεριστώματος.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *Leafy* έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα και είναι συντηρημένη μόνο στα φυτά (Blazquez et al., 1997). Επίσης, παρόλο που οι μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν σε οικογένειες, το γονίδιο *Leafy* δεν ανήκει σε κάποια οικογένεια. Η πρωτεΐνη φαίνεται να τοποθετείται κυρίως στον πυρήνα αλλά LEAFY-GFP συντηγμένες πρωτεΐνες τοποθετούνται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στις κοιλότητες των πλασμοδεσμάτων. Η LEAFY πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να μετακινείται από το ένα κύτταρο στο άλλο μέσω των πλασμοδεσμάτων, χωρίς ακόμα βέβαια να έχει εξακριβωθεί ο λόγος της μετακίνησης. Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα μετακίνησης της LEAFY πρωτεΐνης δημιουργήθηκε κατασκευή καθοδηγούμενη από προαγωγέα ειδικό της L1 στοιβάδας του κορυφαίου μεριστώματος του *Arabidopsis*. Η δράση της πρωτεΐνης δεν ανιχνεύτηκε μόνο στην L1 στοιβάδα αλλά σε όλο το ανθικό μερίστωμα (Wu et al., 2003). Επίσης, τα κανονικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο κορυφαίο μερίστωμα έχουν τεράστια σημασία καθώς φαίνεται ότι καθορίζουν τη χρονική στιγμή όπου θα λάβει χώρα η ανθική μετάβαση (Blazquez et al., 1997).

Έχει δειχθεί ότι η LEAFY πρωτεΐνη προσδένεται σε συγκεκριμένες ακολουθίες που βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων *Ap1* (*Apetala 1*), *Ap3* (*Apetala 3*) και *Ag* (*Agamous*). Επίσης, φαίνεται ότι το *Leafy* γονίδιο εκφράζεται αρκετά σταθερά και στα αναπτυσσόμενα κλειστά άνθη γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη σταθερή έκφραση του προαγωγέα του αλλά και στην ικανότητά του να μετακινείται μεταξύ των κυττάρων (Blazquez et al., 2006).

1.γ.4.2. AP1

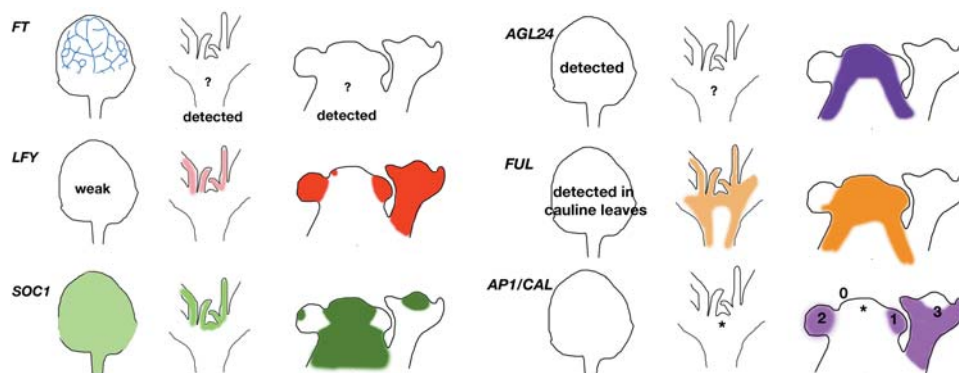
Το γονίδιο *Ap1* ανήκει και αυτό στην οικογένεια των MADS-box μεταγραφικών παραγόντων και διαδραματίζει διπλό ρόλο κατά την άνθιση. Ενεργοποιείται απευθείας από το *Leafy* ή από *Ft* (Wigge et al., 2005), συμμετέχει στον καθορισμό της ταυτότητας του ανθικού μεριστώματος και επίσης λειτουργεί και ως γονίδιο A τάξης κατά το σχηματισμό του άνθους, συμμετέχοντας έτσι στον καθορισμό της ταυτότητας των οργάνων του περιάνθιου (Wagner et al., 1999).

Η έκφραση του *Ap1* εντοπίζεται στα νεαρά ανθικά μεριστώματα, λίγο μετά την εμφάνιση του *Leafy*. Ο φαινότυπος φυτών που εκφράζουν συνεχώς το γονίδιο είναι ανάλογος με το ρόλο του ως γονίδιο μεριστωματικής ταυτότητας. Τα *35S:AP1* φυτά ανθίζουν πρόωρα και εμφανίζουν μετατροπές των βλαστών σε άνθη, φαινότυπος που είναι παρόμοιος με αυτόν που παρουσιάζουν τα *35S:Leafy* διαγονιδιακά φυτά (Mandel και Yanofsky, 1995).

1.γ.4.3. CAL

Άλλο ένα γονίδιο της οικογένειας των MADS-box μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχει στον προσδιορισμό της ταυτότητας του μεριστώματος είναι το *Cal*. Παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με το γονίδιο *Ap1* καθώς και παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στο κορυφαίο μεριστώμα. Παρόλο που μεταλλάξεις του γονιδίου δεν εμφανίζουν κάποιο διακριτό φαινότυπο σε σχέση με τον άγριο τύπο στο *Arabidopsis*, διπλά μεταλλάγματα *cal* και *ap1* προκαλούν πλήρες μετασχηματισμό των ανθικών μεριστωμάτων σε μεριστώματα σχεδόν αναπαραγωγικού τύπου από τα οποία προκύπτουν άλλα παρόμοια μεριστώματα. Επιπρόσθετα, συνεχόμενη έκφραση του *Cal* εμφανίζει παρόμοιο αλλά πιο αδύνατο φαινότυπο σε σχέση με αυτόν των *35S:AP1* φυτών (Liljegren et al., 1999).

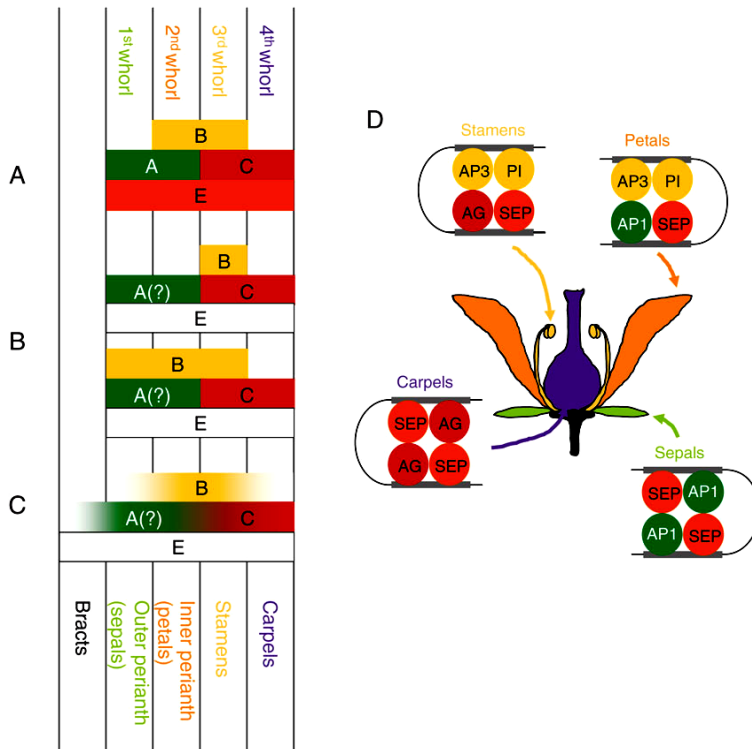
Η χρησιμότητα των γονιδίων *Ap1/Cal* για τον προσδιορισμό της ταυτότητας του ανθικού μεριστώματος έχει παρατηρηθεί μόνο στο *Arabidopsis* και σε άλλα μέλη της οικογένειας των *Brassicaceae*. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με αποτελέσματα φυλογενετικών μελετών που δείχνουν ότι τα γονίδια *Cal* και *Ap1* πιθανώς να προέρχονται από ένα πρόσφατο γεγονός διπλασιασμού, που απαντάται μόνο στην οικογένεια των *Brassicaceae* (Lawton-Rauh et al., 1999).



Εικόνα 19: Γενικά πρότυπα έκφρασης γονιδίων διαμεσολαβητών της άνθησης και μερικών σημαντικών ρυθμιστών. Απεικονίζονται ένα φύλλο, ένα βλαστικό και ένα ανθικό μεριστώμα. Το χρώμα αντιπροσωπεύει πρότυπο mRNA (ή GUS καθοδηγούμενο από τον προαγωγέα του γονιδίου) έκφρασης για το γονίδιο που υποδεικνύεται. Ο όρος 'detected' δηλώνει ότι έχει ανιχνευτεί έκφραση του γονιδίου χωρίς όμως να είναι γνωστό το πρότυπο έκφρασης. Αύξηση της έντασης του χρώματος από το βλαστικό στο ανθικό μεριστώμα, υποδηλώνει αύξηση της έκφρασης του γονιδίου. Το αστεράκι υποδηλώνει το κορυφαίο μεριστώμα και οι αριθμοί τα στάδια του ανθικού μεριστώματος (Parcy, 2005).

1.γ.5. Το μοντέλο ABCDE

Το μοντέλο ABC επισημαίνει το γεγονός ότι η ταυτότητα των ανθικών οργάνων προσδιορίζεται από τρεις ομάδες γονιδιακών λειτουργιών (A, B και C) που δρουν σε συνδυασμό: τα γονίδια της A τάξης όταν λειτουργούν αυτόνομα καθορίζουν την ταυτότητα των σεπάλων, η A τάξη σε συνδυασμό με τη B ελέγχει την ταυτότητα των πετάλων, η B τάξη σε συνδυασμό με τη C ελέγχει την ταυτότητα των στήμονων και η C τάξη όταν δρα αυτόνομα ελέγχει την ταυτότητα των καρπόφυλλων.



Εικόνα 20: Μοντέλα του γενετικού ελέγχου της ταυτότητας των ανθικών οργάνων και το ABCE μοντέλο. A) το κλασικό ABCE (Coen και Meyerowitz, 1991). B) Το μοντέλο των κυλιόμενων ορίων (Kramer et al., 2003). C) Το μοντέλο με τα μη καθορισμένα όρια (Buzgo et al., 2004). D) το τετραπλό μοντέλο του καθορισμού της ταυτότητας των οργάνων στο *Arabidopsis* (Kaufmann et al., 2005).

Έχουν ταυτοποιηθεί πολλά γονίδια που διαδραματίζουν κύριο ρόλο στον καθορισμό της ταυτότητας των οργάνων του άνθους στο *Arabidopsis* αλλά και στο *Antirrhinum*. Στο *Arabidopsis*, τα γονίδια *Ap1* και *Ap2* είναι γονίδια της A τάξης, το *Ap3* και *Pistillata (Pi)* είναι γονίδια B τάξης και το *Agamous (Ag)* ανήκει στην C τάξη. Τα αντίστοιχα γονίδια για το *Antirrhinum* είναι τα: *Squamosa* για το *Ap1*, *Lipless 1* και *2* για το *Ap2*, *Deficiens (Def)* και *Globosa (Glo)* για τα *Ap3* και *Pi* αντίστοιχα, και το *Plena (Ple)* που αποτελεί γονίδιο της C τάξης (Soltis et al., 2007).

Όλα αυτά τα γονίδια με εξαίρεση το *Ap2* ανήκουν στην οικογένεια των MADS-box μεταγραφικών παραγόντων, που είναι μια ευρεία οικογένεια ευκαρυωτικών γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι περιέχουν μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του DNA. Η οικογένεια αυτή χωρίζεται σε δυο τύπους, I και II, οι οποίοι απαντώνται και οι δυο όχι μόνο στα φυτά αλλά στους μύκητες και στα ζώα.

Το ABC μοντέλο έχει τροποποιηθεί με την ταυτοποίηση επιπρόσθετων μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την ταυτότητα του σχηματισμού της ωθήκης (Colombo et al., 1995) και ονομάζονται γονίδια D τάξης. Επίσης έχουν προστεθεί και εκείνα τα γονίδια που συνεισφέρουν στην ταυτότητα των σεπάλων, πετάλων, στήμονων και καρπόφυλλων και ονομάζονται γονίδια E τάξης (Pelaz et al., 2000). Τα γονίδια της E τάξης στο *Arabidopsis* είναι τα *Sepallata 1*, *2*, *3* και *4*. Οι SEP πρωτεΐνες σε

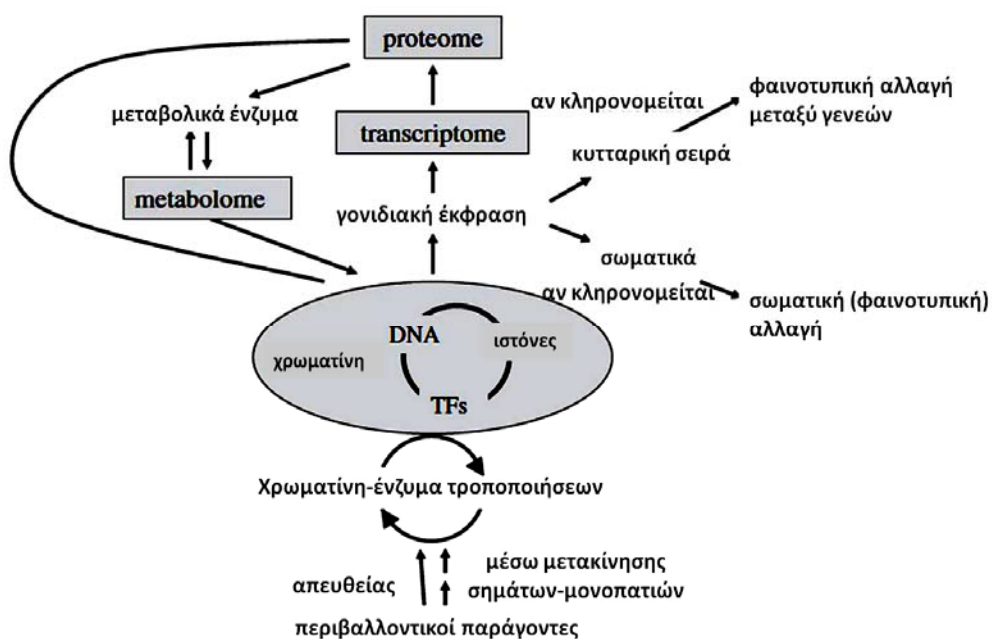
συνδυασμό με τις πρωτεΐνες του ABC μοντέλου απαιτούνται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των οργάνων του άνθους. Σύμφωνα με μελέτες στο *Arabidopsis*, για το σχηματισμό των σεπάλων απαιτείται ο συνδυασμός των A και E τάξεων, για τα πέταλα ο συνδυασμός των A, B και E τάξεων, για τους στήμονες ο συνδυασμός των B, C και E τάξεων και για τα καρπόφυλλα ο συνδυασμός των C και E τάξεων.

1.6. Επιγενετική

1.6.1. Γενικά

Ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει φαινόμενα όπου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενότυπου και περιβάλλοντος μπορεί να παράγουν νέους φαινότυπους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Waddington, 1942).

Σήμερα, ο όρος επιγενετική αναφέρεται πιο ειδικά στη μελέτη κληρονομήσιμων τροποποιήσεων στην έκφραση των γονιδίων ή του φαινότυπου των κυττάρων χωρίς αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA, που μπορούν να τροποποιηθούν από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Holliday, 1994). Η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνεται με μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ή παραλλαγές των ιστονών της χρωματίνης, αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και μπορεί επίσης να περιλαμβάνει και μικρά RNAs. Η μεθυλίωση του DNA που λαμβάνει χώρα στα νουκλεοτίδια των κυτοσινών, πραγματοποιείται από ένζυμα που ονομάζονται DNA μεθυλοτρανοφεράσες και εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι η αποσιώπηση μεταθετών στοιχείων και περικεντρομερικών περιοχών, η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος και το γενωμικό εντύπωμα. Οι τροποποιήσεις των ιστονών αναφέρονται στη μετα-μεταφραστική ομοιοπολική πρόσδεση χημικών ομάδων στις ιστόνες, όπως φωσφορυλίωση, ακετυλίωση και μεθυλίωση. Οι παραλλαγές των ιστονών είναι μη κανονικές ιστόνες με διαφορετικές αμινοξικές ακολουθίες από τις κανονικές ιστόνες και μπορεί να έχουν διαφορετικές επιγενετικές επιδράσεις στο γένωμα από τις κανονικές ιστόνες. Σταθερές χρωματινικές δομές, που διατηρούνται ή τροποποιούνται από πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, μπορεί επίσης να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα μικρά RNAs διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε προ- αλλά και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Γενικά μπορεί να ειπωθεί ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο σε όλους τους πολύπλοκους οργανισμούς ως ρυθμιστές της μεταγραφής.



Εικόνα 21: Μια γενική περίληψη των αλληλεπιδρώντων δικτύων μέσω των οποίων οι περιβαλλοντικά επαγόμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση επηρεάζουν τη συμπεριφορά και το δυναμικό των κυττάρων των οργανισμών. Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται μέσω ενός αλληλένδετου δικτύου από DNA, ιστόνες, μη-στονικές πρωτεΐνες (περιλαμβανομένων και των μεταγραφικών παραγόντων) και RNA, που συλλογικά αναφέρονται ως χρωματίνη. Υπάρχουν αρκετές οικογένειες ενζύμων που διαχειρίζονται τις λειτουργικές ιδιότητες της χρωματίνης. Μερικές τροποποιούν τις ιστόνες και τους μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ άλλες τροποποιούν απευθείας το DNA μετά το πακετάρισμά του στη χρωματίνη. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση ρυθμίζοντας ή υπονομεύοντας τις δραστηριότητες των ενζύμων αυτών. Μερικοί προσπαθούν να ασκήσουν άμεσα αποτελέσματα αναστέλλοντας ή ενεργοποιώντας ενζύμα, ενώ άλλοι δρουν από απόσταση μέσω κυτταρικών μονοπατιών σιγνάλων μεταβάλλοντας ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή μεταβολίτες. Τα επακόλουθα γεγονότα χαρακτηρίζονται από αναπόφευκτη εξάπλωση των δικτύων των αλληλεπιδράσεων. Ο μηχανισμός της μεταγραφής αυτός καθεαυτός τροποποιεί τη δομή της χρωματίνης, μερικές φορές με λειτουργικές επιπτώσεις, ενώ το σύνολο των μεταγραφημάτων του οργανισμού πολλές φορές περιέχει ρυθμιστικά RNAs, με μερικά από αυτά να εμπλέκονται άμεσα στη γονιδιακή αποσιώπηση. Το πρωτεύον του οργανισμού περιέχει όχι μόνο μεταβολικά ένζυμα που ρυθμίζουν τα επίπεδα των κύριων μεταβολιτών που απαιτούνται για τις τροποποιήσεις της χρωματίνης αλλά και εκείνες τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συναρμολόγηση και σιαχείρηση της χρωματίνης, περιλαμβάνοντας και ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης. Οι περιβαλλοντικά επαγόμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μπορούν να συμβούν είτε σε σωματικά κύτταρα είτε μέσα σε κύτταρα της θυληκής ή αρσενικής κυτταρικής σειράς. Αν η επαγόμενη αλλαγή δεν μεταβιβαστεί μέσω της μίτωσης στην επόμενη γενιά, τότε οι επίδρασή της θα περιοριστεί στο πατρικό κύτταρο και θα είναι ελάχιστης σημασίας για τον οργανισμό. Αν η αλλαγή κληρονομείται μιτωτικά, τότε τα αποτελέσματα μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά (far reaching). Για παράδειγμα, σε ένα σωματικό κύτταρο μια κληρονομίσιμη αλλαγή μπορεί να δημιουργήσει έναν δυσλειτουργικό κλώνο κυττάρων με φαινοτυπικές επιπτώσεις (όπως ένας όγκος). Σε μια γαμετική σειρά, η κληρονομίσιμη αλλαγή μπορεί να μεταδοθεί απευθείας στα γαμετικά κύτταρα (αρσενικό ή θυληκό) και πιθανώς, ανάλογα με τη φύση της αλλαγής, στην επόμενη γενιά. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί μέσω των οποίων μια περιβαλλοντικά επαγόμενη επιγενετική αλλαγή μπορεί να προκαλέσει μια στοχευμένη αλλαγή στην ακολουθία του DNA οδηγώντας σε γενετική πλέον κληρονομία της μετάλλαξης, ασκώντας επίδραση στο φαινότυπο των επόμενων γενεών (Turner, 2009).

1.6.2. Μεθυλίωση του DNA

1.6.2.1. Ζώα

Επιγενετικοί μηχανισμοί υπάρχουν σε πάρα πολλούς οργανισμούς, με τη μεθυλίωση του DNA να είναι ο πιο μελετημένος από αυτούς στα ζώα. Η μελέτη της λειτουργίας της μεθυλίωσης έδειξε ότι η μεθυλίωση του DNA συνδέεται με καταστολή της χρωματίνης και απαιτείται για τη 'φροντίδα' του γενώματος (σίγαση των μεταθετών στοιχείων), τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τη διατήρηση της ακεραιότητας της ταυτότητας των κυττάρων (Suzuki και Bird, 2008). Φαίνεται να περιορίζεται σε επίπεδο κυτοσίνης και ειδικά στο πλαίσιο των CpG δινουκλεοτιδίων. Τα CpG δινουκλεοτιδία είναι ακολουθίες κυτοσίνης-φωσφόρου-γουανίνης που συνήθως συσσωρεύονται σε γενωματικές περιοχές που ονομάζονται CpG νησίδες και συχνά τοποθετούνται στους προαγωγείς των γονιδίων εκδηλώνοντας χαμηλά επίπεδα DNA μεθυλίωσης. Στον άνθρωπο, το 60% περίπου των γονιδίων περιέχουν CpG νησίδες στην περιοχή του προαγωγέα τους και αν και η μεθυλίωση των περιοχών αυτών είναι σπάνια, όταν συμβαίνει έχει ως αποτέλεσμα τη σταθερή καταστολή του γονιδίου (Weber et al., 2007). Όμως, η μεθυλίωση του DNA στα ζώα μπορεί να λάβει χώρα και εκτός των CpG νησίδων, όπως για παράδειγμα έχει αναφερθεί σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Ramsahoye, 2000). Επίσης, αν και η κυτοσίνη κατά κανόνα μεθυλιώνεται σε 5-μεθυλο-κυτοσίνη, μπορεί επίσης να μετατραπεί και σε 5-ύδροξυ-μεθυλο-κυτοσίνη που επίσης διαδραματίζει σημαντικό επιγενετικό ρόλο (Kriaucionis και Heintz, 2009). Στα ζώα, η μεθυλίωση του DNA επάγεται από DNA μεθυλοτρανσφεράσες που είναι υπεύθυνες για τη *de novo* μεθυλίωση αλλά και για τη διατήρηση των προτύπων μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή (Harris, 2010).

Η μεθυλίωση νουκλεοτιδίων κυτοσινών είναι πρωταρχικής σημασίας στην ανάπτυξη των θηλαστικών και ειδικά στη διαφοροποίηση των κυτταρικών σειρών (Reik, 2007), στη ρύθμιση της μεταγραφής (Klose και Bird, 2006) και στη διατήρηση της γενωματικής σταθερότητας (Reik, 2007). Αντιστοίχως, έχουν παρατηρηθεί ποικίλα πρότυπα DNA μεθυλίωσης που αντικατοπτρίζουν το λειτουργικό περιεχόμενο γενωματικών περιοχών. Οι παρατηρήσεις περιλαμβάνουν ρυθμιστικές περιοχές, προαγωγείς και γονιδιακές περιοχές αλλά και σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία (Eckhardt, 2006). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι διαφορετικοί μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται μεταξύ της ρύθμισης της δραστηριότητας των DNA μεθυλοτρανσφερασών κατά μήκος του γενώματος και της αλληλεπίδρασής τους με άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη διατήρηση της χρωματίνης και τις τροποποιήσεις των ιστονών (Cedar και Bergman, 2009).

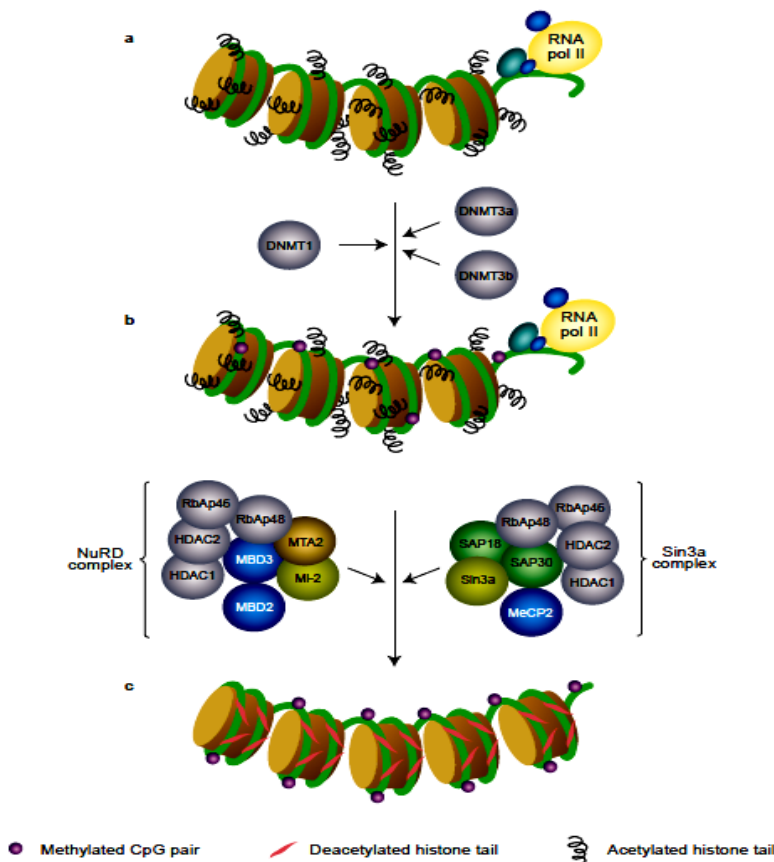
Στον άνθρωπο, η διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου διαμεσολαβείται κυρίως από τρεις DNA μεθυλοτρανσφεράσες, την DNMT1, την DNMT3a και την DNMT3b. Η DNMT1 εμπλέκεται κυρίως στη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με τα επίπεδα της έκφρασή της να κορυφώνονται κατά τη διάρκεια της S φάσης στη μίτωση. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, η DNMT1 είναι υπεύθυνη για την πιστή αντιγραφή των μεθυλιωμένων DNA ακολουθιών και γι' αυτό το λόγο εντοπίζεται στον ίδιο τόπο που λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Από την άλλη, οι DNMT3a και DNMT3b απαιτούνται για τη *de novo* μεθυλίωση αλλά και για την άρτια κληρονομία των επιγενετικών φαινομένων (Liang et al., 2002). Παράδειγμα αποτελούν οι ES κυτταρικές σειρές ελαττωματικές ως προς και τις δύο μεθυλάσες που παρουσιάζουν με το πέρασμα του χρόνου μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης (Chen et al., 2003). Οι μεθυλάσες αυτές εκδηλώνουν μια πιο ετερογενή κατανομή. Η DNMT3a φαίνεται να συσχετίζεται με την ετεροχρωματίνη ή την μη ενεργή χρωματίνη, ενώ η DNMT3b παρουσιάζει μια πιο διάχυτη πυρηνική τοποθέτηση αν και οι δύο μεθυλάσες τοποθετούνται σε περιοχές περικεντρομερικά της ετεροχρωματίνης (Bachman et al., 2001). Πιθανώς, η επιγενετική κληρονομικότητα της μεθυλίωσης του DNA να απαιτεί όχι μόνο τη διατήρηση της υπάρχουσας μεθυλίωσης από τη DNMT1 αλλά και τις *de novo* DNMT3a και DNMT3b προκειμένου να διορθώνουν και να μεθυλιώνουν συγκεκριμένες ακολουθίες στο DNA (Chen et al., 2003).

Επιγενετική κληρονομικότητα

Ως κληρονομικότητα ορίζεται η αναλογία της φαινοτυπικής ποικιλότητας σε έναν πληθυσμό που αποδίδεται στη γενετική παραλλακτικότητα. Η κληρονομικότητα των επιγενετικών χαρακτηριστικών ενός οργανισμού, που επηρεάζουν το φαινοτυπικό αποτέλεσμα, εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων. Τα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA μπορεί να επηρεαστούν από τη γενετική παραλλακτικότητα, τις περιβαλλοντικές αλλαγές και από κληρονομήσιμες και μη αλλαγές σε άλλες επιγενετικές διαδικασίες όπως είναι, για παράδειγμα, η επίδραση που μπορεί να ασκήσει η δομή της χρωματίνης ή η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA. Επίσης, στοχαστικές τροποποιήσεις κατά το πέρασμα του χρόνου μπορούν να επηρεάσουν την επιγενετική κατάσταση του οργανισμού. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορεί να συνεισφέρουν στην εκτίμηση της κληρονομικότητας της μεθυλίωσης του DNA, η οποία μπορεί να είναι χρόνο-, ιστο-, τοπο- ή πληθυσμο-ειδική (Bell και Spector, 2011).

Στα θηλαστικά, υπάρχει μια οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες διατήρησης της μεθυλίωσης του DNA και των ιστονών. Οι πρωτεΐνες αυτές εξασφαλίζουν τη διάδοση των επιγενετικών χαρακτηριστικών μέσω των

μιτωτικών κυτταρικών διαιρέσεων με υψηλή ακρίβεια, που κυμαίνεται στην τάξη του 95-99% (Genereux, 2005).



Εικόνα 22: Προτεινόμενος μηχανισμός όπου η μεθυλίωση του DNA οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής. α) Η μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη είναι μη μεθυλιωμένη και έχει υψηλά επίπεδα ακετυλιωμένων ουρών ιστονών. β) Μεθυλίωση στα CpG δινουκλεοτίδια μπορεί να επιτυγχανθεί με μια από τις τρεις γνωστές DNA μεθυλτρανσφεράσες του ανθρώπου (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) με αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα CpG μεθυλίωσης, που όμως περιέχουν ακόμα τις ακετυλιωμένες ουρές των ιστονών. Το DNA στην περίπτωση αυτή αναμένεται να είναι μεταγραφικά ικανό. γ) Το μεθυλιωμένο DNA στοχεύεται από πρωτεΐνες (MBD proteins) που προσδένονται σε μεθυλιωμένες περιοχές όπως η MBD2 και η MeCP2 που συνεργάζονται με μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως είναι το NuRD σύμπλοκο (MBD2) και το Sin3a σύμπλοκο (MeCP2). Οι από-ακετυλάσες των ιστονών HDAC1 και HDAC2 σε συνεργασία με τα σύμπλοκα μεθυλίωσης έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη δομή της χρωματίνης δημιουργώντας χρωματίνη που είναι μεταγραφικά ανενεργή (Strathdee and Brown, 2002).

1.δ.2.2. Φυτά

Η μεθυλίωση του DNA, στο *Arabidopsis thaliana*, λαμβάνει χώρα σε τρία διαφορετικά πλαίσια νουκλεοτιδικών ακολουθιών: CpG, CpHpG και CpHpHp (όπου H=C, T, ή A) με ποσοστό που κυμαίνεται σε 24%, 6.7% και 1.7% αντιστοίχως (Cokus et al., 2008). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατανομή των μεθυλίωσεων στα χρωμοσώματα του *Arabidopsis*. Σε κάθε χρωμόσωμα του *Arabidopsis*, οι κεντρομερικές περιοχές περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA που αποτελούνται από επαναλήψεις της 178bp κεντρομερικής ακολουθίας οι οποίες πλαισιώνονται από την περικεντρομερική ετεροχρωματίνη, που και αυτή αποτελείται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες περιλαμβάνοντας μεταθετά στοιχεία DNA (TEs, Transposable Elements) και ρετρο-στοιχεία. Κάθε κεντρομερές περικλείει αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων του DNA. Είναι φανερό ότι η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα κυρίως σε περιοχές επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, το οποίο συμβαίνει επίσης και σε μεταθετά στοιχεία της ευχρωματίνης. Αντίθετα, υπάρχουν γονίδια στις κεντρομερικές περιοχές που παραμένουν ενεργά παρόλο που περιβάλλονται από μεθυλιωμένα μεταθετά στοιχεία (Zilberman et al., 2007). Επίσης, τα μεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν στο γονιδίωμα ενός οργανισμού και να αυξάνονται σε αριθμό αντιγράφων με σκοπό να βλάψουν τον ξενιστή τους. Όλοι οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μεθόδους προστασίας εναντίον των TEs. Οι μέθοδοι περιλαμβάνουν

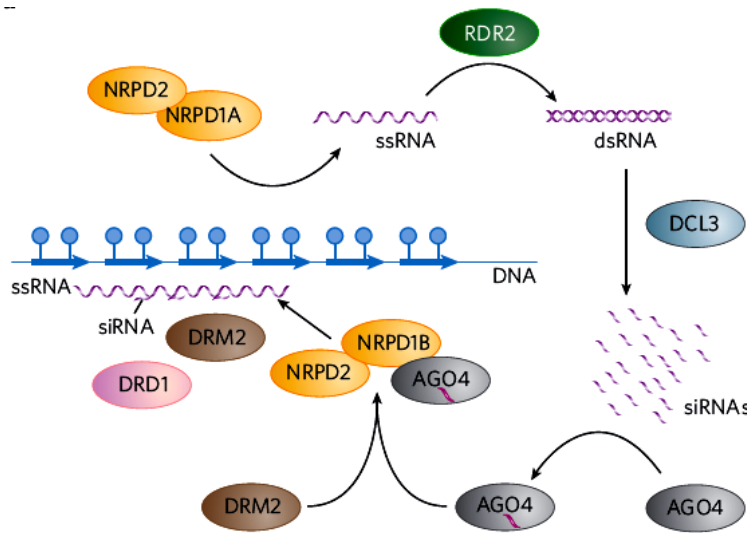
τροποποιήσεις των ισονών, μεθυλίωση του DNA ή συνδυασμό και των δύο με σκοπό τη διατήρηση των TEs σε ανενεργή κατάσταση (Slotkin και Martienssen, 2007). Στο *Arabidopsis*, τα TEs γενικά είναι μεθυλιωμένα καθ' όλο το μήκος τους αν και υπάρχουν και ιδιαίτεροι μηχανισμοί για συγκεκριμένους γενετικούς τόπους (Zilberman et al., 2007).

Σε αντίθεση με τα μεταθετά στοιχεία, η μεθυλίωση παρουσιάζει διακριτό πρότυπο διανομής όταν εμφανίζεται σε νουκλεοτιδικές ακολουθίες των γονιδίων και υπάρχει μια πολύ ιδιαίτερη σχέση μεταξύ μεθυλίωσης και μεταγραφής. Στο *Arabidopsis*, περίπου το 1/3 των γονιδίων μεθυλιώνονται σε CG δινουκλεοτίδια που βρίσκονται στην κωδική περιοχή τους και η μεθυλίωση διατηρείται από τη MET1. Επίσης, όχι μόνο η κατανομή των μεθυλίωσεων μέσα στα γονίδια παρουσιάζει το ακριβώς αντίθετο πρότυπο σε σχέση με την κατανομή της RNA πολυμεράσης II αλλά και τα 3' και 5' άκρα των κωδικών περιοχών είναι ελεύθερα από μεθυλίωσεις (Zilberman et al., 2007). Αντίθετα με τη μεθυλίωση των μεταθετών στοιχείων, η CG μεθυλίωση στις ακολουθίες των γονιδίων δεν φαίνεται να προκαλεί απενεργοποίηση των γονιδίων αυτών μιας και τείνουν να εμφανίζουν ένα μέτριο πρότυπο έκφρασης σε πολλούς ιστούς (Law και Jacobsen, 2010). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση στα 3' και 5' άκρα μπορεί να είναι κατασταλτική για τη μεταγραφή, πιθανώς μέσω παρεμβολής στην έναρξη ή τον τερματισμό της (Gehring και Henikoff, 2008). Όντως, γονίδια που μεθυλιώνονται στην περιοχή του προαγωγέα τους ή στο 5' άκρο έχουν τους χαμηλότερους μεταγραφικούς ρυθμούς στο γονιδίωμα. Με άλλα λόγια, γονίδια που μεταγράφονται με μέτριο ρυθμό έχουν περισσότερες πιθανότητες να μεθυλιώνονται από γονίδια που έχουν χαμηλή ή υψηλή έκφραση (Zilberman et al., 2007), υποδηλώνοντας ότι η διαδικασία της μεταγραφής αυτή καθαυτή, αν δεν είναι πολύ αργή ή πολύ γρήγορη, μπορεί να προάγει τη μεθυλίωση (Gehring και Henikoff, 2008). Επιπρόσθετα, η παρουσία CG μεθυλίωσης σε μερικά γονίδια έχει παρατηρηθεί και σε άλλους σπονδυλωτούς οργανισμούς, δείχνοντας ότι μπορεί να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών οργανισμών (Suzuki και Bird, 2008).

Στα φυτά, η μεθυλίωση στα δινουκλεοτίδια CG διατηρείται από τη DNA μεθυλοτρανσφεράση MET1 (Methyltransferase 1) που είναι αντίστοιχη της DNMT1 στα ζώα. Η CpHpG μεθυλίωση είναι διαδεδομένη τόσο στο *Arabidopsis* όσο και σε άλλα φυτικά γενώματα και διατηρείται μέσω μιας κυκλικής ανατροφοδοσίας που σχηματίζεται από τη φυτό-ειδική DNA μεθυλοτρανσφεράση CMT3 (Chromomethylase 3) και την ισονό-μεθυλοτρανσφεράση KYP (Kryptonite) (Law και Jacobsen, 2010). Η CpHpHp μεθυλίωση είναι επίσης σε αφθονία στα φυτά και διατηρείται από το RdDM (RNA-directed DNA methylation) μονοπάτι που στοχεύει τη DNA μεθυλοτρανσφεράση DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2 και είναι ομόλογη της DNMT3 στα ζώα) στο DNA χρησιμοποιώντας τα 24-νουκλεοτιδίων μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs. Στα ζώα, οι τύποι CpHpG και CpHpHp μεθυλίωσης ανιχνεύονται κυρίως στα βλαστικά κύτταρα και πιθανώς εισάγονται από τις DNMT3a και DNMT3b μεθυλάσες (Lister et al., 2009), ενώ δεν υπάρχει μονοπάτι αντίστοιχο του RdDM-επαγόμενου που παρατηρούμε στο *Arabidopsis*. Η *de novo* μεθυλίωση στο *Arabidopsis* εγκαθιδρύεται από την DRM2 μεθυλάση.

Το *Arabidopsis* περιέχει πολλά μονοπάτια μικρών RNAs που εμπλέκονται στην άμυνα εναντίον παθογόνων, στην ανάπτυξη, στην απόκριση κάτω από στρες και στην εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης του DNA (Chapman και Carrington, 2007). Κάθε μονοπάτι μικρών RNAs βασίζεται στη λειτουργία της πρωτεΐνης Argonaute (AGO), της πρωτεΐνης Dicer (DCL) και σε ορισμένες περιπτώσεις της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRP). Οι μοριακές λειτουργίες των ενζύμων αυτών έχουν διασαφηνιστεί σε πολλούς οργανισμούς. Η ενδονουκλεάση Dicer διαχωρίζει τα διπλής έλικας RNAs (dsRNAs) σε τμήματα 21-25 νουκλεοτιδίων. Μία από τις δύο αλυσίδες των μικρών RNAs που παράγονται, ενώνεται στο σύμπλοκο της πρωτεΐνης AGO και στη συνέχεια, ανάλογα με το μονοπάτι, μπορεί να χρησιμεύσει ως οδηγός για την καταστροφή μεταγραφημάτων ή για τη *de novo* μεθυλίωση. Αν τα dsRNAs δεν δημιουργούνται

φυσικά (όπως για παράδειγμα από πρόδρομα miRNAs), τότε μπορούν να συντεθούν από την RdRP πολυμεράση από μονής αλυσίδας RNA μήτρες. Το *Arabidopsis* περιέχει αρκετά γονίδια για κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα. Πολλά από αυτά έχουν διακριτές λειτουργίες ειδικά στα μονοπάτια παραγωγής μικρών RNAs, αν και συμβαίνουν αλληλεπικαλύψεις και αντικαταστάσεις (Gehring και Henikoff, 2008).



Εικόνα 23: Θεωρητικό μονοπάτι RNA-επαγόμενης DNA μεθυλίωσης στο *Arabidopsis thaliana*. Οι περιοχές-στόχοι (τα μπλε βέλη) στρατολογούν μέσω ενός αγνώστου μηχανισμού ένα σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης IV, που αποτελείται από τις NRPD1 και NRPD2, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μονής αλυσίδας RNAs (ssRNAs). Τα ssRNAs μετατρέπονται σε διπλής αλυσίδας RNAs (dsRNAs) μέσω της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης RDR2. Τα dsRNAs στη συνέχεια επεξεργάζονται σε 24 νουκλεοτιδίων siRNAs από τη DCL3. Τα siRNAs στη συνέχεια ενσωματώνονται στην AGO4 πρωτεΐνη (περιέχει στοιχεία PAZ- και PIWI που συντονίζονται

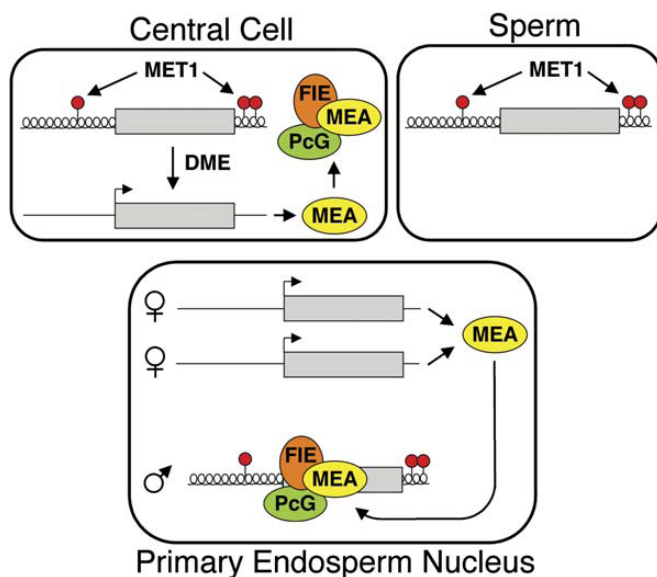
με ένα άλλο σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης IV, NRPD1B-NRPD2. Η AGO4 που είναι 'φορτωμένη' με τα siRNAs, μπορεί να εντοπίσει ομόλογες γενωματικές ακολουθίες και να οδηγήσει την πρωτεΐνη DRM2 που κατέχει *de novo* δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης. Η στόχευση της DRM2 σε γενωματικές ακολουθίες επίσης περιλαμβάνει την SWI-SNF πρωτεΐνη αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης DRD1. Το NRPD1B-NRPD2 σύμπλοκο μπορεί να παράγει ένα μεταγράφημα-στόχο (ssRNA) όπου μπορούν να υβριδίσουν τα siRNAs της AGO4. Δεδομένου του ότι ομολογίες των siRNAs με ορισμένες περιοχές απουσιάζουν σε *drm2* και *ago4* μεταλλάγματα, είναι πιθανό ότι η DNA μεθυλίωση (μπλε κύκλοι) να διεγείρει τη δημιουργία των siRNAs και να ενισχύει την αποσιώπηση (Henderson και Jacobsen, 2007).

Προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος από γενιά σε γενιά, τα μεταθετά στοιχεία πρέπει να βρίσκονται κάτω από ισχυρή και συνεχή ρύθμιση στα αναπαραγωγικά κύτταρα. Ένας από τους τρόπους που τα φυτά καταφέρνουν τη αποσιώπηση αυτή είναι μέσω της σταθερής κληρονόμησης της μεθυλίωσης του DNA. Παρόλο που τα φυτά εκδηλώνουν μειωτική κληρονόμηση της γονιδιακής αποσιώπησης (Law και Jacobsen, 2010), δεν υπάρχουν στοιχεία ότι υποβάλλονται σε καθολικές καταστάσεις υπομεθυλίωσης του DNA στα γαμετικά κύτταρα όπως συμβαίνει στα ζώα. Εντούτοις, λαμβάνει χώρα επαναπρογραμματισμός μεγάλης κλίμακας σε μη γαμετικά αναπαραγωγικά κύτταρα που πιθανώς να ενισχύει την αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων στα γαμετικά κύτταρα (Feng et al., 2010).

Ένας τρόπος για να επαναπρογραμματιστεί το επιγένομα του οργανισμού είναι μέσω της αφαίρεσης των μεθυλιωμένων νουκλεοτιδίων των κυτοσινών. Το γένομα του *Arabidopsis* κωδικοποιεί για τέσσερις δι-λειτουργικές helix-hairpin-helix DNA γλυκοσυλάσες/AP λυάσες: ROS1 (Repressor of Silencing 1), DME (Demeter), DML2 (Demeter Like 2) και DML3 (Demeter Like 3). Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν και αφαιρούν τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται κενά νουκλεοτιδίων στη διπλή έλικα του DNA. Στη συνέχεια, ένζυμα επιδιόρθωσης και ενοποίησης του DNA θεωρητικά γεμίζουν τα κενά με μη μεθυλιωμένα νουκλεοτιδία κυτοσινών (Law και Jacobsen, 2010). Οι ROS1, DML2 και DML3 λειτουργούν κυρίως στους βλαστικούς ιστούς και γονιδιωματικές έρευνες έχουν δείξει ότι απομεθυλιώνουν εκατοντάδες στοχευμένες περιοχές κατά μήκος του γονιδιώματος, έχοντας προτίμηση

στις περιοχές των γονιδίων (Penterman et al., 2007). Παρόλο που η αποσιώπηση και των τριών γονιδίων δεν επηρεάζει σημαντικά τα συνολικά επίπεδα ή πρότυπα μεθυλίωσης του γονιδιώματος του *Arabidopsis*, τα ένζυμα αυτά φαίνεται να εξισορροπούν τη δράση του RdDM μηχανισμού και να ρυθμίζουν ποσοτικά τα επίπεδα μεθυλίωσης σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές (Feng et al., 2010).

Από την άλλη, η DME λειτουργεί ως καθολική απομεθυλάση στο ενδοσπέρμιο (ο επιπρόσθετος εμβρυονικός ιστός των ανθοφόρων φυτών) του *Arabidopsis* (Hsieh et al., 2009), συμβάλλοντας σε μεγάλης κλίμακας επιγενετικό επαναπρογραμματισμό. Στο *Arabidopsis*, η γαμετογένεση του θηλυκού ξεκινάει όταν ένα σωματικό μεγασπόριο (μητρικό κύτταρο) υπόκειται μείωση για να παράγει το απλοειδές μεγασπόριο, που στη συνέχεια θα αναπτυχθεί σε ώριμο θηλυκό γαμετόφυτο (εμβρυόσакκος) που θα περιέχει ένα ωάριο, ένα κεντρικό κύτταρο (δι-πύρηνιο) και πολλά άλλα βοηθητικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της διπλής γονιμοποίησης το ωάριο συντήκεται με το αρσενικό κύτταρο του αρσενικού γαμετόφυτου της γύρης σχηματίζοντας το έμβρυο. Ο κεντρικός πυρήνας συντήκεται με ένα άλλο σπερματικό κύτταρο από τη γύρη και σχηματίζει το τριπλοειδές ενδοσπέρμιο, το οποίο τρέφει το έμβρυο και συμπεριφέρεται όπως ο πλακούντας στα θηλασικά. Η DME εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό κύτταρο πριν τη γονιμοποίηση και έτσι μόνο το μητρικό γένωμα απομεθυλιώνεται οδηγώντας σε εξειδικευμένη έκφραση των γονιδίων που προέρχονται από το μητρικό αλληλόμορφο στο ενδοσπέρμιο (HuH et al., 2008). Η διαφοροποίηση αυτή, δηλαδή η εξειδικευμένη ενεργοποίηση γονιδίων στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα λόγω της δράσης της πρωτεΐνης DME, ονομάζεται εντύπωμα.



Εικόνα 24: Μοντέλο της ρύθμισης του εντυπώματος της MEA πρωτεΐνης. Η μεθυλίωση της MEA πρωτεΐνης διατηρείται από τη μεθυλοτρανσφεράση MET1. Στο κεντρικό κύτταρο η DME αφαιρεί τις μεθυλίωσεις στην περιοχή -500bp και η μη μεθυλιωμένη πλέον MEA που παράγεται σχηματίζει PcG σύμπλοκα. Μετά τη γονιμοποίηση τα σύμπλοκα MEA-FIE-PcG στοχεύουν το πατρικό αλληλόμορφο για να διατηρήσουν την κατάσταση σίγασης ενώ η μητρική MEA πρωτεΐνη συνεχίζει να εκφράζεται στο ενδοσπέρμιο (Gehring et al., 2006).

Παρόλο που μέχρι πρόσφατα είχαν ταυτοποιηθεί μόνο έξι γονίδια στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* που εντυπώνονται, μελέτες στο ενδοσπέρμιο αποκάλυψαν μεγάλο εύρος γονιδιωματικές αλλαγές στα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA καθώς και μια δραματική μείωση στο πρότυπο μεθυλίωσης στα νουκλεοτίδια CpG. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι ίσως υπάρχουν και πολλά άλλα γονίδια που εντυπώνονται στο *Arabidopsis* (Gehring et al., 2009). Η απομεθυλίωση που προκαλείται από την DME μπορεί επίσης να επανεργοποιήσει την έκφραση των μεταθετών στοιχείων. Στη συνέχεια, τα μεταγραφώματά τους τοποθετούνται στο RNAi μονοπάτι και παράγοντας συμπληρωματικά siRNAs μπορούν να οδηγήσουν τη DNA μεθυλίωση σε περιοχές ελεύθερες από CG νησίδες. Στις περιοχές αυτές, η μεθυλίωση είναι υψηλή σε ενδοσπέρμια αγρίου τύπου αλλά μειώνεται στο ενδοσπέρμιο *dme*

μεταλλαγμάτων (Feng et al., 2010). Μιας και το γονιδίωμα του ενδοσπερμίου δεν συμβάλλει στο γένωμα της επόμενης γενιάς, ήπια ενεργοποίηση και επανεργοποίηση των μεταθετών στοιχείων στο ενδοσπέρμιο μπορεί να μην είναι θανάσιμη. Επίσης, μπορεί να ενισχύσει την αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων στο ωάριο και αργότερα στο έμβρυο, συμβάλλοντας στην ακεραιότητα του γονιδιώματος του απογόνου. Όντως, υπάρχει μια τάξη Pol IV-εξαρτωμένων siRNAs που συσσωρεύονται μόνο στα άνθη και στις νεαρές καρποταξίες και πιθανώς να προέρχονται από το ενδοσπέρμιο (Moshier et al., 2009).

1.δ.3. Τροποποιήσεις ιστονών

1.δ.3.1. Ζύμη και μύγα

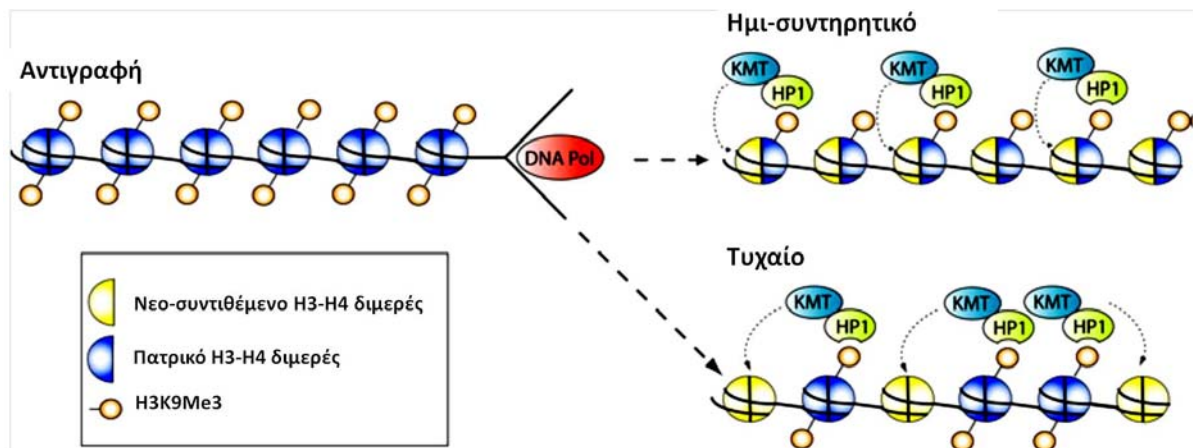
Αν και η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν καλά εγκαταστημένο μηχανισμό για τη σταθερή κληρονόμηση των επιγενετικών φαινομένων, οργανισμοί που μόλις και μετά βίας μεθυλιώνουν το DNA τους, όπως είναι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και η μύγα *Drosophila melanogaster*, μπορούν να μεταδώσουν τις επιγενετικές πληροφορίες κατά τη διάρκεια του κυτταρικού τους κύκλου πιθανώς αλλάζοντας τη δομή της χρωματίνης τους (Bernstein et al., 2007). Οι καθοριστικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης είναι οι πρωτεΐνες των ιστονών. Το DNA συσπειρώνεται γύρω από τις ιστόνες (δημιουργώντας σύμπλοκα που ονομάζονται νουκλεοσώματα), έχοντας ως αποτέλεσμα το αποτελεσματικό πακετάρισμα 2m DNA σε έναν μόνο πυρήνα διαμέτρου 10μ. Κάθε νουκλεόσωμα περιέχει ένα οκταμερές τεσσάρων κεντρικών πρωτεϊνών ιστονών που ονομάζονται H3, H4, H2A και H2B. Όμως, πέρα από το δομικό τους ρόλο, οι ιστόνες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αλλάζοντας την τοπική κατάσταση της χρωματίνης, η προσβασιμότητα των περιλαμβανόμενων ακολουθιών του DNA, όπως για παράδειγμα, στο μεταγραφικό μηχανισμό, μπορεί να ρυθμιστεί έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή γονιδίων (Orphanides και Reinberg, 2000). Από τη στιγμή που η τοπική κατάσταση της χρωματίνης συνεισφέρει στη διατήρηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης ή καταστολής, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι είναι αναγκαία η διατήρηση και η μετάδοση της κατάστασης αυτής κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου μιας και, για παράδειγμα, μπορεί να ελέγχει την έκφραση ιστό-ειδικών γονιδίων. Παρ' όλα αυτά, το σύστημα αυτό είναι αναγκαίο να έχει την ικανότητα εμφάνισης δυναμικών αλλαγών που απαιτούνται σε αποκρίσεις καταστάσεων στρες ή επιδιόρθωσης του DNA (Blomen και Boonstra, 2011). Γενικώς, η λειτουργικότητα της χρωματίνης μπορεί να ρυθμιστεί είτε με την τοποθέτηση ειδικών μορφών ιστονών κατά μήκος του γονιδιώματος, όπως για παράδειγμα την τοποθέτηση της ιστόνης H3.3 σε ενεργά μεταγραφόμενη περιοχή, ή με την ομοιοπολική τροποποίηση των αμινο-τελικών ουρών των ιστονών (Kouzarides, 2007).

Επιγενετική κληρονομικότητα

Σε αντίθεση με άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η μεθυλίωση των ιστονών θεωρείται ότι είναι ο κυρίαρχος παράγοντας που εμπλέκεται στην επιγενετική κληρονομικότητα (Rice και Allis, 2001). Μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9 (H3K9) ή στη λυσίνη 27 (H3K27) αποτελεί δείκτη καταστολής, ενώ μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4) συσχετίζεται με ενεργή κατάσταση χρωματίνης και

ικανότητα μεταγραφής (Kouzarides, 2007). Κάθε ένα από αυτά τα κατάλοιπα αμινοξέων μπορεί να μόνο-, δι- και τρι-μεθυλωθεί. Η ενεργή H3K4Me και η ανενεργή H3K27Me ρυθμίζονται από τις οικογένειες πρωτεϊνών των TrxG (Trithorax) και PcG (Polycomb) αντίστοιχα, ενώ υπάρχει και ένα ξεχωριστό σύστημα ελέγχου που διατηρεί τη μεθυλίωση H3K9Me καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου το οποίο δραστηριοποιείται από την πρωτεΐνη Heterochromatin-associated protein 1 (HP1) (Blomen και Boonstra, 2011). Για να μπορούν όμως οι μεθυλώσεις αυτές να είναι κληρονομήσιμες, πρέπει να έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται σταθερά μέσω της S φάσης στη μίτωση.

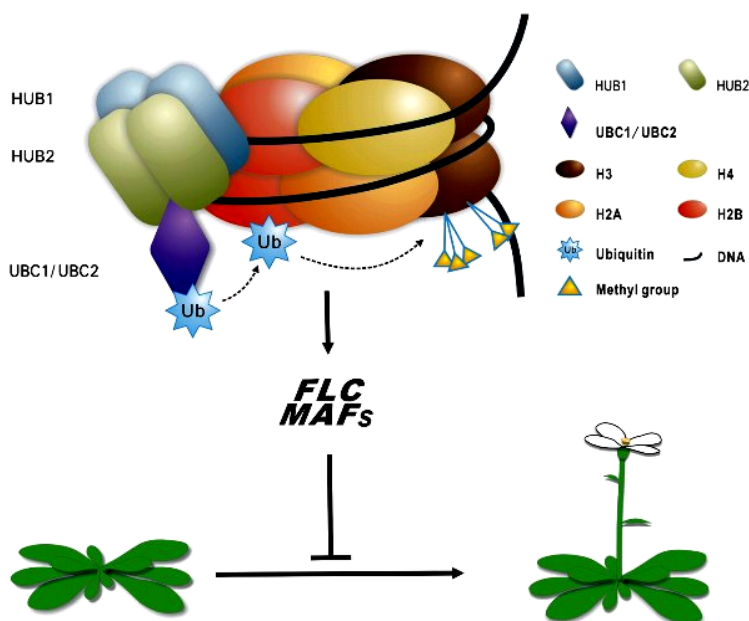
Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, οι ιστόνες αποσυναρμολογούνται με σκοπό να μπορέσει να διεκπεραιωθεί ο μηχανισμός της αντιγραφής και γρήγορα ξανά συναρμολογούνται στις δύο θυγατρικές αλυσίδες. Μετά την αποσυναρμολόγηση, τα πατρικά H2A-H2B διμερή και H3-H4 τετραμερή επανακατανέμονται στις θυγατρικές αλυσίδες και συμπληρώνονται με νεοσυντιθέμενες ιστόνες ώστε να εξασφαλίσουν και στις δύο αλυσίδες τον ίδιο αριθμό νουκλεοσωμάτων (Groth et al., 2007). Από τη στιγμή που τα τετραμερή των H3-H4 μπορούν να χωριστούν σε διμερή, πιθανό μοντέλο αποτελεί ο χωρισμός των πατρικών H3-H4 τετραμερών σε διμερή μαζί με τις τροποποιήσεις τους και η εξίσου διανομή τους στις θυγατρικές αλυσίδες. Δηλαδή το 'ημι-συντηρητικό' μοντέλο αντιγραφής δηλώνει ότι μετά την αντιγραφή και οι δύο αλυσίδες θα περιέχουν νουκλεοσώματα που θα αποτελούνται από ένα πατρικό και ένα νεοσυντιθέμενο διμερές. Βέβαια, σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε χρωμοσώματα τύπου SV40 δείχθηκε ότι τα πατρικά H3-H4 αποθέτονται ως τετραμερή και διανέμονται τυχαία στις θυγατρικές αλυσίδες, γεγονός που δηλώνει ότι τα επιγενετικά χαρακτηριστικά των πατρικών ιστονών εξασθενίζουν (Xu et al., 2010). Με βάση αυτό το δεδομένο τίθεται το ερώτημα πως η τυχαία κατανομή των πατρικών ιστονών μπορεί να επιτρέψει την πιστή αντιγραφή των επιγενετικών χαρακτηριστικών της χρωματίνης. Σύμφωνα με τους Blomen και Boonstra (2011), πιθανώς η ιστονική πρωτεΐνη HP1 να λειτουργεί ως 'αναγνώστης' που εντοπίζει την κατάσταση μεθυλίωσης των H3K9 καταλοίπων των πατρικών ιστονών και μετέπειτα διανέμει την κατάσταση αυτή και στις νεοσυντιθέμενες ιστόνες.



Εικόνα 25: Επαναφορά της H3K9 μεθυλίωσης μετά από την αντιγραφή του DNA. Κατά τη διάρκεια της S φάσης, τα νουκλεοσώματα διασπώνται από το μηχανισμό της αντιγραφής και επακόλουθα ξανά συναρμολογούνται στις θυγατρικές αλυσίδες. Ο τρόπος αυτός συναρμολόγησης απαιτεί τη χρήση πατρικών και νέο-συντιθέμενων ιστονών. Τα πατρικά H3-H4 τετραμερή αποθέτονται τυχαία στις θυγατρικές αλυσίδες. Εναλλακτικά, σε ειδικές περιπτώσεις τα τετραμερή μπορούν να χωριστούν σε διμερή. Η κατάσταση αυτή διευκολύνει το ημι-συντηρητικό μοντέλο αντιγραφής, όπου τα πατρικά H3-H4 διμερή συνδυάζονται με νεο-συντιθέμενα H3-H4 διμερή με σκοπό να μορφοποιήσουν ημι-πατρικά νουκλεοσώματα. Η διάδοση των μεθυλίωσης της H3K9me3 διευκολύνεται από τις HP1 και KMTs, όπου η HP1 προσδένεται στις μεθυλίωσης της πατρικής H3K9me3 και επάγει τη H3K9 μεθυλίωση στις νεοσυντιθέμενες ιστόνες (Blomen και Boonstra, 2011).

1.6.3.2. Φυτά

Τα φυτά εκτίθενται σε ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Σε μερικά από αυτά, τα φυτά έχουν την ικανότητα προσαρμογής (για παράδειγμα μηχανικές διαταραχές), άλλα προάγουν τη γρήγορη άνθιση τους (για παράδειγμα η θερμοκρασία) και άλλα προτρέπουν τη ρύθμιση της ανάπτυξης, της αύξησης και της μορφογένεσης των φυτών σε απόκριση των εποχικών αλλαγών. Καθώς οι περιβαλλοντικές αλλαγές μπορεί να είναι από βραχύπρόθεσμες σε μακροπρόθεσμες (μέρες ως μήνες), οι οργανισμοί έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε αντιστρεπτά να τροποποιούν την έκφραση των γονιδίων τους χωρίς να αλλάζουν την αρχική νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA, δημιουργώντας μία διαδικασία 'μνήμης' που ορίζεται ως επιγενετικό φαινόμενο (Cazzonelli et al., 2009). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός φαινομένου 'μνήμης' αποτελεί η εαρινοποίηση, που ορίζεται ως η επιτάχυνση της άνθισης την άνοιξη μέσω των παρατεταμένων χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα. Ενώ κληρονομείται μέσω των μιτωτικών διαιρέσεων, η κατάσταση της εαρινοποίησης επαναπρογραμματίζεται κατά τη μείωση και πρέπει η επόμενη γενιά να εκτεθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες για να συμβεί πάλι το φαινόμενο (Schmitz και Amasino, 2007). Σε μοριακό επίπεδο, το φαινόμενο της εαρινοποίησης λαμβάνει χώρα όταν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Polycomb (PCG) επάγουν την αποσιώπηση του γονιδίου *flc* (Flowering Locus C) στο *Arabidopsis* που ελέγχει το χρόνο άνθισης (Kim et al., 2009). Σε χειμερινούς-ετήσιους οικοτύπους του *Arabidopsis*, το *flc* εκφράζεται σε ψηλά επίπεδα για να καταστείλει την έναρξη της άνθισης. Κατά την εαρινοποίηση, το *flc* τροποποιείται λόγω της μεθυλίωσης της ιστόνης H3K27me3 με αποτέλεσμα την επιγενετική σίγηση της έκφρασης του γονιδίου. Όταν περνάει ο χειμώνας και οι θερμοκρασίες γίνονται πιο θερμές, παραμένει σταθερή η τριμεθυλίωση της H3K27 όπως και η σίγηση του *flc*. Κρατώντας απενεργοποιημένο το *flc*, το *Arabidopsis* μπορεί να ανθίσει αποκρινόμενο στα περιβαλλοντικά σιγνάλα όπως είναι η φωτοπερίοδος. Όταν μορφοποιούνται οι γαμέτες κατά τη διάρκεια της μείωσης, τα χαρακτηριστικά που έχει τοποθετήσει η ιστόνη H3K27me3 στο *flc* αφαιρούνται με έναν άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό και στους σπόρους το *flc* εκφράζεται και πάλι. Έτσι, η άνθιση αναστέλλεται από το *flc* μέχρι τα φυτά της επόμενης γενιάς να αντιμετωπίσουν χαμηλές θερμοκρασίες (Feng et al., 2010).



Εικόνα 26: Προτεινόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου ρυθμίζεται η κατάσταση της χρωματίνης στην περιοχή του γονιδίου *flc* καθώς και η μεταγραφή του γονιδίου *flc* από το UBC1,2/HUB1,2 μονοπάτι. Οι πρωτεΐνες HUB1 και HUB2 σχηματίζουν ένα ετεροτετραμερές, με δύο μόρια πρωτεΐνης από την καθεμία, και στη συνέχεια προσαρτίζουν τις πρωτεΐνες UBC1 και UBC2 στη χρωματίνη στη νουκλεοτιδική περιοχή του *flc*. Στη συνέχεια, η H2B ιστόνη ουβικουτινώνεται από τις UBC1 και UBC2 και χρησιμεύει ως στόχος για την προσάρτηση της H3 μεθυλοτρανσφεράσης, ενισχύοντας την υπομεθυλίωση των H3K4 και H3K36 ιστονών με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του FLC και την καθυστέρηση της άνθισης στο *Arabidopsis* (Cao et al., 2008).

Πρόσφατα, ένα καινούριος μηχανισμός αποσιώπησης μεταθετών στοιχείων περιγράφηκε στο *Arabidopsis* και δεν περιλαμβάνει ούτε μεθυλίωση του DNA ούτε διμεθυλίωση της ιστόνης H3K9. Αυτός ο μηχανισμός εμπεριέχει μεθυλίωση της H3K27 που είναι απαραίτητη για την καταστολή της καταχρηστικής αντιγραφής της ετεροχρωματίνης όπου ενδημούν τα μεταθετά στοιχεία. Υπερ-αντιγραφή των μεταθετών στοιχείων μπορεί να οδηγήσει σε επανεργοποίηση και εξάπλωση του αριθμού των αντιγράφων τους, και ο μηχανισμός της H3K27me πιθανός έχει εξελιχθεί προκειμένου να καταστέλλει την υπερβολική αντιγραφή και να διασφαλίζει τη σταθερότητα του γονιδιώματος. Αν όντως ισχύει ο μηχανισμός αυτός θα υποδεικνυε ότι τα χαρακτηριστικά των ισόνων όχι μόνο επαναπρογραμματίζονται αλλά επίσης επαναπρογραμματίζουν και το γονιδίωμα, όπως στην περίπτωση της H3K27me που διατηρεί την αντιγραφή των μεταθετών στοιχείων κάτω από έλεγχο, το οποίο προφανώς είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον κύκλο των ενεργών φυτικών κυττάρων και των αναπαραγωγικών φυτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της μείωσης και ίσως κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου (Feng et al., 2010).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.α. Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού

Για την ανάπτυξη των φυτών κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σπέρματα του *Arabidopsis thaliana* ενυδατώνονται για 24h στους 4°C και στη συνέχεια αποστειρώνονται σε διάλυμα 70% αιθανόλης ακολουθούμενο από διάλυμα 20% χλωρίνης. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (22°C), υγρασίας (40%) και φωτοπεριόδου.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι φωτοπεριόδου:

α) Συνθήκες μεγάλης ημέρας: 16ώρες φως/8ώρες σκοτάδι (με ένταση φωτός περίπου 140 microeinsteins per second per square meter ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$))

β) Συνθήκες μικρής ημέρας: 8ώρες φως/16ώρες σκοτάδι (με ένταση φωτός περίπου 80-90 microeinsteins per second per square meter ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$)).

2.β. Καλλιέργεια σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana*

i) Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS

- Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS με την ανάλογη σύσταση.
- Αποστείρωση του υποστρώματος για 20min στους 120°C.
- Γέμισμα τρυβλίων Petri 9cm με 20ml θρεπτικού υποστρώματος μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminair flow) με τον οποίο επιτυγχάνονται αποστειρωμένες συνθήκες.
- Αφήνονται να στερεοποιηθούν.
- Τα τρυβλία μπορεί να φυλαχθούν για περίπου 2 εβδομάδες στους 4°C.

ii) Στερεή καλλιέργεια σπορόφυτων *Arabidopsis thaliana*

- Η εκβλάστηση των σπερμάτων προϋποθέτει την επιτυχημένη έξοδό τους από την κατάσταση ληθάργου. Για να συμβεί αυτό, τα σπέρματα τοποθετούνται σε ddH₂O για 24h στους 4°C.
- Απολύμανση των σπερμάτων με 70% αιθανόλη για 30sec, απομάκρυνση της αιθανόλης και προθήκη διαλύματος χλωρίνης 20% για 1-2min ανάλογα με την ποσότητα των σπερμάτων. Η όλη διαδικασία γίνεται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.
- Απομάκρυνση του διαλύματος της χλωρίνης και ξέπλυμα των σπερμάτων 5 φορές με ddH₂O από 1min τη φορά.
- Επίστρωση των σποριών στην επιφάνεια υποστρώματος, σε τρυβλία Petri που περιέχουν θρεπτικό μέσο MS με τη βοήθεια πιπέτας Gilson.
- Τα τρυβλία αφήνονται ανοιχτά να στεγνώσουν για 30min περίπου.
- Σφραγίζονται με ταινία parafilm και μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών.
- Μετά από δύο εβδομάδες τα φυτά έχουν αναπτυχθεί αρκετά και έτσι μπορούν να μεταφερθούν στο χώμα όπου για 3-4 μέρες μένουν καλυμμένα με διαφανή μεμβράνη και παρατηρούνται σε περιβάλλον υγρασίας για να ξεπεράσουν την καταπόνηση από τη μεταφύτευση. Έτσι, αναπτύσσονται μέχρι να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο και να γίνει η συλλογή σπερμάτων.

iii) Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου *Columbia (Col-O)* ή αλλιώς αγρίου τύπου.

2.γ. *Agrobacterium tumefaciens* και μετασχηματισμός

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram- αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους, ανήκει στην οικογένεια *Rhizobiaceae* και προκαλεί στα φυτά την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου. Η παθογενετικότητα του εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη σε αυτό ενός μεγάλου πλασμιδίου μεγέθους 200-250Kb, το Ti- πλασμίδιο. Μέσω του Ti πλασμιδίου που περιέχει είναι δυνατή η μεταφορά εξωγενών γονιδίων (ή DNA γενικότερα) μέσα στα φυτά μετά τη μόλυνσή τους με το βακτήριο.

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.γ.1 Απευθείας μετασχηματισμός *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο Freeze-thaw

- Ανάπτυξη ενός στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* σε 5ml LB θρεπτικό μέσο συν κατάλληλο αντιβιοτικό ολονύχτια στους 28°C
- Προσθήκη 2ml από την ολονύχτια καλλιέργεια σε 50ml LB θρεπτικό μέσο σε κωνική φιάλη των 250ml και ζωηρή ανάδευση στους 28°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει την τιμή OD₆₀₀ 0.5 έως 1.0 (η τιμή 0.6 λειτουργεί καλύτερα)
- Κρύωμα της καλλιέργειας στον πάγο. Φυγοκέντριση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 3000 στροφές για 5min στους 4°C
- Αποβολή του υπερκείμενου διαλύματος. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml διαλύματος 20mM CaCl₂. Διανομή 0.1ml ποσοτήτων σε προκρυωμένα erpendorf tubes ⁽¹⁾
- Προσθήκη περίπου 1μg πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα ⁽²⁾
- Πάγωμα των κυττάρων σε υγρό άζωτο ⁽³⁾
- Ξεπάγωμα των κυττάρων με επώαση του erpendorf tube σε υδατόλουτρο των 37°C για 5min
- Προσθήκη 1ml LB θρεπτικού μέσου στο erpendorf tube και επώαση στους 28°C για 2-4 ώρες με απαλή ανάδευση. Αυτή η περίοδος επιτρέπει τα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο αντιβιοτικής αντοχής.
- Φυγοκέντριση των erpendorf tubes για 30sec. Αποβολή του υπερκείμενου διαλύματος και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 0.1ml LB θρεπτικό μέσο
- Στρώσιμο των κυττάρων σε τριβλίο YEP/agar που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Επώαση στους 28°C. Οι μετασχηματισμένες αποικίες θα εμφανιστούν σε 2-3 μέρες ⁽⁴⁾

¹ Τα κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν στους -80°C. Τα παγωμένα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελλοντικά πειράματα μετασχηματισμού.

² Το πλασμίδιο μπορεί να είναι είτε CsCl- ταινωτό DNA ή ακατέργαστο παρασκεύασμα που απομονώθηκε από μία γρήγορη, μικρής κλίμακας διαδικασία.

³ Το γρήγορο πάγωμα είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας της διαδικασίας. Πάγωμα σε ξηρό πάγο/λουτρό αιθανόλης συχνά μειώνει σημαντικά τη συχνότητα μετασχηματισμού.

⁴ Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών ποικίλει εξαρτώμενη από το στέλεχος του *Agrobacterium* και τον δείκτη αντιβιοτικής αντοχής που χρησιμοποιείται.

2.γ.2. Πρωτόκολο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium tumefaciens*

A) Αλκαλική λύση απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από *Agrobacterium tumefaciens*

- 1.5ml καλλιέργειας *Agr. tumefaciens* μεταφέρεται σε erpendorf και φυγοκεντρούμε για 2min στις 13000rpm
- Αποβολή υπερκειμένου
- Προσθήκη 200μl διαλύματος P1 αλκαλικής λύσης και επαναιώρηση του ιζήματος
- Προσθήκη λυσοζύμης με οδοντογλυφίδα
- Ανακάτεμα με vortex για 20sec
- Επώαση του erpendorf tube στους 37°C για 15min
- Προσθήκη 200μl P2 διαλύματος αλκαλικής λύσης και χρήση vortex για 20sec
- Προσθήκη 50μl φαινόλης και χρήση vortex για 1min
- Προσθήκη 200μl P3 διαλύματος αλκαλικής λύσης και χρήση vortex για 20sec
- Φυγοκέντριση για 5min στις 13000rpm
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη δύο όγκων παγωμένης αιθανόλης 100%
- Επώαση στον πάγο για 10min
- Φυγοκέντριση για 10min στις 13000rpm
- Αποβολή της αιθανόλης και αφήνουμε να στεγνώσουν τα tubes
- Προσθήκη 25μl dH₂O και επαναδιάλυση

B) Μετασχηματισμός του απομονωμένου DNA

- Μετασχηματισμός 100μl κυττάρων DH5a (*E. Coli* στέλεχος) με τα 25μl DNA που απομονώθηκαν
- Στρώσιμο τριβλίου LB (που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό)

Γ) Έλεγχος παρουσίας ένθετου

- Επιλογή μονής αποικίας και ανάπτυξη της με ολονύχτια επώαση σε 5ml LB θρεπτικό διάλυμα που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό
- Εφαρμογή του πρωτοκόλλου της αλκαλικής λύσης στην καλλιέργεια για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA
- Πέψη του DNA με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ανάλυση των πέψων σε πηκτική αгарόζης χρησιμοποιώντας και δείκτη αναφοράς μοριακών μαζών

- Ανάλογα με τα αποτελέσματα, έλεγχος για την ύπαρξη της επιθυμητής ένθεσης στα μετασχηματισμένα DH5a κύτταρα οπότε και στα μετασχηματισμένα κύτταρα *Agrobacterium* από όπου προήλθε το DNA.

2.δ. Μετασχηματισμός φυτών *A. thaliana* με *Agrobacterium tumefaciens*

Υλικό εκκίνησης: Μετασχηματισμένες μονές αποικίες *Agrobacterium tumefaciens* που έχουν αναπτυχθεί σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB που περιέχουν τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής.

Πρωτόκολλο:

- Ανάπτυξη μονής αποικίας σε 5ml υγρού θρεπτικού διαλύματος LB (που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά) με επώαση για 24-36 ώρες στους 28°C
- Μεταφορά 3ml από την καλλιέργεια σε 300ml LB (χωρίς αντιβιοτικά) σε κωνική φιάλη των 1000ml
- Επώαση στους 28°C με έντονη ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα να πάρει την τιμή $OD_{550} = 2$
- Ένωση των δύο κωνικών φιαλών: έχουμε 600ml διαλύματος
- Φυγοκέντρωση του διαλύματος για 10min στους 28°C στις 4500rpm
- Αποβολή υπερκειμένου και επαναιώρηση ιζήματος με 800ml διαλύματος αεροδιήθησης
- Εμβάπτιση των φυτών στο διάλυμα αεροδιήθησης

Διάλυμα αεροδιήθησης: για 1lt :	2.15gr	½ MS salts
	2ml	1xB5 vitamins (x500)
	50gr	5% sucrose
	0.5gr	0.5MES/lt
	150μl	Silwet
	10μl	BAP of 1mg/ml DMSO stock
	pH 5.7	KOH 1N

2.ε. Απομόνωση γενωματικού DNA από φυτά *Arabidopsis thaliana* με τη μέθοδο CTAB

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

- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10000 r/min για 12min.
- Προσδιορισμός του όγκου του υπερκείμενου διαλύματος και πάλι. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα κατακρήμνισης CTAB 1% w/v, σε αναλογία 1:1.3 σε σχέση με τον όγκο του υπερκείμενου. Το δείγμα αναμιγνύεται και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 10000 r/min για 12min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναιώρηση ιζήματος σε 0.5ml REB (ρυθμιστικού διαλύματος επαναδιάλυσης) για κάθε gr φυτικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε.
- Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης. Ανάμιξη και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 r/min για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα επαναδιαλύεται σε 400μl ddH₂O και υφίσταται καθαρισμό με φαινόλη, φαινόλη-χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο.
- Μετά το τέλος του καθαρισμού τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με διπλάσιο όγκο αιθανόλης.
- Μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 r/min, το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλης. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα ddH₂O.

Διαλύματα:

- **SEVAG:** χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (24: 1)
- **1% CTAB** διάλυμα κατακρήμνισης DNA : 1% w/v CTAB (Cetyl- Trimethyl- Ammonium Bromide), 50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA pH8
- **2x CTAB** buffer : 2% w/v CTAB, 100mM Tris-HCl pH8.5, 20mM EDTA pH8, 1.4M NaCl, 1% w/v PVP (Πολυβινυλ-πιρρολιδόνη, MB=40000), 1% w/v DTT
- **5% CTAB** : 5% w/v CTAB, 0.35M NaCl
- **REB** διάλυμα επαναδιάλυσης DNA : 10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA pH8, 1M NaCl

2.στ. Καθορισμός DNA με φαινόλη

- Σε φιαλίδιο erppendorf που περιέχει το προς καθαρισμό δείγμα DNA προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης και ανακινούμε μέχρι να επιτευχθεί ανάμιξη των δύο φάσεων.
- Φυγοκέντρηση για 4min, στις 12000 r/min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο erppendorf και προστίθεται ίσος όγκος μίγματος φαινόλης: χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Έντονη μίξη.
- Φυγοκέντρηση για 4min, στις 12,000 r/min.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Έντονη μίξη.
- Φυγοκέντρηση για 4min, στις 12000 r/min.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται: α) 1/10 του όγκου, 3M CH₃COONa, pH4.8 και β) δύο όγκοι αιθανόλης, με σκοπό την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων. Το δείγμα επώάζεται για 12 ώρες, στους -20°C και στη συνέχεια, φυγοκεντρείται για 15min, στις 12000 r/min, στους 4°C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο, όγκο ddH₂O.

2.ζ. Απομόνωση ολικού RNA από φυτά *Arabidopsis thaliana*

- Ιστός *Arabidopsis* μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης : extraction buffer.
- Έντονη λειοτριβίση με έμβολο μέχρι να διαλυθεί τελείως ο ιστός.
- Ξέπλυμα του εμβόλου με ίσο όγκο φαινόλης : extraction buffer μέσα στο erpendorf.
- Έντονη ανάμιξη με vortex μέχρι να ενωθούν οι δύο φάσεις.
- Φυγοκέντριση για 5min στις 13000 r/min.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1).
- Έντονη ανάμιξη με vortex.
- Φυγοκέντριση για 5min στις 13000 r/min.
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).
- Έντονη ανάμιξη με vortex.
- Φυγοκέντριση για 5min στις 13000 r/min
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erpendorf και προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa pH 4.8 και 2.5 όγκους παγωμένη EtOH 100%.
- Ελαφριά ανάμιξη και επώαση στους -20°C ο/n.
- Φυγοκέντριση για 20min στις 13000rpm στους 4°C.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε κατάλληλο όγκο ddH₂O.

Διάλυμα:

- **Διάλυμα απομόνωσης RNA:** 100mM Tris-HCl pH9.5, 0.5%SDS (w/v)

2.η. Χειρισμός με DNase

Ο χειρισμός των δειγμάτων RNA με DNase έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της PROMEGA: RQ1 RNase-free DNase (M610A).

2.θ. Βακτηριακά στελέχη

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση πλασμιδίων είναι το DH5a (*Escherichia coli*). Το στέλεχος αυτό έχει υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ($>2 \times 10^6$ transformants/ μg of plasmid DNA). Ο γενότυπός του χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ περιοχής που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την α- 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 υπόστρωμα που περιέχει X-gal και IPTG.

Το στέλεχος DH5a φέρει την ιδιότητα *recA1*, η οποία δεν επιτρέπει ανασυνδυασμό μεταξύ του μετασχηματισμένου φορέα που κλωνοποιείται, όταν αυτός περιέχει ένθετο μεγαλύτερο από 10Kb, και του γονιδιώματος του βακτηρίου. Γι' αυτό το συγκεκριμένο στέλεχος είναι κατάλληλο και για την κλωνοποίηση κοσμιδίων.

2.1. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

2.1.1. Προετοιμασία “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους (DH5a) αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C.
- Μεταφορά 2ml από την αρχική καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB (αναλογία 1:100).
- Επώαση των κωνικών φιαλών στους 37°C (+shaker) μέχρι η οπτική πυκνότητα να γίνει $\text{O.D.}_{550}=0.5$.
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο.
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε πλαστικό μπουκάλι και φυγοκέντριση για 5min στις 5000 r/min στους 4°C (πλήρης ισοζύγισή απαραίτητη). Κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο CaCl_2 25mM. Προσθήκη όγκου ίσου με του μισού του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας.
- Επανάληψη ίδιου τρόπου κατακρήμνισης.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο CaCl_2 75mM. Προσθήκη όγκου ίσου 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 τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- Αποθήκευση και διατήρηση των “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων στους -80°C.

2.1.2. Μετασχηματισμός “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων E.coli με πλασμιδιακό DNA

- Σε 200μl “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 1-2min 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.
- Φυγοκέντριση του διαλύματος στις 13000g/min για 1min και απομάκρυνση των 2/3 του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και επιστροφή κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής που διαφέρει κατά περίπτωση.
- Επώαση των τριβλίων για 12-16 ώρες σε θάλαμο 37°C.

2.1.3. Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασχηματισμού (Transform efficiency)

- Χωρίζουμε το τριβλίο σε τεταρτημόρια και μετράμε τις αποικίες σε ένα από αυτά. Έστω ότι έχουμε n αποικίες.
 - Στο τριβλίο έχουμε: $4 \times n = 4n$ αποικίες.
 - Έστω ότι έχουμε μετασχηματίσει τα βακτηριακά κύτταρα με περίπου 10ng πλασμιδιακού DNA.
 - Οπότε: στα 10ng έχουμε 4n αποικίες
στα 1000ng $x?$
 $x = 400n$ αποικίες
- Οι 400n αποικίες αντιστοιχούν στην ποσότητα που επιστρώθηκε. Έστω ότι επιστρώσαμε y μl από τα z μl που είχαμε αρχικά (στο erpendorf).
Στα y μl που επιστρώσαμε έχουμε 400n αποικίες
στα z μl $x?$
 $x = 400nz/y$ αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA.
- Για τον υπολογισμό της transform efficiency των “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων: ικανοποιητικό εύρος αποδοτικότητας: $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA.

Διαλύματα:

- **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 dH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C
- **Kanamycin** : 50mg/ml σε dH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C
- **Bacteria transformation buffer (BTB) 25mM CaCl₂** : 25mM CaCl₂ σε 10mM Tris-HCl pH8 (0.376gr CaCl₂ για διάλυμα 100ml)
- **BTB 75mM CaCl₂** : 1.1gr CaCl₂ σε 10mM Tris-HCl pH8 (1.1gr CaCl₂ για διάλυμα 100ml)

2.κ. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

Για να αποθηκεύσουμε βακτήρια για μεγάλα χρονικά διαστήματα ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

- Εμβολιάζουμε με μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους που θέλουμε να αποθηκεύσουμε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο (συνήθως LB ή TY) που περιέχει κάποιο αντιβιοτικό στο οποίο είναι ανθεκτικό το στέλεχος, με σκοπό να αποφύγουμε ενδεχόμενες μολύνσεις, και γίνεται επώαση στους 37°C με συνεχή ανάδευση για 12-16h.
- Στη συνέχεια, μεταφέρονται 700μl από την παραπάνω καλλιέργεια σε φιαλίδιο erpendorf και προστίθονται 350μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%.
- Αναμιγνύουμε έντονα και ψύχουμε το φιαλίδιο με υγρό άζωτο.
- Τοποθετούμε τα κύτταρα στους -80°C όπου μπορούν να διατηρηθούν ζωντανά έως και 10 χρόνια.

2.λ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης πλασμιδιακού DNA με τη βοήθεια φυγοκέντρου

- Μεταφορά 1.5ml από υγρή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε ο/η σε LB με κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής σε erpendorf και φυγοκέντριση 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
1ml διαλύματος P1: 920μl ddH₂O
50μl 1M Tris-HCl pH8
20μl 0.5M EDTA
10μl RNase 10mg/ml
- Προσθήκη 0.2ml διαλύματος P2, ανάδευση ελαφρά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές και επώαση του erpendorf ανοικτό σε RT (θερμοκρασία δωματίου) για 4min.
1ml διαλύματος P2: 930μl ddH₂O
50μl 20% SDS
20μl 10N NaOH
- Προσθήκη 0.2ml παγωμένου διαλύματος 3M CH₃COOK/5M CH₃COOH και καλή ανάμιξη μέχρι να εμφανιστούν λευκά κομμάτια.
- Επώαση στον πάγο για 15min.
- Φυγοκέντριση για 20min στις 13000r/min.
- Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
- Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης Et-OH 100%(αιθανόλη) και καλή ανάμιξη.
- Επώαση για 20min σε RT.
- Φυγοκέντριση στις 13000r/min για 15min.
- Απομάκρυνση της Et-OH χωρίς τίναγμα και επώαση σε RT ανοικτό για στέγνωμα.
- Προσθήκη κατάλληλου όγκου ddH₂O και επαναδιάλυση του ιζήματος.
- Αποθήκευση και διατήρηση στους -20°C.

Διαλύματα:

- **P3** διάλυμα αλκαλικής λύσης : 100ml P3: 60ml 3+5M CH₃COOK, 11.5ml CH₃COOH, 28.5ml dH₂O
- **RNase A** : Μητρικό διάλυμα RNAσης A 10mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH7.4, 15mM NaCl. Βρασιμός του διαλύματος για 15min, διακοπή για 20min και επανάληψη βρασιμού. Φυλάσσεται στους -20°C.

2.μ. Αντιδράσεις με ένζυμο περιορισμού

Για να δράσει ένα ένζυμο περιορισμού, δηλαδή να αναγνωρίσει και να “κόψει” μια εξανουκλεοτιδική αλληλουχία βάσεων, χρειάζεται κατάλληλες συνθήκες. Πρώτον, πρέπει να υπάρχει ένα υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να είναι πλασμιδιακό DNA, γενωματικό DNA ή DNA φάγου και να περιέχει τουλάχιστον μια αλληλουχία έξι βάσεων, η οποία να αναγνωρίζεται από το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού. Επίσης, και η καθαρότητα του υποστρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στο βαθμό που θα προχωρήσει η αντίδραση αφού πολλές φορές κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA μπορεί να μεταφέρονται παράγοντες που να δρουν περιοριστικά για τη δράση των ενζύμων.

Δεύτερον, η ποσότητα και η ποιότητα του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου (buffer) παίζουν ρόλο. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρέχονται κυρίως έτοιμα με το ένζυμο περιορισμού από την εταιρεία προέλευσης και η ποσότητα που χρησιμοποιείται είναι το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης από 10x buffer. Τρίτον, η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται παίζει σημαντικό ρόλο. Περιοριστικό ρόλο στην ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται αποτελεί η συγκέντρωση της γλυκερόλης που περιέχεται στο διάλυμα συντήρησης του ενζύμου η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% στον τελικό όγκο της αντίδρασης. Ο όγκος της αντίδρασης όπου λαμβάνει χώρα η πέψη κυμαίνεται μεταξύ 30-50μl.

Σε φιαλίδιο erppendorf προσθέτουμε:

- 10x ρυθμιστικό διάλυμα: 10% του τελικού όγκου
- Δείγμα DNA: μέχρι 80% του τελικού όγκου
- Ένζυμο περιορισμού: μέχρι 10% του τελικού όγκου
- ddH₂O: μέχρι το 100% του τελικού όγκου

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε το δείγμα και επωάζουμε στους 37°C για 1-2h (η άριστη θερμοκρασία λειτουργίας των περισσότερων ενζύμων περιορισμού).

2.μ.1 Επίλογή ενζύμων περιορισμού για την ανίχνευση κατά Southern

Για να είναι δυνατή η μελέτη του μεθυλώματος των *LFY::HSP90RNAi* φυτών θα πρέπει τα ένζυμα περιορισμού που θα επιλεγούν για την ανάλυση κατά Southern να είναι ευαίσθητα στην μεθυλίωση. Δηλαδή, να πέπτουν ή όχι την ακολουθία που αναγνωρίζουν ανάλογα με το αν είναι μεθυλιωμένη ή όχι. Επιλέχθηκαν τέσσερα ένζυμα περιορισμού τα οποία είναι ευαίσθητα σε διαφορετικά είδη μεθυλίωσης του DNA. Τα ένζυμα αυτά είναι:

MspI : αναγνωρίζει την τετρανουκλεοτιδική αλληλουχία C’CGG και είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση τύπου mCNG. Αναγνωρίζει και πέπτει την ακολουθία όταν δεν είναι μεθυλιωμένη η κυτοσίνη στο 3’ άκρο.

HpaII : αναγνωρίζει την τετρανουκλεοτιδική αλληλουχία C'CGG και είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση τύπου mCG. Αναγνωρίζει και πέπτει την ακολουθία όταν δεν είναι μεθυλιωμένη η κυτοσίνη στο 5' άκρο.

EcoRII : αναγνωρίζει την τετρανουκλεοτιδική αλληλουχία 'CCWGG και είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση τύπου Dcm (CmCA/TGG). Αναγνωρίζει και πέπτει την ακολουθία όταν δεν είναι μεθυλιωμένη η κυτοσίνη στο 5' άκρο.

ClaI : αναγνωρίζει την εξανουκλεοτιδική αλληλουχία AT'CGAT και είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση τύπου Dam (GmATC). Αναγνωρίζει και πέπτει την ακολουθία όταν δεν είναι μεθυλιωμένη η αδενίνη στο 3' άκρο.

2.ν. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

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

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

Αν θέλουμε να εκτιμήσουμε το μέγεθος των ζωνών του DNA (μετά από πέψη), ηλεκτροφορούμε δίπλα στα δείγματά μας δείκτες (ladders) οι οποίοι έχουν καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη. Ένας γνωστός δείκτης που χρησιμοποιείται ευρέως είναι ο λ-βακτηριοφάγος μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *HindIII*. Τα μεγέθη που δίνει είναι: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 και 125.

Διαλύματα:

- **TAE 50x** : 24.2gr (w/v) Tris-base, 100ml 0.5M EDTA pH8 (Ethylene- Diamine- Tetracetic Acid disodium salt), 57ml CH₃COOH για 1lt ρυθμιστικού διαλύματος
- **Ethidium Bromide** (EtBr) : 10mg/ml H₂O. 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 dH₂O, 50% σουκρόζη
- **Πηκτή αγαρόζης**: 100ml 0.8%: 98ml ddH₂O, 2ml TAE 50X, 0.8gr αγαρόζη, 5μl EtBr

2.ξ. 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 συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) 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.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pGEMT-easy, pSPYNE, pSPYCE, pGADT7 και ο pGBKT7. Η κάθε αντίδραση ενοποίησης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 15μl.

Σε φιαλίδιο erppendorf προστίθενται:

1. Κατάλληλη ποσότητα DNA, ώστε με δεδομένη ποσότητα πλασμιδιακού φορέα (συνήθως 25ng) να επιτυγχάνεται η επιθυμητή αναλογία μορίων τμήματος DNA: φορέα. Για την αναλογία ισχύει ο τύπος :

Αναλογία= μέγεθος φορέα (Kb) x ng τμήματος DNA/ ng φορέα x μέγεθος τμήματος DNA (Kb).

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

2. Κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (Ligation buffer) 10x ή 2x, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1x.

3. 1μl T4 DNA λιγάσης (3 Weiss units).

4. ddH₂O μέχρι συμπλήρωση του όγκου της αντίδρασης.

Το δείγμα αναμιγνύεται και τοποθετείται για 12h στους 14-16°C.

Διάλυμα:

- **2x ligation buffer** : 30mM Tris-HCl pH7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG

2.ο. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

- Σύνθεση πρώτης αλυσίδας : σε φιαλίδιο PCR 0.2ml προσθέτουμε 1μl oligodT
x μl ολικό RNA
1μl dNTPs
10mM
ddH₂O μέχρι τα
12μl
- Επώαση στους 65°C για 5min σε PCR κεφαλή
- Τοποθέτηση των φιαλιδίων αμέσως στον πάγο
- Σύντομη φυγοκέντριση των φιαλιδίων
- Προσθέτουμε στη συνέχεια : 4μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα
2μl DTT
1μl RNase out
1μl Ανάστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase)
- Επωάζουμε την αντίδραση σε PCR κεφαλή με το εξής πρόγραμμα : 42°C για 1h
70°C για
15min
- Χρησιμοποιούμε κατάλληλη ποσότητα από την RT αντίδραση για PCR αντίδραση

2.π. Αλυσιδωτή αντίδραση της 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 συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x ή 2x	1x	5μl
dNTPs	10mM από καθένα	200μM	1μl
Άνω εκκινητής	10μM	200nM	1 μl
Κάτω εκκινητής	10μM	200nM	1μl
DNA μήτρα	-	-	Ποικίλει
DNA πολυμεράση	(units/μl)	(units)	μl
Expand TM High Fidelity (Roche)	3.5	2.6	0.75
Taq (Invitrogen)	5	1	0.2
ddH ₂ O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl		

Το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να περιέχει MgCl₂, συνήθως σε συγκέντρωση 15mM ή όχι, οπότε παρέχεται ξεχωριστά ως πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 50mM. Η ικανοποιητικότερη και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τελική συγκέντρωση ιόντων Mg⁺² είναι 1.5mM.

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. Η συσκευή διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι και γι' αυτό δεν χρειάζεται η προσθήκη λαδιού στις αντιδράσεις PCR.

Οι θερμοκύκλοι επιλέγονται με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται παρακάτω:

1x	α)Αποδιάταξη της DNA μήτρας για 2min στους 94°C
25-40x	β)Αποδιάταξη στους 94°C για 30sec γ)Υβριδισμός εκκινητών συνήθως σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το Tm των εκκινητών για 30-40sec ⁽¹⁾ δ)Επιμήκυνση στους 72°C για την Expand HiFi και για την Taq In vitro, για χρόνο που ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του πολυμερισμού και των προδιαγραφών του ενζύμου
1x	ε)Τελική επιμήκυνση και κατανάλωση του ενζύμου για 7-10min, στη θερμοκρασία επιμήκυνσης

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

(1): Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης Tm. Η άριστη θερμοκρασία στην περίπτωση DNA*DNA υβριδισμού είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης του υβριδίου (Tm).

Η θερμοκρασία Tm υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log M + 0.41(\%G+C) - 0.61(\%\text{φορμαμίδιο}) - 500/n$$

Όταν τελειώσουν οι αντιδράσεις PCR, αναλύονται σε πηκτή αгарόζης 0.8-1.2% ανάλογα με το αναμενόμενο μήκος των αποτελεσμάτων. Οι αντιδράσεις PCR αποθηκεύονται στους -20°C.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR της παρούσας εργασίας εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα :

Ονομασία εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία με κατεύθυνση 5' - 3'
RB1	TCATAGCCGAATAGCCTCTCC
RB2	TTATGGAACGTCAGTGGAGC
RB3	TTGCGGTTCTGTCAGTTCC
LB1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LB2	TGGAACAACACTCAACCCTATCTCG
LB3	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
Ad1.1	TG(AT)G(AGCT)AG(GC)A(AGCT)CA(GC)AGA
Ad1.2	(AGCT)TCGA(GC)T(AT)T(GC)G(AT)GTT
Ad2.1	(AGCT)GTCGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GAA
Ad2.2	AG(AT)G(AGCT)AG(AT)A(AGCT)CA(AT)AGG
Ad3.1	(GC)TTG(AGTC)TA(GC)T(AGCT)CT(AGCT)TGC
Ad5.1	(AT)GTG(AGCT)AG(AT)A(AGCT)CA(AGCT)AGA
17300F	CGTAAACCAACTTCTCTCCCTATCTC
17300R	GAATGAAAGTAACGCCACACACAC
21930F	CTTGTGGGTTATAGAGGATGCTGC
21930R	TATTGAAAGCTAACCATGAGGGC
3chrom2nd-F	GTTTGGCGTGGGCTATAAGG
3chrom2nd-R	CCCACCTCTCATTGTAAATCCC
HSP-F	AAAGAATTCATGGAGGCGTTGG
HSP-R	CAAGCTGTCCTTCAACTGAGAAAT
AT18S-F	TTGATTCTATGGGTGGTGGT

AT18S-F	CCTTGTTACGACTTCTCCTT
UFO-F	CCAGTAGCAACAGTAGCAC
UFO-R	GAGGGTTACACAAGAGAATGG
SUP-F	TGAGGAACAGCTTCTATGGCCG
SUP-R	CTTGTAGCCTCTCCAGCCTCCAC
Cmt3RT-F	GTACCTGGCCTGACAGATACAAACC
Cmt3RT-R	CTCTGATATGGCAGCAGCTCC
Dmt7RT-F	CGGGAGCGCTTCTGCTTAATCTG
Dmt7RT-R	GCTGGCAGTTTCTTAGCCTCTGG
Dcl1RT-F	GGGACGAGGCGGGTAACAATAAG
Dcl1RT-R	CCAAAGGCACTTTGGGAACCAAG
Dcl2RT-F	GGATGCTGATGCGATGGAAACTG
Dcl2RT-R	CTCAGAAAATATGCCTCAACGCG
Dcl3RT-F	GACTGCGTCAGCCGTCATTAG
Dcl3RT-R	GCTTTGGAGATACATGCCAG
Dcl4RT-F	GGACCCAATTCTTCTTCACTAG
Dcl4RT-R	GACAGAGTCCGCTATGACCTTGGC
ErectaRT-F	AGGGAGCAACGTTGCTGGAG
ErectaRT-R	CTAAGTTGTTTCTCGCAACCC
Erl1RT-F	GGAGAAGATGCAGCGAATGG
Erl1RT-R	CACCCGTTAGATGATTGCCAGC
SEP3-F	GATATCTTTTGGGAGAGGAGAAAG
SEP3-R	GTCTCAGTCAGCATGCGTTCC
GA3ox1-F	AAGAGCAAGATGCCTGCTATG
GA3ox1-R	ACGATATCGCAGTAGTTGAGG
GA20ox2-F	CTCCATGCCAAACACCAGATC
GA20ox2-R	TTCACCATGAGAACAAGGAC
GA20x2-F	CAGATAATCTCAGTGCTAAGATC
GA20x2-R	AAGCTAATCCAAAACACTATCC
AGO4-F	CCAAAGAACAATGATTTCTACCTC
AGO4-R	GGGACAAAAGCATATTCAAACC
Frigida-F	GGAGGAAAAGGTTGATGACTGAAG
Frigida-R	CTTCCATCTCTTTGTGCGAGCTG
FCA-F	AGCAACAGAAACAGCAACAAC
FCA-R	GAAAAGATAGAATGCAGATGGTC
Agl24-a	TAAAGTGGGTGCTGAGATTGAATAACG
Agl24-b	TTGGCTCATACAACACTGGCCCTTC
AP1-F	CCTAAAGAGCTTCAGAATCTGGAGC
AP1-R	TTAATTGGATGAAAAGAGCCTAGCCAC
Cal-F	GAACCAATGAGCCTCAAGGATCTCC
Cal-R	TCGATGTAGTCTATTCAAGCGGCG
Clavata1-F	GGGCTTGTGTTATCTTCACCATGATTG
Clavata1-R	TATTTATCTTGCTTGGGTCAGAAACGC
Wuschel-F	CATGCAAGCTCAGGTAATGTGG
Wuschel-R	GCGAAGCATAGTTGTGAACATACGAG
STM-F	CTAAAGAAGCTCGTCAACAACCTGC
STM-R	AGAACAACACAAAAGGATACACACC
RLeafy-F	CAGGTCAAGGAAAGATGAAGAAGC
RLeafy-R	TGGAACATACCAAATAGAGAGACG
FUL-F	GATCTTGATTTCGTTGAGCTTGAAG
FUL-R	CGTCTCGACAACGGAGTTCCATC
FT-F	CAGAGAAACCACCTGTTTGTTC AAG
FT-R	AAGTCTTCTTCCCTCCG CAGCCAC
FD-F	GATTCCACCACGGTCACTGTCT
FD-R	TCAATCCCCAAAAGAGAAACAAGGAC
90univ-F	GGACTGCAAACATGGAGAGGAT
90univ-R	TTGTGCGACTTCCCTCCATCTTGC

SOC1-F	GCAGCATTGAAATATGAAGCAGC
SOC1-R	GAAATAAGACAACAAGAGAGAAGCAGC
TFL1-F	TCTCAGATCCTTCTTCACTTTGGTG
TFL1-R	TTCAGAGTACGGAAATTCAGAACAC
FLC-F	AACTAGAAATCAAGCGAATTGAG
FLC-R	GGTGACATCTCCATCTCAGCTTC
AP3-F	GAGACCACCAAGAAAAAGAAC
AP3-R	CAATAAGCCTAAGCACTACTG
Agamous-F	CAACCAAGTACAAAACCTTTTGTC
Agamous-R	GGAGAAGAACAAGGGGAAAG
90-SPLIT-F	ATATCTAGAACGACAATGGCGGACGCTGAAACC
90-SPLIT-R	ATAGGTACCGTCGACTTCCTCCATCTT
SOC1-SPLIT-F	ATAGGATCCGAAGATATGGTGAGGGGCAAA
SOC1-SPLIT-R	ATAGGTACCCTTTCTTGAAGAACAAGGTAACCC
90yeast-F	ATACATATGATGGCGGACGCTGAAACC
Yeast90/ClaI-R	ATAATCGATTTAGTCGACTTTTGTGTG
90yeast-R	ATACTGCAGTTAGTCGACTTTTGTGTG
SOC1yeast-F	ATACATATGATGGTGAGGGGCAAACT
SOC1yeast-R	ATAGGATCCTCACTTTCTTGAAGAACAAGG
yeastAgl24/ClaI-R	ATAATCGATTCATTCCCAAGATGGAAG
Agl24yeast-F	ATACATATGATGGCGAGAGAGAAGATAAGG
Agl24yeast-R	ATACTGCAGTCATTCCCAAGATGGAAG
CEN-At/F	CATATTCGACTCCAAAACACTAACC
CEN-At/R	AGAAGATACAAAGCCAAAGACTCAT
5S-rDNA/F	GTCCTGCTTCTTTCGTCGGAG
5S-rDNA/R	TTGGGCTATATTACGGACCCA
IfyBiNEW-F	GAATGT(CT)GATGAAAGAAAAAGTTGA
IfyBiNEW-R	T(AG)CTT(AG)AACCAAT(AG)CTCTC(AG)TT
Soc1BiNEW-F	AAATAGATGAAA(CT)GAGGAAAG(CT)TA
Soc1BiNEW-R	AT(AG)CAACCTCCTTTCAT(AG)A(AG)ATTTA
Bisup-F	GAAT(CT)AGT(CT)T(CT)TTT(CT)A(CT)AGT(CT)
Bisup-R	ACTA(AG)TAAT(AG)ATTT(AG)T(AG)(AG)TACATC

Διαλύματα:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10x** (Taq Invitrogen) : 200mM Tris-HCl, 500mM KCl, 50mM MgCl₂
- **dNTPs** : 10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM TTP, ddH₂O

2.π.1. PCR αποικιών

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε ποια τμήματα DNA έχουν υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Στην περίπτωση που είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει να έχει υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα, μπορούν να σχεδιαστούν συγκεκριμένοι εκκινητές (primers) και να πιστοποιήσουμε με αυτόν τον τρόπο την ένθεση ή όχι.

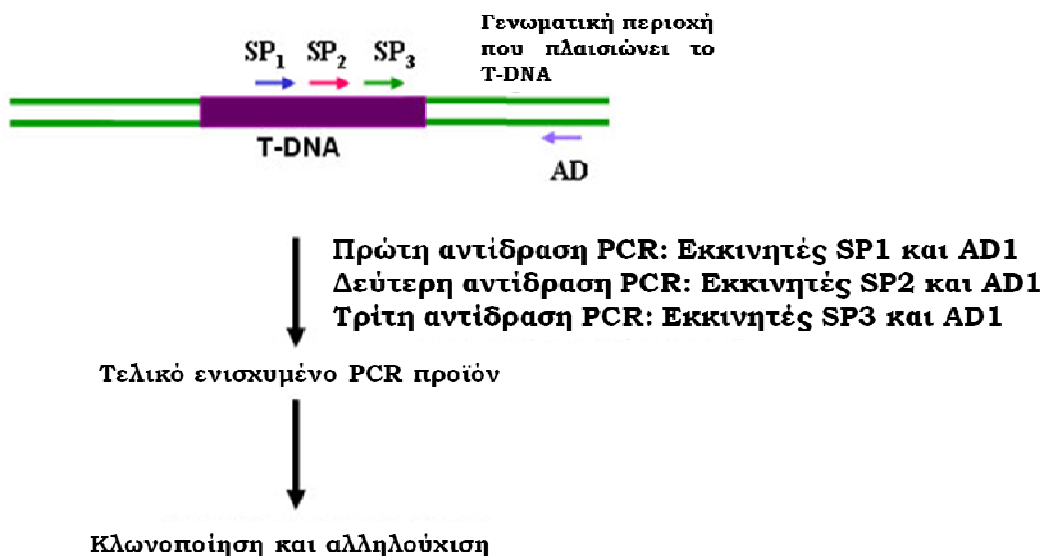
Μια άλλη περίπτωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος είναι ως ένδειξη για τα πιθανά επιθυμητά τμήματα που έχουν υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Στην περίπτωση αυτή, ως εκκινητές χρησιμοποιούνται οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR για την ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος. Η διαδικασία είναι η εξής:

- Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf τοποθετούνται 25μl ddH₂O
- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγουμε τη βακτηριακή αποικία από το στερεό υπόστρωμα και την τοποθετούμε στο erpendorf
- Στη συνέχεια περνάμε την οδοντογλυφίδα σε τμήμα τριβλίου με LB (και κατάλληλο αντιβιοτικό) ώστε να φτιάξουμε master plate
- Αποδιατάσσουμε τη διαλυμένη αποικία στους 96°C για 13min
- Προετοιμάζουμε τα δείγματα για την αντίδραση PCR μόνο που αντί για DNA χρησιμοποιούμε 6μl από το βακτηριακό αιώρημα
- Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του αναμενόμενου τμήματος. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 25
- Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα τα αποτελέσματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης. Το master plate επωάζεται για 12-16h στους 37°C και την επόμενη μέρα για τις αποικίες που μας ενδιαφέρει θα μπορέσουμε να βάλουμε υγρές καλλιέργειες σε LB (με κατάλληλο αντιβιοτικό). Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν χρησιμοποιούνται για περαιτέρω επεξεργασία ή αναμιγνύονται με γλυκερόλη για αποθήκευση στους -80°C

2.π.2. Tail PCR

Ως Tail-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) ορίζεται η μέθοδος με την οποία είναι δυνατή η ενίσχυση αγνώστων ακολουθιών που πλαισιώνουν γνωστές ακολουθίες, για παράδειγμα, οι γενωματικές ακολουθίες που συνωρεύουν με ένα T-DNA στοιχείο. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ένα ειδικό εκκινητή της γνωστής ακολουθίας και μια σειρά μικρότερων, εκφυλισμένων εκκινητών που μπορούν να υβριδίσουν στην άγνωστη ακολουθία.

Τα δείγματα υπόκεινται σε PCR ενίσχυση, εναλλάσσοντας τους κύκλους μεταξύ υψηλής και χαμηλής αυστηρότητας. Η πρώτη αντίδραση λαμβάνει χώρα σε συνθήκες υψηλής αυστηρότητας ώστε οι ειδικοί εκκινητές να υβριδίσουν στο DNA και να ακολουθήσει η ενίσχυσή του. Ακολουθεί ένας μη-ειδικός κύκλος ώστε να υβριδίσουν οι εκφυλισμένοι εκκινητές και να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα. Τυπικά, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως μήτρα για μια δεύτερη και μερικές φορές μια τρίτη αντίδραση χρησιμοποιώντας εσωτερικούς ειδικούς εκκινητές και την ίδια σειρά των εκφυλισμένων εκκινητών. Το πρωτόκολλο έχει περιγραφεί από τους Liu et al. (1995).



Εικόνα 1: Σχηματική αποϊκόνιση της γενικής αρχής της Tail-PCR αντίδρασης.

Πρόγραμμα πρώτης PCR αντίδρασης	
1.	4°C for 2min
2.	93°C for 1min
3.	95°C for 1min
4.	94°C for 30sec
5.	62°C for 1min
6.	72°C for 2min30sec
7.	*Go to 4, for 4 times
8.	94°C for 30sec
9.	25°C for 3min
10.	Ramp at 0.2°C per sec to 72°C
11.	72°C for 2min30sec
12.	94°C for 10sec
13.	68°C for 1min
14.	72°C for 2min30sec
15.	94°C for 10sec
16.	68°C for 1min
17.	72°C for 2min30sec
18.	94°C for 10sec
19.	44°C for 1min
20.	72°C for 2min30sec
21.	Go to 12 for 14 times
22.	72°C for 5min
23.	4°C hold
24.	end

Πρόγραμμα δεύτερης PCR αντίδρασης	
1.	4°C for 2min
2.	94°C for 10sec
3.	64°C for 1min
4.	72°C for 2min30sec
5.	94°C for 10sec
6.	64°C for 1min
7.	72°C for 2min30sec
8.	94°C for 10sec
9.	44°C for 1min
10.	72°C for 2min30sec
11.	Go to 2, for 11 times
12.	72°C for 5min
13.	4°C hold
14.	end

Πρόγραμμα τρίτης PCR αντίδρασης	
1.	4°C for 2min
2.	94°C for 10sec
3.	44°C for 1min
4.	72°C for 2min30sec
5.	Go to 2, for 19 times
6.	72°C for 5 times
7.	4°C hold
8.	end

Προετοιμασία πρώτης αντίδρασης	
DNA	1-2ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1x
dNTPs	0.2mM
Ειδικός εκκινητής 1	0.2μM
Εκφυλισμένοι εκκινητές (AD)	5μl
Ενζυμο (Taq Invitrogen)	0.04u/μl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 20μl
Προετοιμασία τρίτης αντίδρασης	
DNA	5μl από 100x αραιώση της δεύτερης αντίδρασης
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1x
dNTPs	0.2mM
Ειδικός εκκινητής 3	0.2μM
Εκφυλισμένοι εκκινητές (AD)	5μl
Ενζυμο (Taq Invitrogen)	0.03u/μl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 50μl

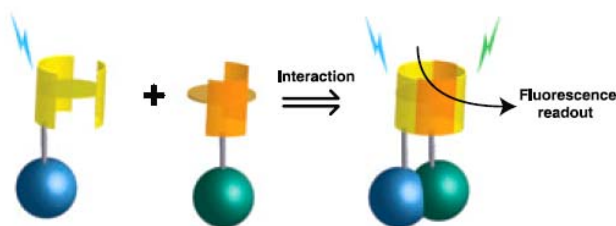
Προετοιμασία δεύτερης αντίδρασης	
DNA	4μl από 200x αραιώση της πρώτης αντίδρασης
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1x
dNTPs	0.2mM
Ειδικός εκκινητής 2	0.2μM
Εκφυλισμένοι εκκινητές (AD)	5μl
Ενζυμο (Taq Invitrogen)	0.03u/μl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 20μl

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

NGTCGASWGANAWGAA	128-fold degenerate, AD2 (Liu et al. 1995)
TGWGNAGSANCASAGA	128-fold degenerate, typo of AD1 (Liu and Whittier 1995)
AGWGNAGWANCAWAGG	128-fold degenerate, AD2 (Liu and Whittier 1995)
SITGNTASTNCTNTGCG	256-fold degenerate, AD5 (Taugeki et al. 1996)
NTCGASTWTSGWGTT	64-fold degenerate, AD1 (Liu et al. 1995)
WGTGNAGWANCANAGA	256-fold degenerate, AD3 (Liu et al. 1995)

S = G or C; W = A or T; N = A, C, G, or T.

2.ρ. BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) - SPLIT GFP σε *Nicotiana Benthamiana*



Εικόνα 2: Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in planta* σύμφωνα με το σύστημα SPLIT-GFP. Μια φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) χωρίζεται στα δύο και κάθε μια από τις δύο υπομονάδες είναι ανίκανη να παράγει φθορισμό. Όταν όμως πραγματοποιείται πρωτεϊνική σύντηξη της κάθε υπομονάδας με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, τότε οι δύο υπομονάδες έρχονται κοντά και η φθορίζουσα πρωτεΐνη έρχεται στην αρχική της μορφή δημιουργώντας ένα λειτουργικό φθοροφόρο.

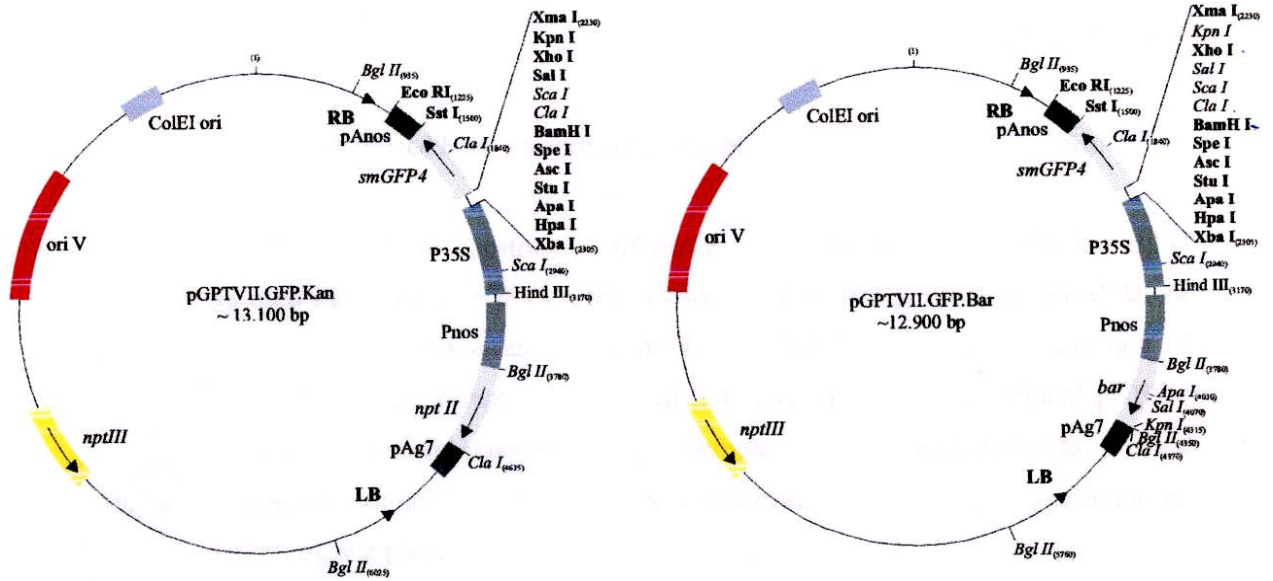
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι σύμφωνα με το τεχνικό εγχειρίδιο των Walter et al. (2004) για την οπτικοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω φθορίζουσας συμπληρωματικότητας σε ζωντανά φυτικά κύτταρα.

Αναλυτικά, 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 κλωνοποιούνται η μια σε κάθε φορέα στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την αντίστοιχη υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης. Στη

συνέχεια μετασχηματίζονται κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* με την κάθε κατασκευή ξεχωριστά. Μετά το πέρας 65-72 ωρών είναι 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 εξωγενής 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 χωρίς άμεση καταστολή από το φυτικό οργανισμό.

Πρωτόκολλο αγρο-διήθησης

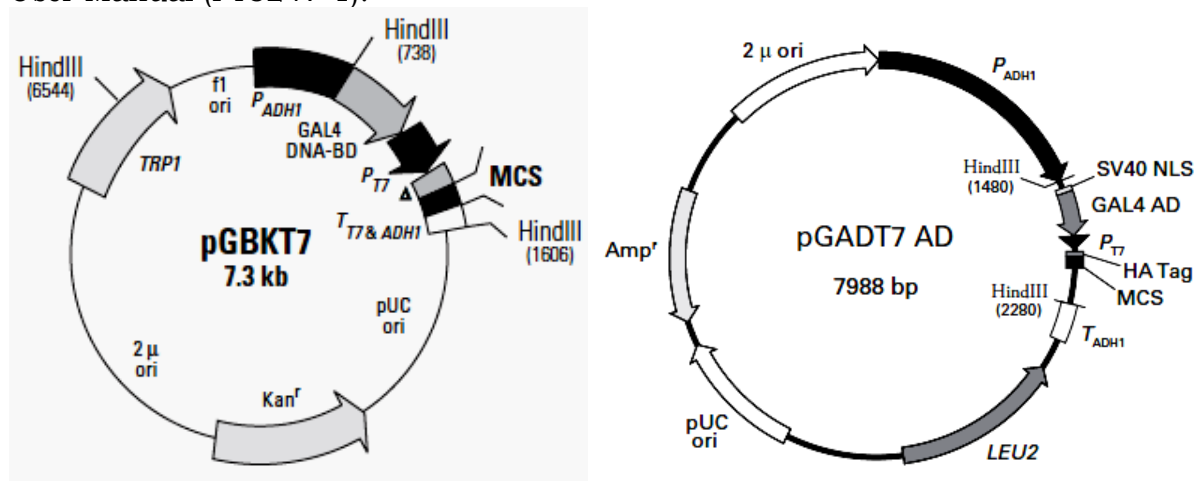
- Ανάπτυξη μονών αποικιών μετασχηματισμένων *Agrobacterium tumefaciens* που φέρουν ξεχωριστά τα πλασμίδια της αλληλεπίδρασης αλλά και το πλασμίδιο p19 σε 5ml θρεπτικού μέσου LB, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών επιλογής, ο/n
- Επανακαλλιέργεια κάθε μονής αποικίας με αραιώση 1:25 σε 10ml θρεπτικού μέσου LB για 4-5h στους 28°C παρουσία έντονης ανάδευσης μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει το $OD_{600}=0.7$
- Φυγοκέντριση για 15min στις 4000rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση υπερκειμένου 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
- Διάλυμα διήθησης: 10mM MES
10mM $MgCl_2$
150μM acetosyringone
pH 5.7



Εικόνα 3: Οι πλασμιδιακοί φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης pSPYNE (pGPTVII.GFP.Kan) και pSPYCE (pGPTVII.GFP.Bar) που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης στο σύστημα SPLIT-GFP.

2.σ. Σύστημα δυο υβριδίων

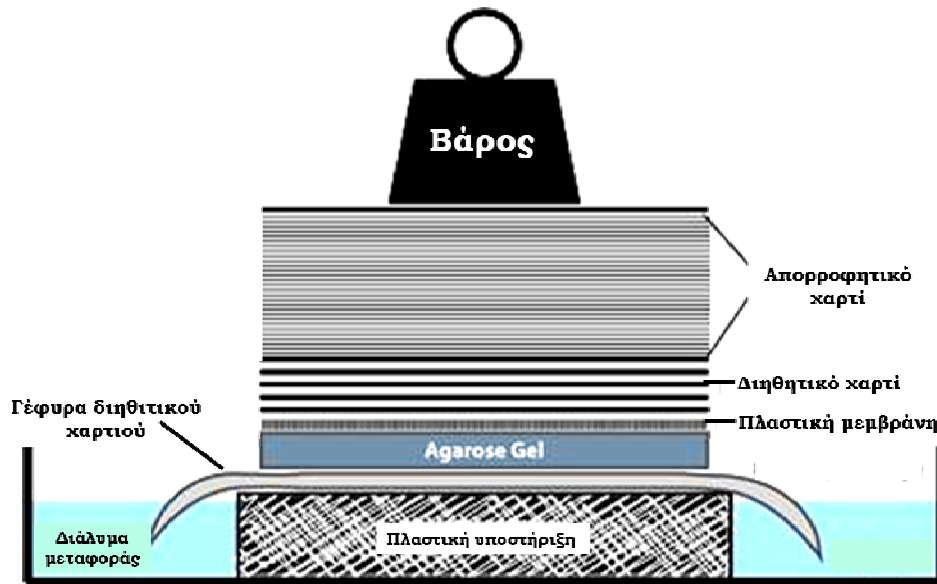
Ο έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Clontech: Yeast Protocol Handbook (PT3024-1) και Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3 and Libraries User Manual (PT3247-1).



Εικόνα 4: Οι πλασμιδιακοί φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης pGBKT7 και pGADT7 που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης στο σύστημα δυο υβριδίων της Clontech.

2.τ. Μεταφορά νουκλεϊκών οξέων κατά SOUTHERN

- Ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (DNA) σε πηκτική αγαρόζης παρουσία δείκτη μοριακών βαρών
- Μέτρηση της απόστασης που έχουν μετακινηθεί τα νουκλεϊκά οξέα με χάρακα από τα πηγαδάκια της πηκτής αγαρόζης
- Κόψιμο των περιττών τμημάτων αγαρόζης δεξιά και αριστερά από τα δείγματα
- Εμβάπτιση της πηκτής σε 0.25N HCl για 15min παρουσία ανάδευσης (ή μέχρι να αλλάξουν χρώμα οι χρωστικές του loading dye)
- Ξέπλυμα της πηκτής δύο φορές με ddH₂O
- Προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης 2x30min (2x250ml)
- Ξέπλυμα της πηκτής μια φορά με ddH₂O
- Προσθήκη διαλύματος ουδετεροποίησης 2x30min (2x250ml)
- Κόψιμο των απορροφητικών χαρτιών και της μεμβράνης :
3x Whatman στο μέγεθος της πηκτής
1x πλαστική μεμβράνη Boehringer Mannheim στο μέγεθος της πηκτής
2x Whatman στο πλάτος της πηκτής με μεγάλο μήκος που θα χρησιμοποιηθούν ως γέφυρα κατά τη συναρμολόγηση του 'σαντουιτς'
Πολλά απορροφητικά χαρτιά κουζίνας στο μέγεθος της πηκτής
- Συναρμολόγηση (Εικόνα):
 - 1.βρέξιμο των Whatman γεφυρών στο 20xSSC και τοποθέτηση στην επιφάνεια
 - 2.τύλιγμα με μεμβράνη γύρω-γύρω τα ελεύθερα σημεία της επιφάνειας
 - 3.τοποθέτηση της πηκτής πάνω στη γέφυρα κατευθείαν από το διάλυμα ουδετεροποίησης
 - 4.διαβροχή της μεμβράνης Boehringer σε 2xSSC και τοποθέτηση προσεκτικά πάνω στην πηκτική αφού έχει σημειωθεί η πλευρά όπου δε θα μεταφερθούν τα νουκλεϊκά οξέα
 - 5.τοποθέτηση ενός Whatman που έχει διαβραχεί σε 2xSSC
 - 6.τοποθέτηση των δύο Whatman
 - 7.τύλιγμα με μεμβράνη της επιφάνειας της γέφυρας εκτός από το 'σαντουιτς'
 - 8.τοποθέτηση από πάνω πολλά απορροφητικά χαρτιά
 - 9.τοποθέτηση μιας επιφάνειας πάνω από τα απορροφητικά χαρτιά
 - 10.τοποθέτηση βάρους (περίπου 0.5kg)
- Αφαίρεση βρεγμένων απορροφητικών χαρτιών μετά από μια ώρα περίπου και προσθήκη στεγνών
- Η μεταφορά λαμβάνει χώρα ο/n (12-16h)
- Μετά το πέρας της μεταφοράς αφαιρείται η μεμβράνη από το 'σαντουιτς', ξεπλένεται με 2xSSC και τοποθετείται σε στεγνό Whatman
- Η μεμβράνη ψήνεται για 2h στους 80°C
- Στη συνέχεια τοποθετείται η μεμβράνη σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας με την πλευρά του DNA προς την τράπεζα και εφαρμόζεται υπεριώδη ακτινοβολία για 1.5min
- Η μεμβράνη μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C μέχρι να λάβει χώρα ο υβριδισμός



Εικόνα 5: Συναρμολόγηση του 'σαντουιτς' ώστε να λάβει χώρα η μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων κατά Southern.

Διαλύματα:

- **Διάλυμα αποδιάταξης:** 1.5M NaCl, 0.5M NaOH
- **Διάλυμα ουδετεροποίησης:** 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.5
- **20xSSC:** 3M NaCl, 0.3M Sodium citrate
- **0.25N HCl:** 8.55ml HCl 37% (11.7N) σε 500ml ddH₂O

2.υ. Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων

- Τοποθέτηση του διαλύματος προϋβριδισμού καθώς και του γυάλινου σωλήνα που θα λάβει χώρα ο υβριδισμός στο θάλαμο υβριδισμού που είναι προθερμασμένος στους 65°C
- Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα στο σωλήνα με τη νουκλεϊκή πλευρά να κοιτά στο εσωτερικό του σωλήνα και προσθήκη 20ml διαλύματος προϋβριδισμού
- Επώαση για 1h στους 65°C
- Για κάθε 100cm² μεμβράνης χρησιμοποιούνται 3.5ml διαλύματος υβριδισμού και για κάθε 1ml διαλύματος υβριδισμού χρησιμοποιούνται 25ng ανιχνευτή
- Μετά το πέρας της 1h υπολογίζεται η ποσότητα του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί και λαμβάνει χώρα αποδιάταξη του για 5min με βρασμό και στη συνέχεια τοποθέτησή του στον πάγο
- Αφαίρεση διαλύματος προϋβριδισμού και προσθήκη διαλύματος υβριδισμού όπου έχει προστεθεί και ο ανιχνευτής (το διάλυμα υβριδισμού είναι ίδιο με το διάλυμα προϋβριδισμού)
- Ο υβριδισμός λαμβάνει χώρα στους 65°C ο/ν
- Μετά το πέρας του υβριδισμού ακολουθεί μια σειρά ξεπλυμάτων της μεμβράνης για την απομάκρυνση των μη ειδικών υβριδίων:
 1. Αφαίρεση διαλύματος υβριδισμού και ξέπλυμα της μεμβράνης με 5%SDS για 15min στους 65°C
 2. Αφαίρεση διαλύματος και προσθήκη 5%SDS για 15min στους 60°C
 3. Αφαίρεση διαλύματος και προσθήκη 1%SDS για 15min στους 55°C

4. Αφαίρεση διαλύματος και προσθήκη 1%SDS για 15min στους 50°C
5. Αφαίρεση διαλύματος και προσθήκη 1%SDS για 15min στους 45°C
6. Αφαίρεση διαλύματος και προσθήκη 1%SDS για 15min στους 40°C

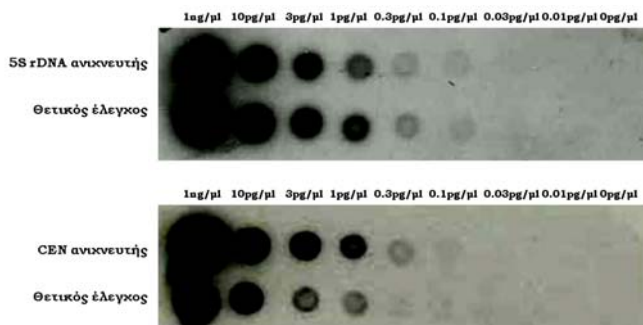
Διαλύματα:

- **1M NaP:** για 1000ml: 71gr Na_2HPO_4 ή 88gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ή 134gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4ml 85% H_3PO_4
- **10%BSA:** 10gr BSA σε 100ml ddH₂O
- **Church διάλυμα υβριδισμού:** για 20ml: 7ml 20%SDS, 10ml 1M NaP, 2ml 10% BSA, 1ml ddH₂O, 40μl 0.5M EDTA
- **5%SDS:** 40mM NaP, 5% SDS, 1mM EDTA
- **1%SDS:** 40mM NaP, 1% SDS, 1mM EDTA

2.φ. Ανίχνευση σήματος υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων

Μετά το πέρας των ξεπλυμάτων της μεμβράνης που ακολουθείται από την αντίδραση υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων, ακολουθείται το πρωτόκολλο ανίχνευσης σήματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο και σύστημα ανίχνευσης της Roche: Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11585614910)

Μετά τη σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποδοτικότητάς τους σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εγχειριδίου. Τα αποτελέσματα του ελέγχου παρουσιάζονται στην εικόνα 5. Μετά την ανίχνευση του σήματος των αραιώσεων των ανιχνευτών παρατηρήθηκε ότι η αποδοτικότητα των ανιχνευτών βρίσκεται σε ικανοποιητικά επίπεδα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις προτεινόμενες συγκεντρώσεις για την ανίχνευση κατά Southern.



Εικόνα 6: Φωτογραφίες φιλμ των αποτελεσμάτων του ελέγχου της αποδοτικότητας των ανιχνευτών 5S rRNA και CEN. Μετά το τέλος της σήμανσης του ανιχνευτή, ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις του σημασμένου ανιχνευτή και ενός σημασμένου DNA που χρησιμοποιείται ως θετικός έλεγχος. Μετά την ανίχνευση του σήματος συγκρίνεται η αποδοτικότητα του ανιχνευτή σε σχέση με τον θετικό έλεγχο. Αν το στίγμα της 0.1pg/μl αραιώσεως είναι εμφανές τόσο στον ανιχνευτή όσο και στον θετικό έλεγχο, τότε ο ανιχνευτής έχει φτάσει

τη μέγιστη αποδοτικότητά του και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην προτεινόμενη συγκέντρωση για ανίχνευση. Όλη η διαδικασία ακολουθεί το πρωτόκολλο της Roche: Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 745 832 910).

2.χ. Χειρισμός του DNA με SODIUM BISULFITE

Σε κάθε γενωματικό δείγμα DNA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση από αναπαραγωγικό ιστό. Χρησιμοποιήθηκαν 2μg DNA από κάθε δείγμα για μετατροπή με Sodium bisulfite που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το kit της Qiagen: EpiTect Bisulfite Kit (48) Cat. No. 59104. Το τελικό προϊόν της μετατροπής διαλύθηκε σε 20μl ddH₂O και χρησιμοποιήθηκαν 4μl για κάθε PCR αντίδραση. Η προετοιμασία της αντίδρασης αλλά και το πρόγραμμα της PCR αντίδρασης που ακολουθήθηκε ήταν κοινά για όλα τα δείγματα και για όλες τις προς μελέτη περιοχές

Προετοιμασία αντίδρασης

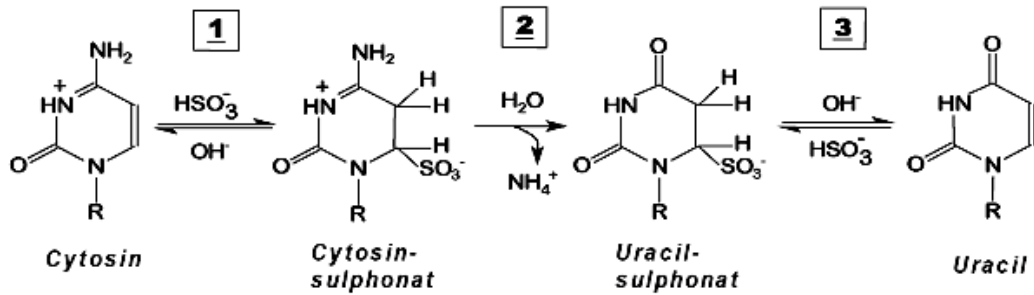
Ποσότητα	Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
4μl	DNA	
5μl	10x ρυθμιστικό διάλυμα	1x
2μl	MgCl ₂	2mM
5μl	Πρόσθιος εκκνητής	1μM
5μl	Αντίστροφος εκκνητής	1μM
1μl	dNTPs	200μM
0.5μl	Ταα πολυμεράση	2.5 μονάδες
27.7μl	ddH ₂ O	Τελικός όγκος 50μl

PCR πρόγραμμα

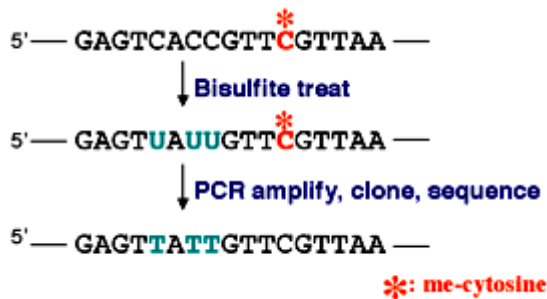
1.	94°C για 2 λεπτά
2.	94°C για 1 λεπτό
3.	50°C για 2 λεπτά
4.	72°C για 3 λεπτά
5.	Πήγαινε στο 2, 4 φορές
6.	94°C για 30 δευτ/πα
7.	50°C για 2 λεπτά
8.	72°C για 1.5 λεπτά
9.	Πήγαινε στο 6, 24 φορές
10.	72°C για 6 λεπτά
11.	10°C για πάντα

2.χ.1. Ιδιότητες του Sodium Bisulfite

Το Sodium Bisulfite είναι μια χημική ένωση με τον χημικό τύπο NaHSO₃. Όταν ένα δείγμα DNA χειρίζεται με Sodium Bisulfite, τότε όλα τα κατάλοιπα μη μεθυλιωμένων κυτοσινών μειρατέπονται σε κατάλοιπα ουρακίλης σύμφωνα με μια σειρά αντιδράσεων που παρουσιάζονται στην εικόνα 30, ενώ τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης παραμένουν ανεπηρέαστα. Αλληλουχώντας στη συνέχεια το δείγμα DNA, τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης εμφανίζονται ανεπηρέαστα στο αποτέλεσμα της αλληλούχισης, ενώ τα μη μεθυλιωμένα κατάλοιπα εμφανίζονται ως κατάλοιπα θυμίνης (Εικόνα 31). Συγκρίνοντας στη συνέχεια την αλληλουχία του τροποποιημένου DNA με την αλληλουχία αγρίου τύπου φανερώνονται τα μεθυλιωμένα ή μη κατάλοιπα κυτοσίνης.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της σειράς των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα κατάλοιπα κυτοσίνης κατά το χειρισμό του DNA με Sodium Bisulfite. 1. Χημική αντίδραση αντικατάστασης του υδρογόνου στον άνθρακα 4 του αρωματικού δακτυλίου της κυτοσίνης με $-\text{SO}_3\text{H}$ ομάδα (Sulphonation). 2. Χημική αντίδραση αφαίρεσης της αμινο-ομάδας του άνθρακα 3 του αρωματικού δακτυλίου της θειο-κυτοσίνης (Hydrolytic deamination). 3. Χημική αντίδραση αφαίρεσης της $-\text{SO}_3\text{H}$ ομάδας από την θειο-ουρακίλη και την παραγωγή ουρακίλης (alkali desulphonation).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής μιας γενωματικής αλληλουχίας DNA με Sodium Bisulfite και του διαβάσματος της σειράς των νουκλεοτιδίων μετά από αλληλούχηση. Οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες με το χειρισμό του Sodium Bisulfite. Αλληλούχηση της ακολουθίας μετά το χειρισμό αποκαλύπτει ότι οι θέσεις των καταλοίπων κυτοσίνης έχουν αντικατασταθεί από κατάλοιπα θυμίνης, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες δεν έχουν υποστεί καμία τροποποίηση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

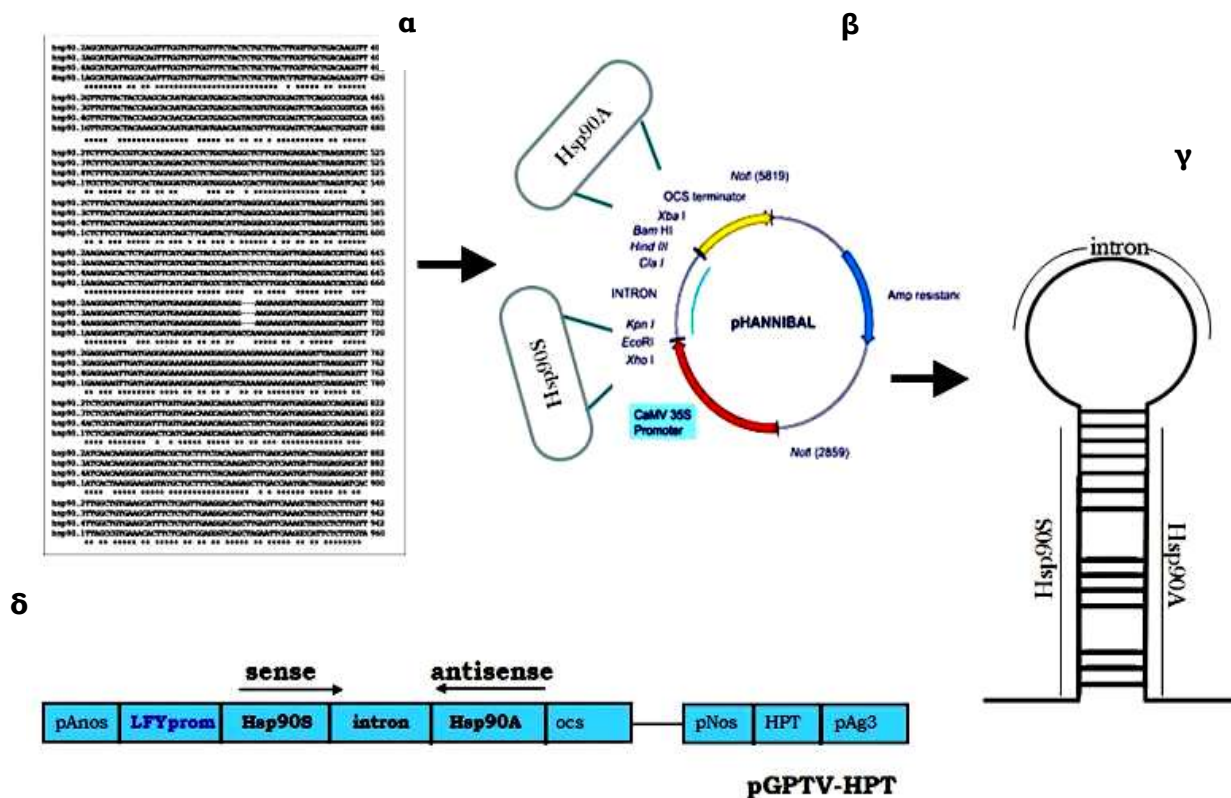
3.α. Δημιουργία της κατασκευής αποσιώπησης και φαινοτυπική παρατήρηση των μετασχηματισμένων φυτών

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι HSP90 πρωτεΐνες απαντώνται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στα κύτταρα των οργανισμών καθώς αποτελούν το 1-2% των συνολικών διαλυτών κυτταρικών πρωτεϊνών (Lai et al., 1984). Η οικογένεια των HSP90 μοριακών συνοδών είναι ευρέως διαδεδομένη από τους κατώτερους ευκαρυώτες μέχρι την κορυφή της ιεραρχίας, τον άνθρωπο. Έχει εκτιμηθεί ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούν περίπου το 1% του πρωτεώματος μη καταπονημένων κυττάρων, το οποίο τις κατατάσσει μέσα στις πιο άφθονες πρωτεΐνες των οργανισμών (Lai et al., 1984). Παρ' όλα αυτά όμως, οι HSP90 θεωρούνται ένα άκρως εξειδικευμένο σύστημα μοριακού συνοδού.

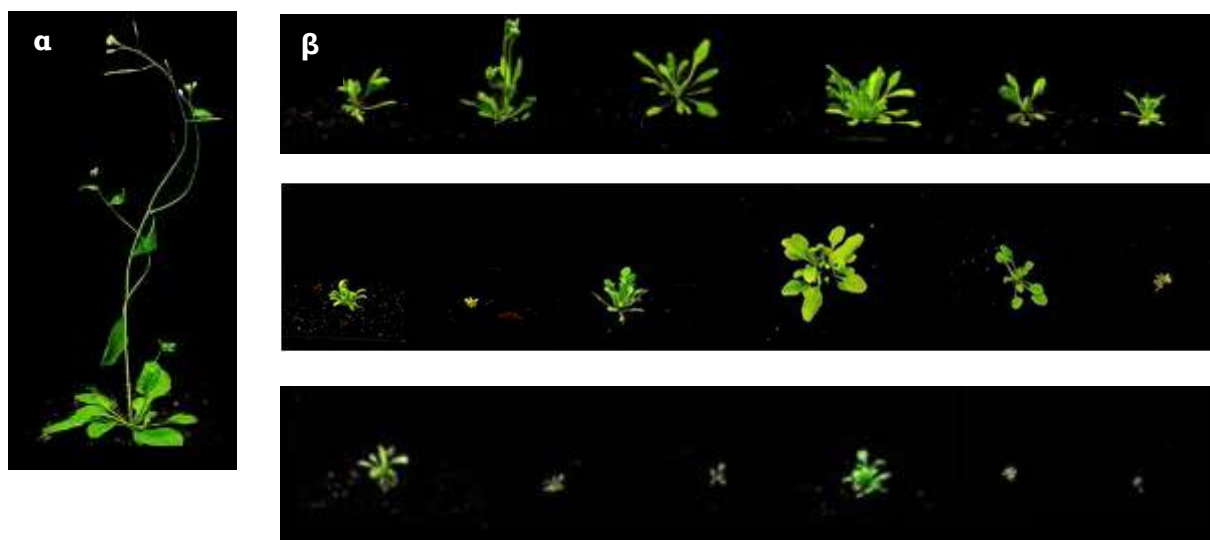
Αυτό που τις ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα συστήματα μοριακών συνοδών είναι το γεγονός ότι συσχετίζονται με πρωτεΐνες-κλειδιά που είναι ικανές να επάγουν μονοπάτια ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των οργανισμών. Το εύρος των πρωτεϊνών-στόχων των HSP90 πρωτεϊνών περιλαμβάνει υποδοχείς στεροειδών ορμονών, πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια μετάδοσης μηνυμάτων και αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (Calderwood et al., 2006). Μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την HSP90 στη ζύμη ανήκουν στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων, αποτέλεσμα που υποδηλώνει την επίδραση που ασκεί η HSP90 στη συλλογική γονιδιακή έκφραση του οργανισμού.

Λόγω της σημαντικότητας και της ιδιαιτερότητας του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού στους οργανισμούς, αποφασίστηκε η μελέτη της λειτουργίας του στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*. Για την επίτευξη αυτού του στόχου επιλέχθηκε η προσέγγιση της RNA γονιδιακής αποσιώπησης (RNA Interference, RNAi). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης προσέγγισης 'αποσιωπήθηκε' η έκφραση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών της HSP90 οικογένειας κατά το στάδιο μετάβασης από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης του φυτού. Μιας και η μετάβαση λαμβάνει χώρα στο κορυφαίο μερίσιωμα το φυτού, το οποίο από βλαστικό αλλάζει ταυτότητα και γίνεται αναπαραγωγικό, επιλέχθηκε ως εξειδικευμένος προαγωγέας έκφρασης κατά το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο ο προαγωγέας του γονιδίου LFY (Blazquez et al., 1997). Για την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αποσιώπησης, επιλέχθηκε η περιοχή που κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως βραχίονας νοήματος και αντινοήματος στην RNAi κατασκευή (Εικόνα 1). Στη συνέχεια, η κατασκευή αποσιώπησης κλωνοποιήθηκε στο δυαδικό πλασμιδιακό φορέα pGPTV-HPT ώστε να καταστεί δυνατός ο μετασχηματισμός φυτών με τη μέθοδο του *Agrobacterium tumefaciens*. Όταν πλέον φυτά *Arabidopsis thaliana* οικότυπου Col-0 έφτασαν σε ηλικία μετασχηματισμού, δεκαέξι φυτά μετασχηματίστηκαν με την RNAi κατασκευή.

Μετά την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των φυτών που υποβλήθηκαν σε μετασχηματισμό, συλλέχθηκαν τα σπόρια από όλα τα φυτά και αφού αφήθηκαν δύο εβδομάδες για να ξεραθούν, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS που περιείχε επίσης και το αντιβιοτικό υγρομυκίνη (Hygromycin, 30μg/ml), κατάλληλο για την επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών, και το αντιβιοτικό σεφοταξίμη (sefotaxime 50μg/ml), κατάλληλο για τη θανάτωση του υπολειπόμενου αγροβακτηρίου που παρέμεινε στα σπόρια από τον μετασχηματισμό. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών (22°C, 16h φως/8h σκοτάδι). Μετά από 21 ημέρες μέσα στα τρυβλία ανάπτυξης είχαν επιζήσει μόνο τα μετασχηματισμένα *LFY::HSPRNAi* φυτά, τα οποία ήταν 24 στο σύνολο. Στη συνέχεια τα φυτά τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS χωρίς επιλογή για να ανακάμψουν και σε ηλικία 26 ημερών μεταφύτευτηκαν σε γλαστράκια με χώμα.



Εικόνα 1: Δημιουργία της κατασκευής αποσιώπησης των τεσσάρων κυτταροπλασματικών HSP90 γονιδίων υπό την καθοδήγηση ιστοειδικού προαγωγέα και κλωνοποίησή της σε δυαδικό φορέα για το μετασχηματισμό φυτών *Arabidopsis thaliana* σύμφωνα με τη μέθοδο του *Agrobacterium tumefaciens*. α) επιλογή της περιοχής που κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων. Το μέγεθος της περιοχής είναι 574bp και βρίσκεται μεταξύ της θέσης 361 και 935 του cDNA του γονιδίου *Hsp90.3* (At5g56030). β) Ο ειδικός φορέας δημιουργίας της RNAi κατασκευής, pHANNIBAL, όπου κλωνοποιήθηκε με φορά νοήματος και αντινοήματος η ομόλογη περιοχή των τεσσάρων γονιδίων. γ) Το αναμενόμενο διπλής αλυσίδας RNA (dsRNA) που θα παραχθεί μέσα στο φυτό από την μεταγραφή της κασέτας έκφρασης. Στη συνέχεια μέσω του RNAi μηχανισμού του φυτού θα παραχθούν τα μικρά 21-25 νουκλεοτιδίων RNAs (small RNAs) τα οποία θα στοχεύσουν τα RNAs στόχους και θα τα αποικοδομήσουν. Στην προκειμένη περίπτωση τα RNAs στόχοι είναι τα μεταγραφήματα των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων. δ) Η κατασκευή αποσιώπησης στο τελικό δυαδικό φορέα pGPTV-HPT. Η κασέτα αποσιώπησης καθοδηγείται από τον ιστοειδικό προαγωγέα *LFY*. Το γονίδιο *LFY* εκφράζεται κυρίως στο κορυφαίο βλαστικό, αναπαραγωγικό και ανθικό μεριστώμα. Διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην μετάβαση από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης, ενώ είναι υπεύθυνο για την ταυτότητα του μεριστώματος και απαραίτητο προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα γονίδια σχηματισμού των ανθέων.





Εικόνα 2: Μακροσκοπικές φωτογραφίες των μετασχηματισμένων φυτών *LFY::HSP90RNAi* σε σχέση με τον άγριο τύπο. Όλα τα φυτά είναι 32 ημερών. α) φυτό αγρίου τύπου *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Col-0. β) Μετασχηματισμένα *LFY::HSP90RNAi* φυτά. Από αριστερά προς τα δεξιά ξεκινώντας από την πάνω σειρά: φυτό 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26.

Τα μετασχηματισμένα *LFY::HSP90RNAi* φυτά στην ηλικία των 32 ημερών είναι φανερά υποανάπτυκτα σε σχέση με τα φυτά του άγριου τύπου (Εικόνα 2). Ενώ ο αριθμός των φύλλων της ροζέτας τους είναι ικανοποιητικός και κυμαίνεται μεταξύ 6-14 πραγματικών φύλλων, το μέγεθος των φύλλων είναι αρκετά έως σημαντικά μικρότερο. Κύριο χαρακτηριστικό των *LFY::HSP90RNAi* φυτών είναι η απουσία ανθοφόρου βλαστού, ενώ όσα παρουσιάζουν ανθοφόρο βλαστό (όπως το φυτό 2) δεν εμφανίζουν κανένα άνθος. Ενώ τα φυτά αγρίου τύπου στην ηλικία των 32 ημερών έχουν ήδη μπει στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης και παράγουν τις πρώτες καρποταξίες, τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά μένουν καθηλωμένα στη βλαστική φάση ανάπτυξης. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί ξανά σε προηγούμενο μετασχηματισμό φυτών *Arabidopsis thaliana* με την ίδια κατασκευή αποσιώπησης. Και σε εκείνη την περίπτωση, τα μετασχηματισμένα *LFY::HSP90RNAi* έφτασαν στην ηλικία των 50 ημερών χωρίς να παράγουν άνθη αλλά το πείραμα καταστράφηκε λόγω τεχνικής βλάβης του θαλάμου επώασης. Υπήρχαν λοιπόν ενδείξεις ότι και αυτά τα διαγονιδιακά *Arabidopsis* φυτά δεν θα κατάφερναν να παράγουν άνθη ώστε να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο. Η εξέλιξη αυτή θα κρατούσε καθηλωμένο το φαινόμενο στην T1 γενιά χωρίς τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης του. Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η εφαρμογή μιας σειράς θερμικών καταπονήσεων σε ορισμένα *LFY::HSP90RNAi* φυτά.

Λόγω της καθοδήγησης της αποσιώπησης από ιστοειδικό προαγωγέα, είναι αναμενόμενο στα υπόλοιπα βλαστικά μέρη του φυτού (ρίζα, φύλλα ροζέτας) η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων να βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Αφού η συγκεκριμένη οικογένεια γονιδίων είναι θερμοεπαγόμενη, προκαλώντας θερμική καταπόνηση παρέχεται η δυνατότητα στα φυτά να αυξήσουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα βλαστικά μέρη όπου εξακολουθούν να λειτουργούν κανονικά. Η αύξηση αυτή μπορεί ενδεχομένως να αντισταθμίσει τις απώλειες που προκαλούνται από τη λειτουργία της RNAi κατασκευής στο κορυφαίο μερίστωμα. Έτσι, η υπερπαραγωγή μηνυμάτων λόγω του θερμικού στρες ίσως να συμπληρώσει το κενό που προκλήθηκε από την έλλειψη των μηνυμάτων των γονιδίων στο κορυφαίο μερίστωμα. Η αντιστάθμιση αυτή μπορεί πιθανώς να δημιουργήσει το κατάλληλο περιβάλλον και να επαναφέρει τη συνέχεια των βιολογικών διεργασιών για να καταστεί εφικτή η μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης. Βέβαια, πιο σημαντικό επίτευγμα θα αποτελούσε η δημιουργία ανθέων, καθώς υπήρχαν *LFY::HSP90RNAi* φυτά που ενώ είχαν μεταβεί στην αναπαραγωγική φάση ήταν ανίκανα να παράγουν άνθη. Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι δεν απαιτείται μόνο η μετάβαση στην άνθιση αλλά, ακόμα περισσότερο απαιτείται η ικανότητα σχηματισμού λειτουργικών ανθέων για να μπορέσουν να μεταβούν τα φυτά στην επόμενη γενιά ανάπτυξης. Για το σκοπό αυτό, ορισμένα φυτά υποβλήθηκαν σε εφαρμογές θερμικών καταπονήσεων ενώ μερικά άλλα παρέμειναν σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης ως μάρτυρες. Ο αναλυτικός πίνακας με όλες τις εφαρμογές σε όλα τα φυτά ακολουθεί παρακάτω:

Φυτό	Μέχρι 36 ημερών	Από 36 ημερών	41 ημερών	44 ημερών	49 ημερών	50 ημερών	56 ημερών	Από 56 ημερών	Από 65 ημερών
Φυτό 1	22°C	29°C	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 2	22°C	29°C	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 3	22°C	29°C							22°C
Φυτό 4	22°C	29°C	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 5	22°C	29°C		37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 6	22°C	29°C		37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 7	22°C	29°C							22°C
Φυτό 8	22°C	22°C							22°C
Φυτό 9	22°C	29°C			37°C για 1.5h	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 10	22°C	22°C					37°C για 1.5h	27°C	22°C
Φυτό 11	22°C	29°C				37°C για 1.5h			22°C
Φυτό 12	22°C	29°C							22°C
Φυτό 13	22°C	22°C							22°C
Φυτό 14	22°C	22°C						27°C	22°C
Φυτό 15	22°C	29°C		37°C για 1.5h					22°C
Φυτό 17	22°C	29°C							22°C
Φυτό 18	22°C	29°C							22°C
Φυτό 19	22°C	29°C	Νεκρό						22°C
Φυτό 21	22°C	29°C	37°C για 1.5h	37°C για 1.5h			37°C για 1.5h		22°C
Φυτό 22	22°C	29°C							22°C
Φυτό 23	22°C	22°C							22°C
Φυτό 24	22°C	29°C			37°C για 1.5h	37°C για 1.5h			22°C
Φυτό 25	22°C	29°C	Νεκρό						22°C
Φυτό 26	22°C	29°C							22°C

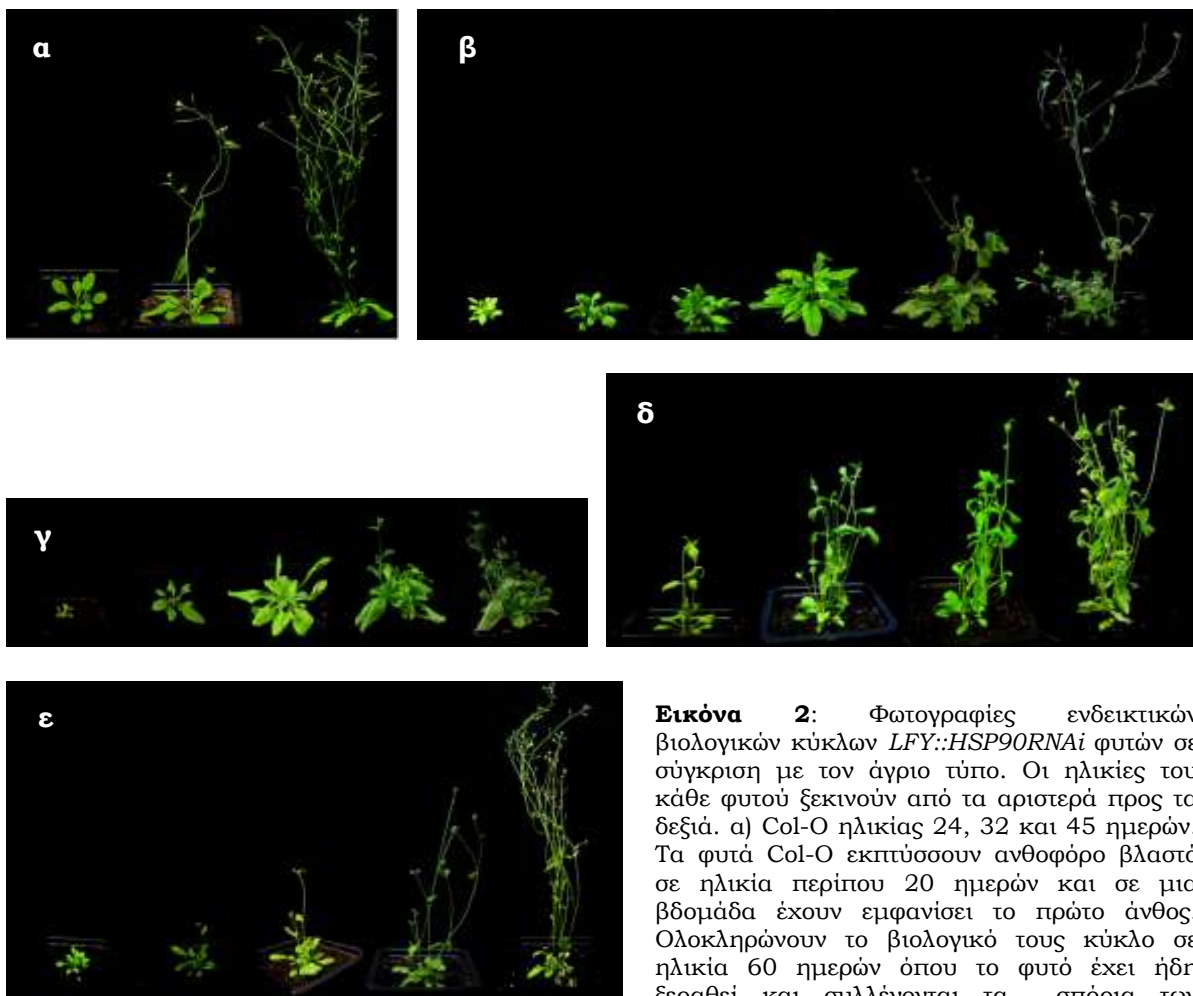
Η επιλογή των φυτών για τα προγράμματα των θερμικών καταπονήσεων πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη ορισμένα χαρακτηριστικά των φυτών. Έτσι επιλέχθηκαν κυρίως φυτά που παρουσίαζαν ένα σχετικά εύρωστο φαινότυπο και έδειχναν ότι έχουν περισσότερες πιθανότητες να παράγουν κάποιο θετικό αποτέλεσμα, σε σχέση με πιο καχεκτικά φυτά. Τα φυτά 8, 13, 14, 23 παρέμειναν μονίμως στους 22°C. Αν και παρήγαγαν κεντρικό ανθοφόρο βλαστό στην προχωρημένη ηλικία των 60 ημερών, δεν κατάφεραν να παράγουν κανένα άνθος, ούτε κάποια υποτυπώδη ανθική δομή. Τα φυτά αυτά τελικά πέθαναν στην προχωρημένη ηλικία των 100 ημερών περίπου. Μια άλλη κατηγορία φυτών, αναπτύσσονταν στους 29°C και υποβλήθηκαν σε ποικίλα θερμικά σοκ. Στην πλειονότητά τους, τα φυτά αυτά δεν κατόρθωσαν να παράγουν άνθη. Παρόλο που η υψηλή θερμοκρασία ενίσχυσε την ανάπτυξή τους και τα έδωσε τη δυνατότητα να γίνουν πιο εύρωστα και να παράγουν αρκετούς ανθοφόρους βλαστούς, εντούτοις δεν εμφάνισαν κανένα άνθος. Οι κυρίαρχες δομές που εμφανίζονταν στις προγραμματισμένες ανθικές καταβολές αποτελούνταν μόνο από φυλλοειδείς σχηματισμούς ή καλλοειδείς μορφές αδιαφοροποίητων κυττάρων. Η πλειονότητα των φυτών αυτών δεν ολοκλήρωσε τον βιολογικό της κύκλο. Τα περισσότερα από αυτά αναπτύχθηκαν μέχρι την ηλικία των 116 ημερών και στη συνέχεια ξεράθηκαν και πέθαναν. Ενδεικτικά παραθέτονται μακροσκοπικές φωτογραφίες των βιολογικών κύκλων ανάπτυξης ορισμένων αντιπροσωπευτικών φυτών (Εικόνα 2, οι βιολογικοί κύκλοι όλων των φυτών παραθέτονται στο παράρτημα 1).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασε η μελέτη των μετασχηματισμένων *LFY::HSP90RNAi* φυτών με τη χρήση στερεοσκοπίου. Σε όλα τα μετασχηματισμένα φυτά που μελετήθηκαν, στις καταβολές των ανθοφόρων οφθαλμών στις μασχάλες των φύλλων, έκαναν την εμφάνισή τους φυλλοειδείς μορφές, καλλοειδείς μορφές ή καινούριοι βλαστοί (Εικόνα 3). Οι φυλλοειδείς μορφές περιελάμβαναν σχηματισμούς από πολλά μικρά φύλλα σε ομάδες. Οι καλλοειδείς μορφές αποτελούνταν από αδιαφοροποίητες δομές κυττάρων χωρίς να φαίνεται ότι παρουσιάζουν κάποιο συγκεκριμένο δομικό πρότυπο. Τέλος, από την ανθική καταβολή σε πολλές

περιπτώσεις φύονταν επιπλέον ανθοφόροι βλάστοι, οι οποίοι και αυτοί κατέληγαν στις αντίστοιχες φυλλοειδείς ή αδιαφοροποιητές δομές.

Από τις εφαρμογές των προγραμμάτων θερμικού σοκ, μόνο δύο φυτά, το φυτό 10 και το φυτό 21, κατάφεραν να περάσουν και στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης και να παράγουν άνθη (Εικόνα 2δ και 2ε). Τα φυτά αυτά, το 10 σε ηλικία 70 ημερών και το 21 σε ηλικία 42 ημερών, ύστερα από τις εφαρμογές των θερμικών καταπονήσεων κατάφεραν σε ορισμένους ανθοφόρους βλαστούς να παράγουν λειτουργικά άνθη, τα οποία όμως ήταν λίγα στον αριθμό. Μη γνωρίζοντας το πόσο δριμύς μπορεί να είναι ο φαινότυπος των απογόνων και αν είναι ικανοί να επιβιώσουν, από τα άνθη που παρήχθησαν σε κάθε φυτό, ορισμένα αφέθηκαν προς αυτογονιμοποίηση και τα υπόλοιπα επικονιάστηκαν τεχνητά με γύρη αγρίου τύπου Col-O.

Με την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των φυτών 10 και 21, τα σπέρματα κάθε φυτού που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση ή ετερογονιμοποίηση συλλέχθηκαν ξεχωριστά και στη συνέχεια ακολούθησε επιστροφή τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής για ανάπτυξη των απογόνων και περαιτέρω παρατήρηση του φαινομένου.



Εικόνα 2: Φωτογραφίες ενδεικτικών βιολογικών κύκλων *LFY::HSP90RNAi* φυτών σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Οι ηλικίες του κάθε φυτού ξεκινούν από τα αριστερά προς τα δεξιά. α) Col-O ηλικίας 24, 32 και 45 ημερών. Τα φυτά Col-O εκπτύσσουν ανθοφόρο βλαστό σε ηλικία περίπου 20 ημερών και σε μια βδομάδα έχουν εμφανίσει το πρώτο άνθος. Ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε ηλικία 60 ημερών όπου το φυτό έχει ήδη ξεραθεί και συλλέγονται τα σπόρια των καρποταξιών. β) Φυτό 10 ηλικίας 37, 45, 49,

57, 70 και 84 ημερών. Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον γιατί παρέμεινε καθηλωμένο στη βλαστική φάση ανάπτυξης μέχρι την ηλικία των 50 ημερών, έκπτυξε α νθοφόρο βλαστό μετά από 2 θερμικά σοκ. γ) Φυτό 13 ηλικίας 37, 45, 54, 62 και 75 ημερών. Παρέμεινε σε όλη την ανάπτυξή του στους 22°C χωρίς εφαρμογή θερμικού σοκ, έκπτυξε κεντρικό βλαστό στην ηλικία των 60 ημερών και ολοκλήρωσε το βιολογικό του κύκλο σε ηλικία 110 ημερών. δ) Φυτό 2 ηλικίας 37, 45, 50 και 57 ημερών. Παρόλο που τοποθετήθηκε στους 29°C για αρκετές μέρες, εφαρμόστηκαν 4 θερμικά σοκ και έκπτυξε κεντρικό βλαστό από μικρή ηλικία, δεν έδωσε κανένα άνθος. ε) Φυτό 21 ηλικίας 35, 37, 41, 45 και 54,

ημερών αντίστοιχα . Το φυτό αυτό παρέμεινε καθηλωμένο στη βλαστική φάση ανάπτυξης μέχρι την ηλικία των 35 ημερών. Μετά από θερμικό σοκ στους 29°C έκπτυξε κεντρικό βλαστό και μετά από το πρώτο θερμικό σοκ στους 37°C παράγαγε άνθη που γονιμοποιήθηκαν και μετατράπηκαν σε καρποταξίες.



Εικόνα 3: Φωτογραφίες των δομών που παράγονται στις καταβολές των ανθέων στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου. α) Φυτό 1: στην πλειοψηφία των ανθικών μεριστωμάτων εμφανίζονται καλλοειδείς μορφές αδιαφοροποιητων κυττάρων. β) Φυτό 2: ομοίως και σε αυτό το φυτό έχουμε την εμφάνιση δραματικά ανώμαλων κυτταρικών δομών στους

ανθοφόρους οφθαλμούς αλλά επίσης παρατηρούνται και πολλές περιπτώσεις φυλλοειδών κατασκευών. Δηλαδή, στον οφθαλμό που ήταν προγραμματισμένος να παράγει άνθος, το φυτό παράγει φύλλα, συνήθως πάνω από τρία. γ) Φυτό 3: Τόσο καλλοειδείς όσο και φυλλοειδείς μορφές παρατηρήθηκαν. δ) Φυτό 4: εκτός της εμφάνισης των συνηθισμένων δομών που παρατηρούνται στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά παρατηρούνται επίσης και πολλοί βλαστοί που εκφύονται από ένα θεωρητικά ανθικό μεριστωμα, όπως φαίνεται στην δεξιά φωτογραφία. ε) Φυτό 10: Εκτός από την εμφάνιση των καλλοειδών μορφών και των φυλλοειδών κατασκευών, μετά το θερμικό σοκ σε ορισμένους βλαστούς παρατηρούνται ταξιανθίες με τέλεια άνθη όπως εμφανίζεται στην αριστερή και δεξιά φωτογραφία. στ) Φυτό 11: Εξαιρετικά ανώμαλες δομές και πολλοί βλαστοί να εκφύονται από τις ανθικές καταβολές. ζ) Φυτό 21: Εδώ κυριαρχεί η εμφάνιση ταξιανθιών με τέλεια άνθη μετά τις εφαρμογές των θερμικών σοκ. Ο φαινότυπος του φυτού μοιάζει πολύ με αυτό του αγρίου τύπου. η) Ταξιανθία αγρίου τύπου Col-O με τέλεια άνθη.

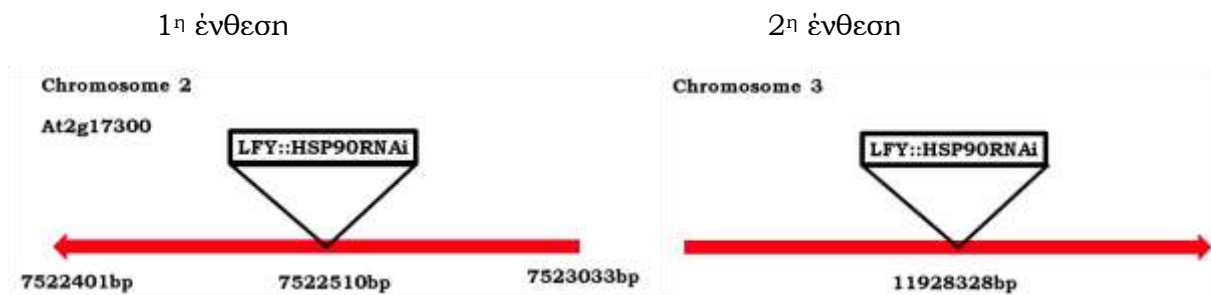
3.α.1. Μοριακός χαρακτηρισμός των *LFY::HSP90RNAi* φυτών

Ο μετασχηματισμός φυτών Col-O με την κασέτα έκφρασης της αποσιώπησης των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων στο στάδιο της ανθικής μετάβασης, παράγαγε 24 γεγονότα μετασχηματισμού. Στο σύνολό τους, τα φυτά παρουσίασαν τα εξής παρόμοια χαρακτηριστικά : καθυστερημένη ανάπτυξη και ανικανότητα μετάβασης στην αναπαραγωγική φάση η οποία μπορεί να περιλαμβάνει την ανικανότητα έκπτυξης ανθοφόρου βλαστού ή σε δεύτερο στάδιο την ανικανότητα παραγωγής ανθέων. Τα προγράμματα θερμικού σοκ βελτίωσαν την ανάπτυξη των

φυτών: έγιναν πιο εύρωστα και στην πλειονότητά τους έκπτυξαν ανθοφόρο βλαστό. Όλα τα φυτά, εκτός από τις δύο εξαιρέσεις των φυτών 10 και 21, ενώ εμφάνισαν καλλοειδείς ή φυλλοειδείς σχηματισμούς στις ανθικές καταβολές, δεν παρήγαγαν κανένα λειτουργικό ή έστω υποτυπώδες άνθος. Η φαινοτυπική παρατήρηση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών έδειξε μια ομοιογένεια των χαρακτηριστικών μεταξύ των διαφόρων γεγονότων μετασχηματισμού ως προς το φαινόμενο της αποσιώπησης.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε ο μοριακός χαρακτηρισμός των ανεξάρτητων γεγονότων μετασχηματισμού ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το φαινοτυπικό αποτέλεσμα είναι άμεσα συσχετισμένο με τη λειτουργία της RNAi αποσιώπησης και ανεξάρτητο από τη θέση ένθεσης της κασέτας έκφρασης στο γονιδίωμα των φυτών. Τα φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε μοριακή χαρτογράφηση είναι αρχικά τα φυτά 10 και 21. Από τη στιγμή που τα δύο αυτά ανεξάρτητα γεγονότα ανταποκρίθηκαν στις θερμικές εφαρμογές και μας παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης του φαινομένου, είναι αναγκαία η μοριακή χαρτογράφηση τους. Επίσης, επιλέχθηκαν και τα φυτά 6, 14 και 17, που αποτελούν αντιπροσωπευτικά φυτά ενδιάμεσου φαινοτύπου και παρουσιάζουν όλες τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται στα σύνολο των *LFY::HSP90RNAi* φυτών. Η χαρτογράφηση των ενθέσεων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της Tail-PCR. Τα αποτελέσματα της Tail-PCR παρουσιάζονται παρακάτω:

α) Φυτό 10:



Στο φυτό 10, η κασέτα έκφρασης *LFY::HSP90RNAi* έχει ενσωματωθεί δυο φορές στο γονιδίωμα. Η πρώτη ένθεση βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 στη θέση 7522510 που αντιστοιχεί στη θέση 523 της κωδικής περιοχής του γονιδίου At2g17300. Το At2g17300 είναι ένα χλωροπλαστικό γονίδιο άγνωστης λειτουργίας, χωρίς να είναι γνωστές οι βιολογικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται. Η δεύτερη ένθεση βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 στη θέση 119283228 που αντιστοιχεί σε διαγονιδιακή περιοχή.

β) Φυτό 21:



Στο φυτό 21, η κασέτα έκφρασης ενσωματώθηκε μια φορά στο γονιδίωμα, στο χρωμόσωμα 2 στη θέση 9348432 που αντιστοιχεί στη θέση 696 της κωδικής περιοχής του γονιδίου At2g21930. Το At2g21930 είναι ένα γονίδιο αγνώστου λειτουργίας, εντοπίζεται στα πλασμοδέσματα των κυττάρων και είναι πατρικής προέλευσης.

γ) Φυτό 6:



Στο φυτό 6, η κασέτα έκφρασης ενσωματώθηκε μια φορά στο γονιδίωμα, στο χρωμόσωμα 3 στη θέση 4768389 που αντιστοιχεί στη θέση 1509 της κωδικής περιοχής του γονιδίου At3g14300. Το At3g14300 είναι ένα γονίδιο με λειτουργία πεκτινεστεράσης. Εμπλέκεται στην τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος και τοποθετείται στο κυτταρικό τοίχωμα και στα πλασμοδέσματα.

δ) Φυτό 14:



Στο φυτό 14, η κασέτα έκφρασης ενσωματώθηκε μια φορά στο γονιδίωμα, στο χρωμόσωμα 3 στη θέση 10982706 που αντιστοιχεί στη θέση 610 του τρίτου ιντρονίου του γονιδίου At3g28958. Το γονίδιο At3g28958 ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των cupredoxins και εμπλέκεται στην μεταφορά ηλεκτρονίων και στην πρόσδεση ιόντων χαλκού.

ε) Φυτό 17:



Στο φυτό 17, η κασέτα έκφρασης ενσωματώθηκε μια φορά στο γονιδίωμα, στο χρωμόσωμα 2 στη θέση 9348701 που αντιστοιχεί στη θέση 1060 της κωδικής περιοχής του γονιδίου At2g21930. Το At2g21930 είναι ένα γονίδιο αγνώστου λειτουργίας, εντοπίζεται στα πλασμοδέσματα των κυττάρων και είναι πατρικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Tail-PCR (Thermal asymmetric interlaced-PCR) στα ανεξάρτητα γεγονότα μετασχηματισμού, παρατηρούμε ότι οι περιοχές ένθεσης είναι διαφορετικές μεταξύ τους. Έχουμε εισαγωγή της κασέτας έκφρασης σε κωδική περιοχή γονιδίου, σε ιντρόνιο γονιδίου αλλά και σε γενωματική περιοχή μεταξύ γονιδίων. Όλα τα φυτά που ελέγχθηκαν παρουσίαζαν τα ίδια φαινοτυπικά

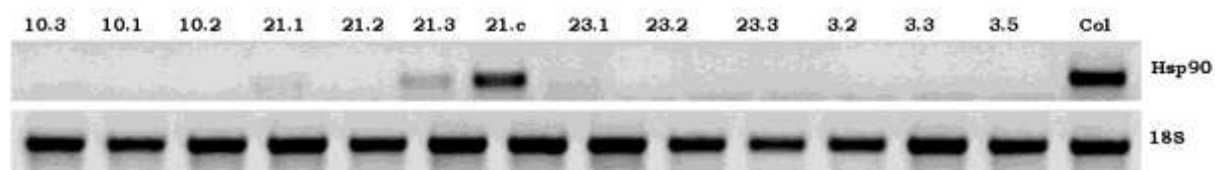
χαρακτηριστικά με τη μόνη διαφορά ότι τα φυτά 10 και 21 άνθισαν μετά από τις εφαρμογές των θερμικών σοκ. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το φαινοτυπικό αποτέλεσμα που παρουσιάζουν τα γεγονότα μετασχηματισμού με την *LFY::HSP90RNAi* κασέτα έκφρασης είναι ανεξάρτητα από τη θέση ενσωμάτωσης των ενθέσεων στο γονιδίωμα των φυτών.

3.α.2. Μοριακή ανάλυση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών

Η φαινοτυπική παρατήρηση σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μοριακής καρτογράφησης των ενθέσεων των *LFY::HSP90RNAi* φυτών υποδηλώνουν ότι τα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στα μετασχηματισμένα φυτά οφείλονται στην αποσιώπηση των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων.

Μέσω του RNAi μηχανισμού επιτυγχάνεται είτε μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Transcriptional Gene Silencing, TGS) είτε μετά-μεταγραφική αποικοδόμηση των μηνυμάτων (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS) των γονιδίων που στοχεύονται. Με βάση τη λειτουργία αυτή, τα επίπεδα των μεταγραφημάτων των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων θα πρέπει να είναι διαφορετικά στα μετασχηματισμένα *LFY::HSP90RNAi* φυτά, και συγκεκριμένα μειωμένα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Βέβαια, σημαντική παράμετρο αποτελεί η επιλογή του ιστού για την πραγματοποίηση της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων. Όπως αναφέρθηκε, η κασέτα έκφρασης καθοδηγείται από τον ιστοειδικό προαγωγέα *LFY*. Οπότε, είναι αναμενόμενο η έκφρασή της να λαμβάνει χώρα μόνο στα μεριστώματα των φυτών, και ειδικά στα ανθικά μεριστώματα, χωρίς να επηρεάζονται τα υπόλοιπα μέρη του φυτού. Για το λόγο αυτό η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων έλαβε χώρα σε μεριστωματικό ιστό ανθικών καταβολών. Άλλη μια παράμετρος που λήφθηκε υπόψη ήταν η διαφορετικότητα των ανθικών μεριστωμάτων. Όπως παρατηρήθηκε, κατά τη φαινοτυπική μελέτη, στις ανθικές καταβολές των φυτών υπάρχει ποικιλομορφία όσον αφορά τις κατασκευές που παράγονται. Μπορεί να σχηματίζονται καλλοειδείς δομές αδιαφοροποίητων κυττάρων, φυλλοειδείς κατασκευές ή ακόμα και άνθη, όπως παρατηρήθηκε σε κάποιες περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη του κάθε μεριστώματος ξεχωριστά τόσο από φυτά τα οποία άνθισαν όσο και από τα υπόλοιπα.

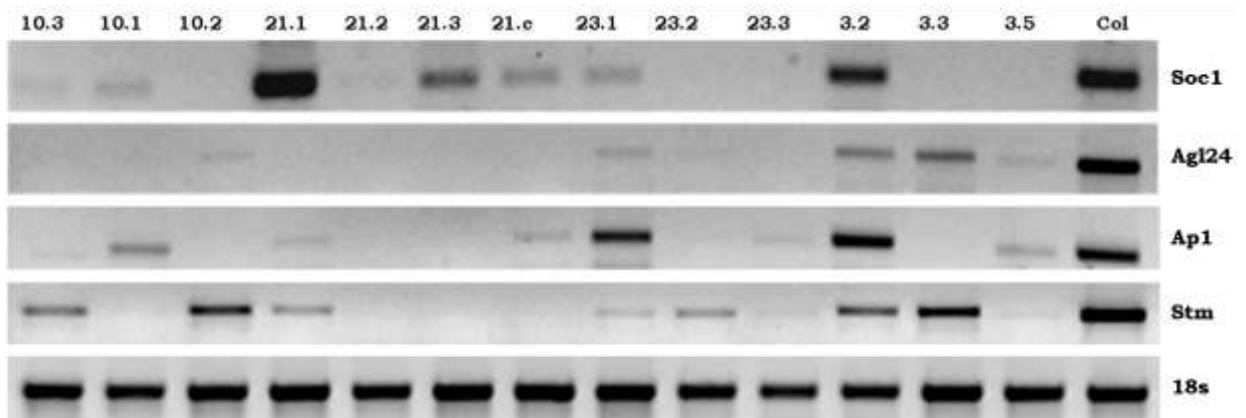
Για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων σε μεριστωματικό ιστό έγινε συλλογή μονών ανθικών μεριστωμάτων από κάθε T1 φυτό ξεχωριστά με τη χρήση στερεοσκοπίου, απευθείας τοποθέτησή τους σε υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80°C . Όταν ολοκληρώθηκε η συλλογή των δειγμάτων ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, παραγωγή cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (RT, Reverse Transcriptase) και στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μέσω PCR αντίδρασης. Πρέπει να επισημανθεί ότι από τη στιγμή που η αποσιώπηση επιδρά και στα τέσσερα κυτταροπλασματικά γονίδια, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές που να ενισχύουν και τα τέσσερα γονίδια συγχρόνως. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων RNA έγινε με χρήση του καθολικού γονιδίου 18S rRNA που κωδικοποιεί για την 18S υπομονάδα του ριβοσώματος. Τα αποτελέσματα της PCR αντίδρασης παρουσιάζονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% των PCR προϊόντων της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των *Hsp90* κυτταροπλασματικών γονιδίων σε μονά μεριστώματα *LFY::HSP90RNAi* φυτών και στον άγριο τύπο. Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 250ng ολικού RNA για ανάστροφη μεταγραφή. Μονά ανθικά μεριστώματα του φυτού 10 (στήλες 10.3, 10.1 και 10.2), του φυτού 21 (στήλες 21.1, 21.2, 21.3 και 21.c), του φυτού 23(στήλες 23.1, 23.2 και 23.3), του φυτού 3 (στήλες 3.2, 3.3 και 3.5) και μονά ανθικά μεριστώματα. Col: ανθικό μεριστώμα αγρίου τύπου. Τα δείγματα των *LFY::HSP90RNAi* φυτών συλλέχθηκαν όταν τα φυτά ήταν 60 ημερών.

Τα αποτελέσματα των RT-PCR αντιδράσεων υποδεικνύουν ότι σχεδόν σε όλα τα δείγματα είναι δραματικά μειωμένη η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων. Εξαιρεση αποτελούν ορισμένα από τα μονά μεριστώματα του φυτού 21 όπως φαίνεται στα δείγματα 21.1, 21.2, 21.3 και 21.c. Μιας και το συγκεκριμένο φυτό εμφανίζει μεγαλύτερο αριθμό ανθέων σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά, πιθανώς η ανίχνευση έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων να συσχετίζεται με τη δημιουργία λειτουργικών ανθέων. Το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης σε συνδυασμό με τη φαινοτυπική παρατήρηση αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η δραματική μείωση των επιπέδων έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων συνδέεται άμεσα με την ανικανότητα των ανθικών μεριστωμάτων να παράγουν άνθη.

Από τη στιγμή που φαίνεται ότι ελλείπει των *Hsp90* γονιδίων δημιουργείται μια ασυνέχεια στη ροή των φυσιολογικών διαδικασιών που οδηγούν στην άνθιση, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των προτύπων έκφρασης γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν ορισμένα γονίδια-κλειδιά που αποτελούν κομβικά σημεία αφού λαμβάνουν μηνύματα και από τα τέσσερα βασικά μονοπάτια της άνθισης προκειμένου τα φυτά να μπουν στην αναπαραγωγική διαδικασία. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν το *Soc1* (At2g45660), *Ag124* (At4g24540), *Ap1* (At1g69120) και *Stm* (At1g62360). Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 5.

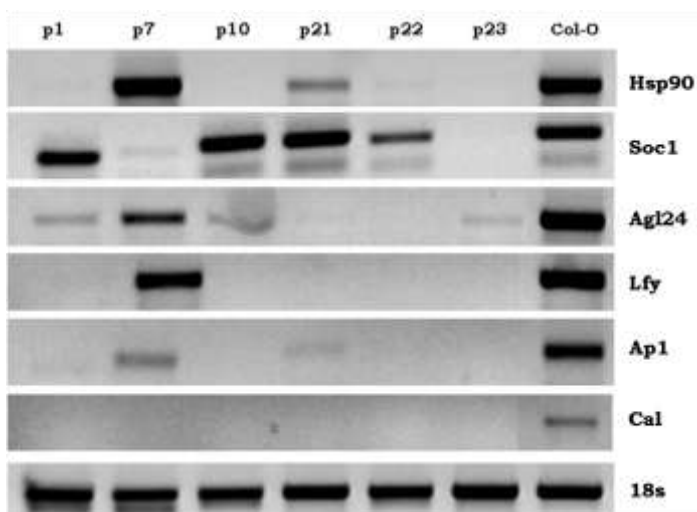


Εικόνα 5: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% των PCR προϊόντων της μελέτης των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-κλειδιών της άνθισης σε μονά μεριστώματα *LFY::HSP90RNAi* φυτών και στον άγριο τύπο. Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 250ng ολικού RNA για ανάστροφη μεταγραφή. 10.1, 10.2 και 10.3: Μονά ανθικά μεριστώματα του φυτού 10. 21.1, 21.2, 21.3 και 21.c : Μονά ανθικά μεριστώματα του φυτού 21. 23.1, 23.2 και 23.3 : Μονά ανθικά μεριστώματα του φυτού 23. 3.2, 3.3 και 3.5 : Μονά ανθικά μεριστώματα του φυτού 3. Col: ανθικό μεριστώμα αγρίου τύπου. Τα δείγματα των *LFY::HSP90RNAi* φυτών συλλέχθηκαν όταν τα φυτά ήταν 60 ημερών.

Τα αποτελέσματα των PCR δείχνουν ότι τα επίπεδα των μεταγραφημάτων των γονιδίων της άνθισης είναι αλλοιωμένα: κυμαίνονται από ελαφρώς μειωμένα σε σχέση με τον άγριο τύπο σε ορισμένα δείγματα, ενώ στην πλειονότητά τους είναι πολύ μειωμένα έως μη ανιχνεύσιμα. Επίσης παρατηρείται ότι δεν υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο που να συνδέει τις εκφράσεις των γονιδίων μεταξύ τους ή μεταξύ των

δειγμάτων. Από τα γονίδια που αναλύθηκαν, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Soc1* και *Stm* ανιχνεύονται σε μεγαλύτερο βαθμό και σε περισσότερα δείγματα σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια. Επίσης, στην ανάλυση του *Soc1* γονιδίου παρατηρείται ότι στα δείγματα του φυτού 21 μπορεί να εμφανίζεται μειωμένα τα επίπεδα έκφρασής του αλλά είναι υψηλότερα ανιχνεύσιμα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που μελετήθηκαν. Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα 3.2. Ίσως να υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *Soc1* γονιδίου και των *Hsp90* από τη στιγμή που στα ίδια δείγματα ανιχνεύεται έκφραση των *Hsp90* γονιδίων στην προηγούμενη ανάλυση.

Η ποσότητα ολικού RNA που απομονώθηκε από κάθε μονό ανθικό μεριστώμα και χρησιμοποιήθηκε για ανάστροφη μεταγραφή ήταν αρκετά μικρή και έφτανε μόλις τα 250ng. Η μικρή ποσότητα του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε στα παραπάνω πειράματα να διαδραματίζει περιοριστικό ρόλο σε αποτελέσματα αντιδράσεων για γονίδια που σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζονται χαμηλά και είναι δύσκολη η ανίχνευση των μηνυμάτων τους. Για το λόγο αυτό, έγινε ένωση 5 μονών ανθικών μεριστωμάτων από κάθε φυτό T1 γενιάς ξεχωριστά ώστε να πραγματοποιηθεί απομόνωση ολικού RNA και ανάστροφη μεταγραφή σε 500ng ολικού RNA. Τα γονίδια που μελετήθηκαν στα καινούρια cDNA δείγματα ήταν τα *Hsp90*, *Soc1*, *Agl24*, *Lfy* (At5g61850), *Cal* (At1g26310) και *Ap1*. Και σε αυτή την περίπτωση τα γονίδια που μελετήθηκαν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στη μετάβαση του φυτού από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση αλλά επίσης ορίζουν και την ταυτότητα του μεριστώματος. Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων παρουσιάζεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Ανάλυση σε πηκτική αгарόζης 1% των PCR προϊόντων της μελέτης των επιπέδων έκφρασης *Hsp90* γονιδίων και των γονιδίων-κλειδιών της άνθησης σε ολικό RNA απομονωμένο από 5 ανθικά μεριστώματα *LFY::HSP90RNAi* φυτών και αγριού τύπου. Όπως στα μονά μεριστώματα έτσι και σε αυτά τα δείγματα παρατηρείται δραματική μείωση μέχρι μη ανίχνευση της έκφρασης των *Hsp90* αλλά και των υπολοίπων γονιδίων.

Τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων που αναλύθηκαν δείχνουν ότι τόσο τα *Hsp90* γονίδια όσο και τα γονίδια της άνθησης παρουσιάζουν δραματικά μειωμένη έκφραση που φτάνει στα επίπεδα της μη ανιχνευσιμότητας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το φυτό 7. Στο συγκεκριμένο δείγμα η έκφραση των *Hsp90* φαίνεται να είναι υψηλότερη από τον άγριο τύπο και διαφοροποιείται το πρότυπο έκφρασης των υπολοίπων γονιδίων στο δείγμα αυτό σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Σε αυτό το δείγμα, ο φαινότυπος του συγκεκριμένου φυτού δεν ακολουθεί τα επίπεδα των προτύπων έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων (Εικόνα 6).

Η έκφραση του γονιδίου *Soc1* ανιχνεύεται σε φυσιολογικά επίπεδα στα τρία από τα έξι δείγματα που αναλύθηκαν. Τα δείγματα αυτά είναι τα p1, p10 και p21 που προέρχονται από τα αντίστοιχα T1 φυτά 1, 10 και 21. Επίσης, σε ένα ακόμη δείγμα, το p22, που προέρχεται από το φυτό 22, είναι μειωμένη αλλά ικανοποιητικά ανιχνεύσιμη. Στα υπόλοιπα φυτά τα επίπεδα έκφρασης ήταν εμφανώς μειωμένα σε σχέση με τον άγριο τύπο (Εικόνα 6). Τα δεδομένα λοιπόν υποδεικνύουν ότι το

συγκεκριμένο γονίδιο λειτουργεί καλύτερα σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια της άνθισης που μελετήθηκαν.

Από τη στιγμή που παρατηρείται τέτοια καθολική αλλοίωση των προτύπων έκφρασης γονιδίων-κλειδιών της άνθισης, γίνεται εμφανές ότι τα *Hsp90* γονίδια πρέπει να διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της άνθισης. Η έλλειψη των *Hsp90* γονιδίων φαίνεται να έχει προκαλέσει τρομερή αποδιοργάνωση στη λειτουργία των μονοπατιών της άνθισης, το οποίο γίνεται φανερό τόσο από τη φαινοτυπική παρατήρηση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών όσο και από τη μοριακή ανάλυση των αντίστοιχων φυτών.

3.β. Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών T2 γενιάς

Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο μέρος, από τα 24 μετασχηματισμένα φυτά, μόνο δύο, τα φυτά 10 και 21, πέρασαν στην επόμενη γενιά παράγοντας ένα μικρό αλλά ικανοποιητικό αριθμό σπερμάτων. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, και στα δύο φυτά ορισμένα άνθη αυτογονιμοποιήθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα επικονιάστηκαν τεχνητά με γύρη αγρίου τύπου. Το σύνολο των σπερμάτων που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS για τα σπέρματα της αυτογονιμοποίησης και σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS παρουσία του αντιβιοτικού υδρομυκίνη (*hyg*, 30μg/ml) για τα σπέρματα της ετερογονιμοποίησης, προκειμένου να θανατωθούν οι αγρίου τύπου απόγονοι. Το σύνολο των σπορίων που συλλέχθηκε, τοποθετήθηκε σε τρυβλία θρεπτικού μέσου και τελικά αναπτύχθηκαν, δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

	Αριθμός σπορίων που συλλέχθηκε	Αριθμός σπορίων που επιστρώθηκε σε MS	Αριθμός σπορίων που επιστρώθηκε σε MS <i>hyg</i>	Αριθμός φυτών που αναπτύχθηκαν σε MS	Αριθμός φυτών που αναπτύχθηκαν σε MS <i>hyg</i>
Φυτό 10	87	40	47	40	33
Φυτό 21	35	19	16	2	5

Από τα 35 σπόρια του φυτού 21 που συλλέχθηκαν, μόνο 7 εκπύχθηκαν και αναπτύχθηκαν, ενώ το ένα από αυτά πέθανε σε ηλικία 26 ημερών (21e) (Εικόνα 7). Από τα υπόλοιπα 6 φυτά, τα πέντε παρήγαγαν άνθη τα οποία στη συνέχεια έδωσαν καρποταξίες και ακολούθησε συλλογή των σπερμάτων. Τα πέντε φυτά που ολοκλήρωσαν επιτυχώς το βιολογικό τους κύκλο, παρουσίασαν επίσης και κανονική ανάπτυξη. Τόσο φαινοτυπικά όσο και σε διάρκεια ζωής προσομοίαζαν αρκετά τον αγριο τύπο. Δηλαδή, μπορεί από τους απόγονους του φυτού 21 να αναπτύχθηκαν μόνο πέντε τελικά, αλλά η ανάπτυξη τους ήταν βελτιωμένη σε σχέση με το αρχικό φυτό.



21a 21b 21c 21d 21e 21f 21g Col-O

Εικόνα 7: Φωτογραφίες απογόνων T2 γενιάς του φυτού 21 σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. 21a και 21b: Απόγονοι που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο MS και προέκυψαν από αυτογονιμοποίηση. 21c, 21d, 21e, 21f και 21g: Απόγονοι που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο MShyg και προέκυψαν από ετερογονιμοποίηση. Col-O: φυτό αγρίου τύπου. Όλα τα φυτά είναι ηλικίας 32 ημερών εκτός από το 21e που είναι 25 ημερών.

Τα υπόλοιπα σπέρματα που δεν εκπύχθηκαν, ανοίχτηκαν προκειμένου να παρατηρηθεί η μορφολογία των εμβρύων. Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και οπτικού μικροσκοπίου πραγματοποιήθηκε διάρρηξη των σπορίων και φωτογράφιση των εμβρύων. Ενδεικτικά αποτελέσματα της παρατήρησης εμφανίζονται στην εικόνα 8.

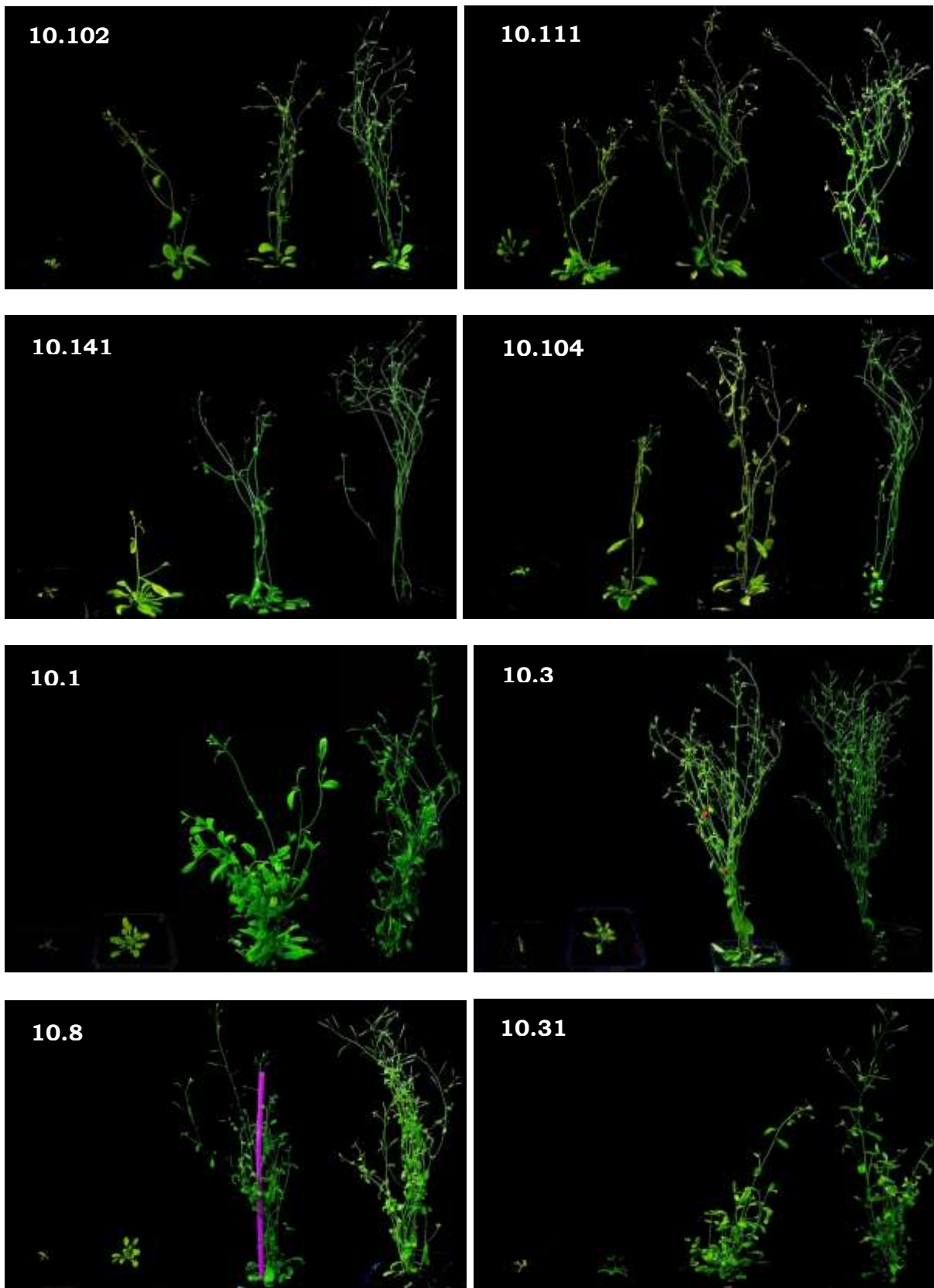


Εικόνα 8: Ενδεικτικές φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου εμβρύων T2 γενιάς του φυτού 21 σε σχέση με τον άγριο τύπο. 1-7: έμβρυα σπερμάτων *LFY::HSPRNAi* T2 γενιάς του φυτού 21. Col-O: έμβρυο αγρίου τύπου.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των εμβρύων έδειξε ότι τα περισσότερα έμβρυα βρισκόταν στο τελικό στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης (δείγματα 1, 2, 3, 5 και 6), όπως φαίνεται στην εικόνα 8. Επίσης σε δύο περιπτώσεις, στα δείγματα 4 και 7, τα έμβρυα έμειναν καθηλωμένα στα στάδια τορπίλης και καρδιόσχημο αντίστοιχα. Γίνεται φανερό ότι τα έμβρυα χαρακτηρίζονται από ανατομικές παραμορφώσεις που σημαίνει ότι τα μηνύματα ανάπτυξης και διαφοροποίησης που έλαβαν τα σπέρματα αυτά κατά το σχηματισμό τους δεν ήταν αρκετά προκειμένου να αναπτυχθούν πλήρως και να παράγουν ένα ώριμο σπέρμα.

Αντίθετα με το φυτό 21, το φυτό 10, παρά το δραματικό φαινότυπο που παρουσίαζε κατά την ανάπτυξή του, ανταποκρίθηκε καλύτερα στο θερμικό σοκ και από τα άνθη του παράχθηκαν πολύ περισσότερα σπέρματα, τόσο μετά από αυτογονιμοποίηση όσο και μετά από ετερογονιμοποίηση. Σπέρματα που προήλθαν από αυτογονιμοποίηση έδωσαν 40 φυτά T2 γενιάς ενώ 33 φυτά προέκυψαν από σπέρματα που ήταν προϊόντα ετερογονιμοποίησης με Col-O γύρη. Ο μεγαλύτερος αριθμός απογόνων T2 γενιάς από το συγκεκριμένο αρχικό φυτό έβαλε τις βάσεις για εκτενέστερη και αναλυτικότερη μελέτη του φαινομένου της εμπλοκής των *Hsp90* γονιδίων κατά την άνθιση.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική παρατήρηση των T2 απογόνων τόσο σε μακροσκοπικό όσο και σε μικροσκοπικό επίπεδο. Παρακάτω παραθέτονται ενδεικτικές φωτογραφίες σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης φυτών που προέκυψαν τόσο από αυτο- όσο και από ετερογονιμοποίηση (Εικόνα 9).



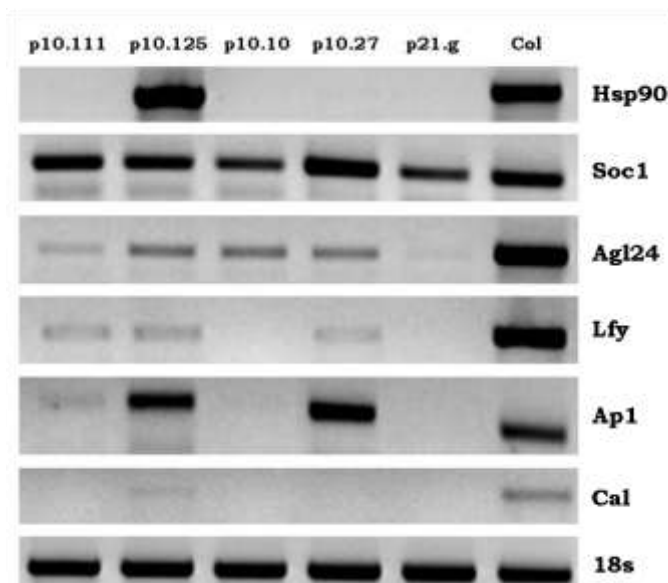
Εικόνα 9: Φωτογραφίες βιολογικού κύκλου φυτών που προήλθαν από αυτό- και ετερογονιμοποίηση απογόνων T2 γενιάς του φυτού 10. Σε κάθε φυτό το κάθε στάδιο ανάπτυξης αντιστοιχεί σε ηλικία 20, 30, 50 και 60 ημερών. Τα φυτά 10.102, 10.104, 10.111 και 10.141 προήλθαν από αυτόγονιμοποίηση ενώ τα φυτά 10.1, 10.3, 10.8 και 10.31 προήλθαν από έτερογονιμοποίηση.

Η φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών της T2 γενιάς του φυτού 10 έδειξε τα εξής: α) τα φυτά ήταν πιο εύρωστα σε σχέση με το αρχικό φυτό, β) είχαν πιο ομαλό αναπτυξιακό κύκλο που ολοκληρωνόταν σε περίπου 80 ημέρες, γ) παρόλο που εξακολουθούσαν να εμφανίζονται φυλλοειδείς δομές ή καλλοειδείς κατασκευές, εντούτοις σχεδόν όλα τα φυτά παρήγαγαν άνθη, των οποίων ο αριθμός διέφερε μεταξύ των φυτών και δ) σχεδόν όλα τα φυτά παρήγαγαν καρποταξίες με σπέρματα. Στην εικόνα 10 παρουσιάζονται ενδεικτικοί φαινότυποι των ανθικών καταβολών των *LFY::HSP90RNAi* φυτών T2 γενιάς όπως παρατηρήθηκαν με στερεοσκόπιο.



Εικόνα 10: Φωτογραφίες ενδεικτικών φαινοτύπων που παρατηρούνται στους απογόνους της T2 γενιάς του φυτού 10. α) Όλα τα φυτά της T2 γενιάς παρήγαγαν λειτουργικές ταξιανθίες σε κυμαινόμενα ποσοστά μεταξύ των φυτών. β και γ) όλα τα φυτά εμφάνιζαν αδιαφοροποίητες δομές στις ανθικές καταβολές, φυλλοειδείς κατασκευές και έκπτυξη βλαστών, χαρακτηριστικά των πρωταρχικών μετασχηματισμένων φυτών.

Μετά τη φαινοτυπική ανάλυση ακολούθησε μοριακή ανάλυση αντιπροσωπευτικών φυτών ώστε να μελετηθούν τα επίπεδα των *Hsp90* γονιδίων αλλά και των γονιδίων της άνθησης που αναλύθηκαν και στην T1 γενιά. Σκοπός της ανάλυσης αυτής ήταν η σύγκριση της σχέσης φαινοτύπου/μεταγραφικού προτύπου μεταξύ φυτών T1 και T2 γενιάς. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από 5 ανθικά μεριστώματα από κάθε φυτό, δημιουργία cDNA με χρήση της ανάστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια ακολούθησαν PCR αντιδράσεις για το κάθε γονίδιο. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του *18s* γονιδίου. Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% των PCR προϊόντων της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων και γονιδίων-κλειδιών της άνθησης σε ολικό RNA απομονωμένο από 5 ανθικά μεριστώματα *LFY::HSP90RNAi* φυτών T2 γενιάς και αγρίου τύπου Col-O. Τα δείγματα p10.111, p10.125, p10.10 και p10.17 προέρχονται από τους αντίστοιχους απογόνους του φυτού 10, ενώ το δείγμα p21.g προέρχεται από τον αντίστοιχο απόγονο του φυτού 21.

Η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων ήταν μη ανιχνεύσιμη στην πλειονότητα των δειγμάτων και παρουσίασε το ίδιο πρότυπο έκφρασης όπως και στην T1 γενιά. Και στην T2 γενιά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Soc1* κυμαινόταν σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα στα ανθικά μεριστώματα των φυτών που αναλύθηκαν.

Ουσιαστική ποσοτική μεταβολή παρατηρήθηκε και στο επίπεδο έκφρασης του mRNA του *Ag124* γονιδίου Μειωμένο αλλά ανιχνεύσιμο πρότυπο και το, ενώ για τα υπόλοιπα γονίδια της άνθισης ανιχνεύθηκαν δραματικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης.

3.γ. Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς

Παρατηρώντας τα αρχικά μετασχηματισμένα φυτά της T1 γενιάς και τους απογόνους της T2 γενιάς διακρίνεται μια σημαντική διαφορά. Όλα τα αρχικά *LFY::HSP90RNAi* φυτά ήταν ανίκανα να παράγουν άνθη, ακόμα και αν είχαν μεταβεί στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης σε φυσιολογικές συνθήκες. Εντελώς αντίθετο φαινότυπο παρουσίασαν οι απόγονοι των φυτών αυτών. Σχεδόν όλα τα φυτά της T2 γενιάς παρήγαγαν άνθη ενώ αναπτύσσονταν σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά επίσης και ο βιολογικός τους κύκλος προσομοίαζε πολύ τον άγριο τύπο. Η διαφορετικότητα αυτή μεταξύ των δύο γενιών τόνισε ακόμα περισσότερο την ανάγκη μελέτης του μηχανισμού της άνθισης.

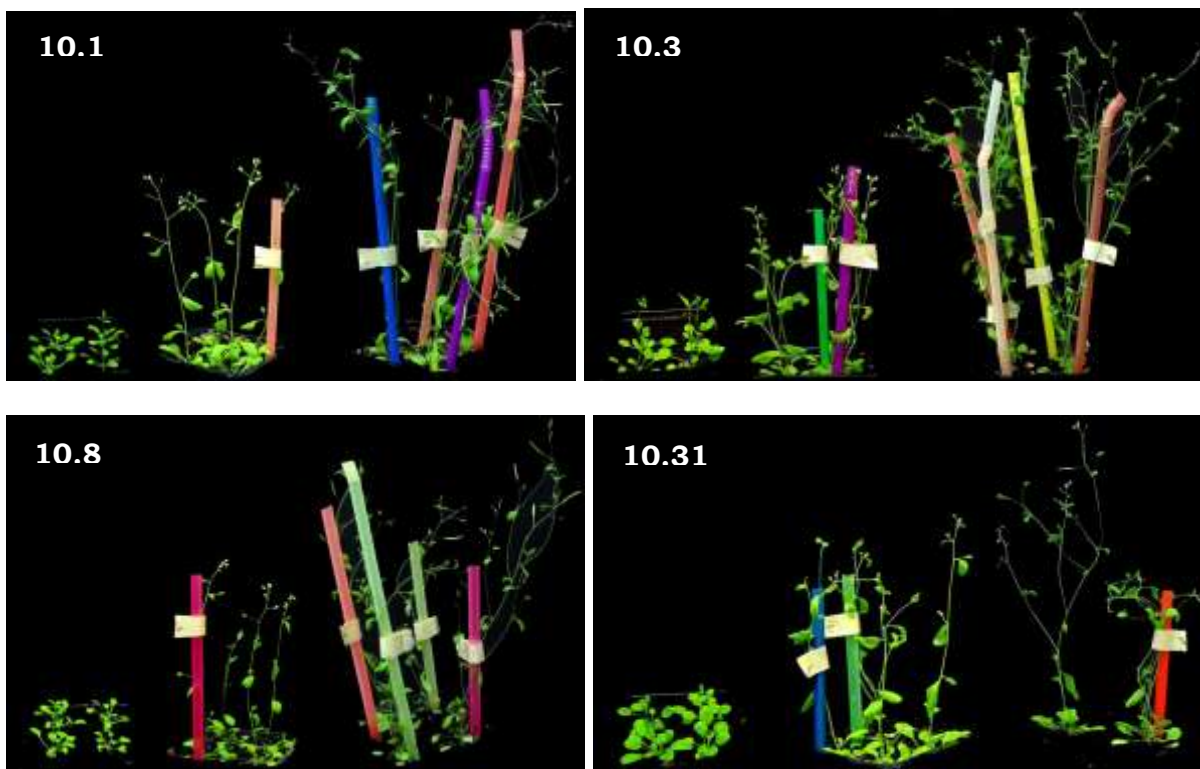
Είναι γνωστό ότι τα φυτά για να εξασφαλίσουν τη διαίωσιση του είδους τους μέσω της άνθισης και της καρποφορίας, έχουν κατασκευάσει ένα πολύπλοκο βιοχημικό δίκτυο. Το δίκτυο αυτό αποτελείται από τέσσερα κύρια μονοπάτια που οδηγούν στην άνθιση αλλά και πολλά παρακλάδια που ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης παρέχουν τη δυνατότητα στα φυτά να προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες και να ανθίζουν. Επίσης, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης τροποποιείται η ιεράρχηση των μονοπατιών αυτών ώστε τα φυτά να μπορούν να αξιοποιούν στο μέγιστο τα σιτάλα που θα τα οδηγήσουν στην άνθιση. Όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες μεγάλης ημέρας κυριαρχεί το μονοπάτι της φωτοπερίοδου, ακολουθεί το αυτόνομο, μετά του γιββερελλινικού οξέος και τελευταίο έρχεται το μονοπάτι της εαρινοποίησης. Αντίθετα, σε συνθήκες μικρής ημέρας κυριαρχεί το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος, ακολουθεί της φωτοπερίοδου, μετά το αυτόνομο και τέλος της εαρινοποίησης. Η τοποθέτηση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας μπορεί να δείξει την ιεράρχηση των μονοπατιών που επικρατεί σε κάθε συνθήκη, αν αποκλίνει από τον άγριο τύπο και πιο μονοπάτι είναι λειτουργικό ή μη. Οι μοριακές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής στην T1 αλλά και στην T2 γενιά δείχνουν ότι είτε τα φυτά ανθίζουν είτε δεν ανθίζουν, τα γονίδια στα οποία συγκλίνουν τα σιτάλα και από τα τέσσερα μονοπάτια της άνθισης υπολειπουργούν σε πολύ μεγάλο βαθμό.

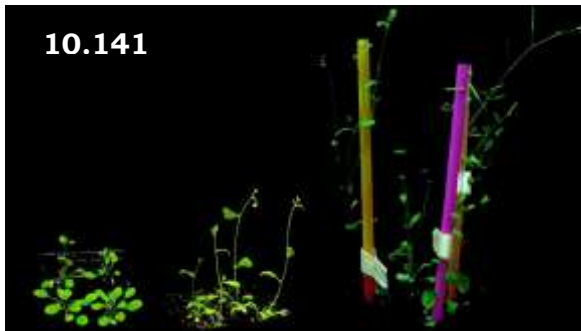
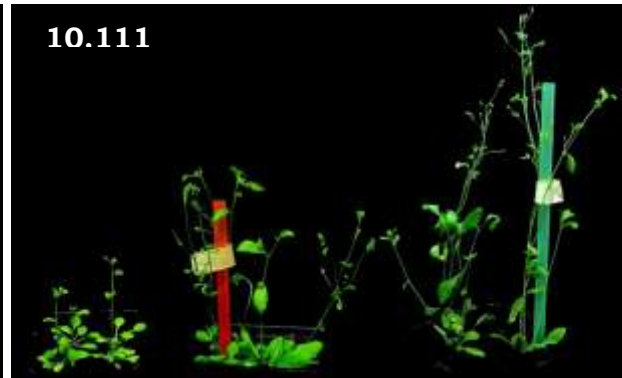
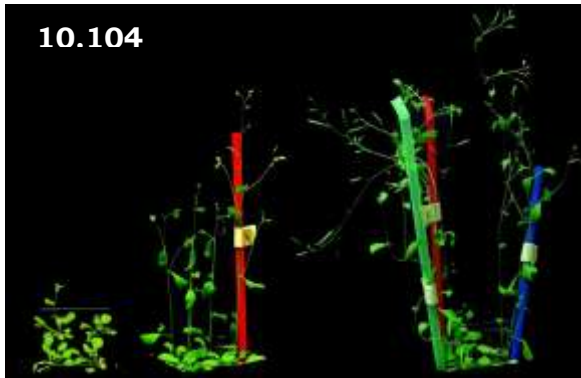
Μετά την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των φυτών της T2 γενιάς, συλλέχθηκαν ανεξάρτητα τα σπέρματα από κάθε φυτό που άνθισε. Από τις ομάδες των σπερμάτων της T3 γενιάς, επιλέχθηκαν εκείνες των οποίων τα αρχικά φυτά καλύπτουν όλο το εύρος των αντιπροσωπευτικών φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν στην T2. Τα φυτά που επιλέχθηκαν ανήκουν στις ομάδες 10.1, 10.3, 10.8, 10.31, 10.104, 10.111 και 10.141. Δηλαδή, ενώ, παραδειγματος χάριν, το φυτό 10.1 αντιπροσωπεύει ένα ανεξάρτητο φυτό της T2 γενιάς, στην T3 γενιά η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από αρκετούς απογόνους του φυτού αυτού. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ομάδες φυτών. Οι στόχοι της επιλογής των ομάδων αυτών ήταν 1) η μελέτη του ρόλου της φωτοπερίοδου στην ικανότητα άνθισης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών και 2) η παρατήρηση διατήρησης της πλαστικότητας των φαινοτύπων και στην επόμενη γενιά. Από τη στιγμή που οι ομάδες των φυτών αυτών αντιπροσωπεύουν το

σύνολο των φυτών των *LFY::HSP90RNAi* φυτών, μελέτη της ικανότητας άνθισης των φυτών αυτών θα δώσει σημαντικά αποτελέσματα για το πως τα *Hsp90* γονίδια έχουν επηρεάσει το μηχανισμό της άνθισης. Προκειμένου να μελετηθεί η άνθιση διενεργήθηκαν 3 πειράματα: Πρώτον, ανάπτυξη των σπερμάτων σε συνθήκες μεγάλης ημέρας ώστε να παρατηρηθεί αν επαναλαμβάνονται οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στην T2 γενιά. Δεύτερον, επανάληψη του πρώτου πειράματος ώστε να μετρηθεί η ικανότητα άνθισης των φυτών μέσω της μέτρησης ορισμένων δεικτών της άνθισης. Τρίτον, επανάληψη του δεύτερου πειράματος σε συνθήκες μικρής ημέρας ώστε να μετρηθεί και πάλι η ικανότητα άνθισης των φυτών.

3.γ.1. Φαινοτυπική παρατήρηση της T3 γενιάς

Όπως αναφέρθηκε, οι ομάδες φυτών της T2 γενιάς που επιλέχθηκαν ώστε να γίνει η φαινοτυπική μελέτη ήταν οι 10.1, 10.3, 10.8, 10.31, 10.104, 10.111 και 10.141. Για το σκοπό αυτό, τα σπέρματα των ομάδων αυτών τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό μέσο MS_{hyg30} και στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε η επιλογή για τα μετασχηματισμένα φυτά, μεταφυτεύθηκαν σε γλαστράκια με χώμα. Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους τα φυτά αναπτύσσονταν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Στην εικόνα 12 παραθέτονται ενδεικτικές φωτογραφίες φυτών της κάθε ομάδας.





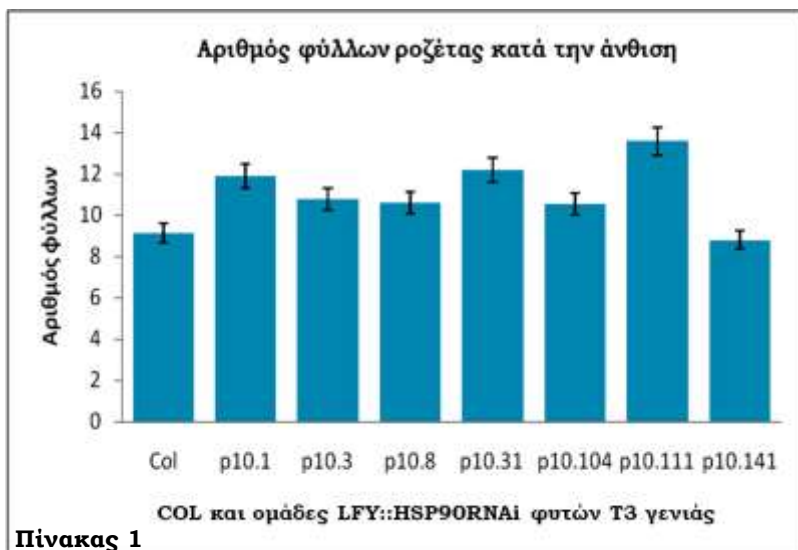
Εικόνα 12: Ενδεικτικές φωτογραφίες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς για κάθε ομάδα φυτών που μελετήθηκε φαινοτυπικά. Κάθε ομάδα στην οποία έγινε φαινοτυπική ανάλυση παρατηρήθηκαν τα εξής: α) οι απόγονοι της T3 γενιάς παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο με το πατρικό φυτό, β) έχουν παρόμοιο βιολογικό κύκλο ανάπτυξης, γ) μέσα στον πληθυσμό των φυτών της κάθε σειράς εμφανίζονται και οι υπόλοιποι φαινότυποι που έχουν παρατηρηθεί τόσο στην T2 όσο και στην T1 γενιά, όμως όλα τα φυτά έδωσαν σπέρματα.

Τα T3 φυτά της κάθε σειράς ήταν αρκετά εύρωστα, είχαν παρόμοιο αναπτυξιακό κύκλο με τα αρχικά φυτά και άνθιζαν καθώς αναπτύσσονταν σε φυσιολογικές συνθήκες. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της κάθε ομάδας που μελετήθηκε ήταν το γεγονός ότι μέσα στο σύνολο του πληθυσμού δεν παρατηρούνταν αποκλειστικά οι φαινότυποι των αρχικών φυτών, αλλά το σύνολο των φαινοτύπων που εκδηλώθηκαν τόσο στην T2 όσο και στην T1 γενιά. Για παράδειγμα, η παρατήρηση της ομάδας φυτών 10.111 δείχνει ότι μέσα στον πληθυσμό υπάρχουν φυτά που δεν ανθίζουν καθόλου και μένουν καθηλωμένα στο στάδιο της ροζέτας, φυτά που εκπτύσσουν ανθοφόρο βλαστό αλλά δεν παράγουν άνθη και φυτά που εκπτύσσουν ανθοφόρο βλαστό που παράγει άνθη αλλά και καλλοειδείς/φυλλοειδείς σχηματισμούς όπως έχουν ήδη παρατηρηθεί στις ανθικές καταβολές. Το αρχικό 10.111 φυτό χαρακτηρίζεται ως εύρωστο με έκπτυξη ανθοφόρου βλαστού και παραγωγή τόσο ανθέων όσο και άλλων φυλλοειδών σχηματισμών και καλλοειδών δομών. Όπως γίνεται αντιληπτό, η προέλευση των φυτών της T3 γενιάς δεν επηρεάζει το φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Δηλαδή, ανεξάρτητα από το φαινότυπο που παρουσίασε το κάθε φυτό της T2 γενιάς χωριστά, οι απόγονοί του παρουσίασαν όλο το φαινοτυπικό εύρος που παρατηρήθηκε στην T2 γενιά. Επίσης, αυτή η φαινοτυπική επανάληψη που παρατηρείται μέσα στον πληθυσμό της T3 γενιάς επιτρέπει τη συνολική παρατήρηση του φαινομένου ως ένα γεγονός χωρίς να απαιτείται διάσπαση σε επιμέρους κατηγορίες.

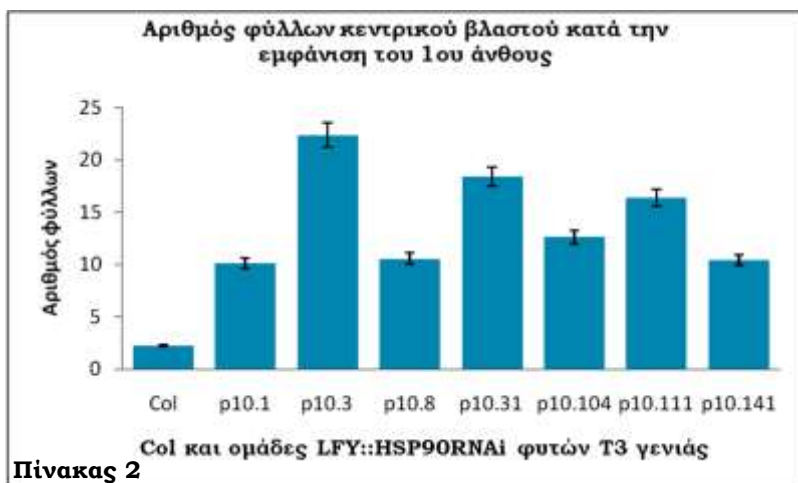
3.γ.2. Πείραμα επίδρασης φωτοπεριόδου μεγάλης ημέρας

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ως άνθιση ορίζεται η έκπτυξη κεντρικού ανθοφόρου βλαστού που σηματοδοτεί τη μετάβαση από το βλαστικό στο αναπαραγωγικό στάδιο ανάπτυξης (Sangster et al., 2007). Ειδικά στο *Arabidopsis*, καθώς το φυτό αναπτύσσεται και παράγει φύλλα ροζέτας βρίσκεται στη βλαστική φάση, ενώ μόλις εκπτύξει ανθοφόρο βλαστό εισέρχεται στην αναπαραγωγική φάση και κατ'

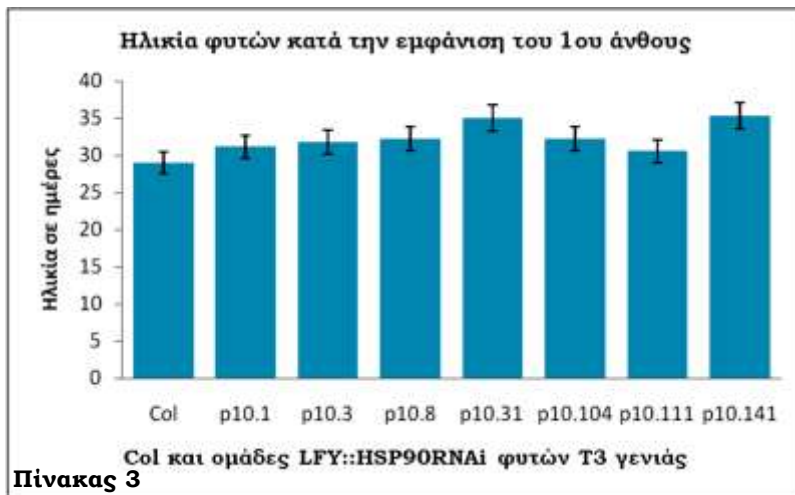
επέκταση στην άνθιση. Οι τρόποι με τους οποίους μπορούμε να μετρήσουμε την άνθιση είναι δυο: α) μετρώντας τον αριθμό φύλλων ροζέτας κατά την έκπτυξη του ανθοφόρου βλαστού και β) μετρώντας το συνολικό αριθμό φύλλων κατά την εμφάνιση του πρώτου ανοικτού άνθους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε και μια επιπλέον παράμετρος που αφορούσε την ηλικία των φυτών κατά την εμφάνιση του πρώτου ανοικτού άνθους. Η παράμετρος αυτή χρησιμοποιήθηκε γιατί παρατηρήθηκε ότι τα άνθη στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά παρουσιάζουν μεγάλη υστέρηση από την εμφάνιση των κλειστών ανθέων μέχρι το άνοιγμά τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.



Πίνακας 1: Αποτελέσματα μέτρησης της άνθισης σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Γράφημα μέσου όρου αριθμού φύλλων ροζέτας για κάθε ομάδα *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς και αγριού τύπου κατά την έκπτυξη του ανθοφόρου βλαστού. Σε κάθε ομάδα το 100% των φυτών που μετρήθηκε έκπτυξε ανθοφόρο βλαστό, οπότε τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν όλα τα φυτά που αναπτύχθηκαν.



Πίνακας 2: Αποτελέσματα μέτρησης της άνθισης σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Γράφημα μέσου όρου αριθμού φύλλων ανθοφόρου βλαστού κατά την εμφάνιση του 1ου ανοικτού άνθους για κάθε ομάδα *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς και αγριού τύπου. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν μόνο τα φυτά της κάθε ομάδας που παρήγαγαν άνθη και δεν αντιπροσωπεύουν τον συνολικό αριθμό των φυτών που αναπτύχθηκε. Αναλυτικά τα ποσοστά των φυτών που παρήγαγαν άνθη σε κάθε ομάδα που περιλαμβάνεται στον πίνακα είναι τα εξής: Col-O 100%, 10.1 100%, 10.3 75%, 10.8 100%, 10.31 52%, 10.104 80%, 10.111 48%, 10.141 66%.



Πίνακας 3: Αποτελέσματα μέτρησης της άνθισης σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Γράφημα μέσου όρου ηλικίας σε ημέρες κάθε ομάδας LFY::HSP90RNAi φυτών T3 γενιάς και αγρίου τύπου κατά την εμφάνιση του 1^{ου} ανοικτού άνθους. Στις μετρήσεις περιλαμβάνονται τα αντίστοιχα φυτά που μετρήθηκαν και στον Πίνακα 2.

Τα φυτά της κάθε ομάδας LFY::HSP90RNAi φυτών T3 γενιάς και αγρίου τύπου αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας (LD, 16 h φως/8 h σκοτάδι). Τα δεδομένα αποτελούν το ΜΟ μετρήσεων από δεκαεπτά φυτά.

Προκειμένου να μελετήσουμε τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φυτών, πραγματοποιήθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα μετρήσεις όσον αφορά την ηλικία στην οποία τα φυτά εμφανίζουν κεντρικό βλαστό καθώς επίσης και την ηλικία στην οποία εμφανίζουν το πρώτο τους άνθος. Επίσης, έγινε και καταμέτρηση των φύλλων ροζέτας και βλαστού των φυτών κατά τα δύο παραπάνω στάδια. Παράλληλα με τα μετασηματισμένα φυτά, αντίστοιχες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και για τα φυτά αγρίου τύπου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της άνθισης σε συνθήκες μεγάλης ημέρας υποδεικνύουν τα εξής:

α) Όλες οι ομάδες φυτών εκτός από την 10.141 μεταβαίνουν στην αναπαραγωγική φάση καθυστερημένα σε σχέση με τον άγριο τύπο αφού παράγουν μεγαλύτερο αριθμό φύλλων ροζέτας: ο άγριος τύπος Col παράγει 9^{+/-1} φύλλα ροζέτας, το 10.1 12^{+/-2} φύλλα, το 10.3 11^{+/-3} φύλλα, το 10.8 11^{+/-2} φύλλα, το 10.31 12^{+/-4} φύλλα, το 10.104 11^{+/-3} φύλλα, το 10.111 14^{+/-4} φύλλα και το 10.141 9^{+/-2} φύλλα ροζέτας. Φαίνεται λοιπόν ότι, κατά κανόνα, σε συνθήκες μεγάλης ημέρας τα LFY::HSP90RNAi φυτά παρουσιάζουν υστέρηση ως προς το χρόνο άνθισης.

β) Υπάρχει σημαντική καθυστέρηση των LFY::HSP90RNAi φυτών ως προς την εμφάνιση του 1^{ου} ανοικτού άνθους, σε όσα φυτά βέβαια καταφέρνουν να παράγουν άνθη. Ενώ ο άγριος τύπος παράγει 2^{+/-1} φύλλα στον ανθοφόρο βλαστό κατά την εμφάνιση του 1^{ου} ανοικτού άνθους, στις LFY::HSP90RNAi ομάδες ισχύουν τα εξής: για το 10.1 10^{+/-2} φύλλα, το 10.3 22^{+/-6} φύλλα, το 10.8 11^{+/-2} φύλλα, το 10.31 18^{+/-4} φύλλα, το 10.104 13^{+/-5} φύλλα, το 10.111 16^{+/-1} φύλλα και το 10.141 10^{+/-3} φύλλα. Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα νούμερα αυτά αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των φυτών το οποίο άνθισε. Τα φυτά αγρίου τύπου Col-O ανθισαν σε ποσοστό 100% η ομάδα 10.1 σε ποσοστό 100%, η 10.3 σε 75%, η 10.8 σε 100%, η 10.31 σε 52%, η 10.104 σε 80%, η 10.111 σε 48%, η 10.141 σε ποσοστό 66%. Παρόλο που όλα τα φυτά κατάφεραν να περάσουν στην αναπαραγωγική φάση και να παράγουν ανθοφόρο βλαστό, εντούτοις δεν κατάφεραν όλα τα φυτά να παράγουν λειτουργικά άνθη.

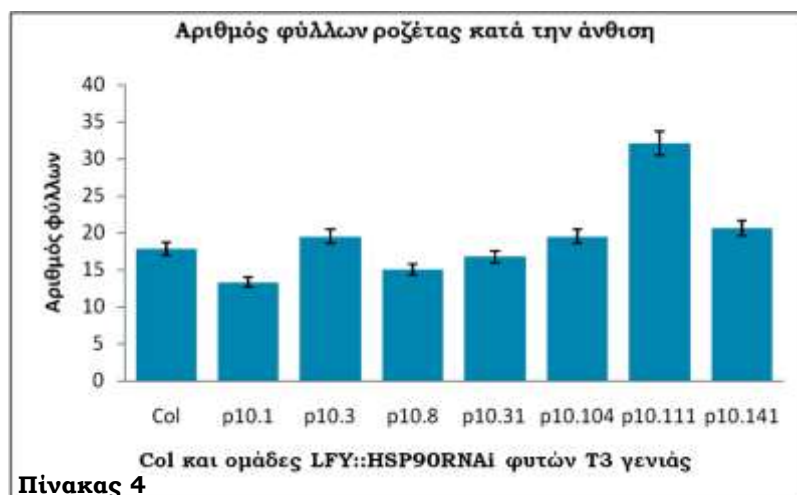
γ) Τα LFY::HSP90RNAi φυτά καθυστερούν να παράγουν άνθη ακόμα και αν η μέτρηση λάβει υπόψη τον αριθμό ημερών που απαιτείται για την εμφάνιση του 1^{ου} άνθους. Ενώ ο άγριος τύπος Col-O χρειάζεται περίπου 29^{+/-1} μέρες για να ανοίξει το 1^ο άνθος, η ομάδα 10.1 χρειάζεται 31^{+/-1} μέρες, η 10.3 32^{+/-2} μέρες, η 10.8 32^{+/-1} μέρες, η 10.31 35^{+/-2} μέρες, η 10.104 32^{+/-2} μέρες, η 10.111 31^{+/-2} μέρες και η 10.141 35^{+/-2}

μέρες. Και σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα στηρίχθηκαν στα φυτά που κατάφεραν να παράγουν λειτουργικά άνθη.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε συνθήκες μεγάλης ημέρας δείχνουν ότι τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά καθυστερούν σημαντικά όχι μόνο να μπουν στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης αλλά ακόμα περισσότερο στο σχηματισμό λειτουργικών ανθέων στο φυσιολογικό χρονικό περιθώριο που δίνεται από τη στιγμή της μετάβασης. Τα δεδομένα αυτά συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι το μονοπάτι μεγάλης ημέρας, που είναι το κυρίαρχο μονοπάτι σε αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης είτε υπολειπεται και γι'αυτό υπάρχει αυτή η μεγάλη καθυστέρηση της άνθισης καθώς αυτή μπορεί να επάγεται από λειψυργία των υπολοίπων μονοπατιών ή άλλων εναλλακτικών δρόμων.

3.γ.3. Πείραμα επίδρασης φωτοπεριόδου μικρής ημέρας

Όπως έχει αναφερθεί, σε συνθήκες μικρής ημέρας αλλάζει η ιεράρχηση των μονοπατιών της άνθισης και κυρίαρχο ρόλο λαμβάνει το μονοπάτι του γιβερρελινικού οξέος (GA). Η τοποθέτηση των φυτών στις συνθήκες αυτές μπορεί δείξει αν και σε πιο βαθμό έχει επηρεαστεί το συγκεκριμένο μονοπάτι από την έλλειψη των HSP90 πρωτεϊνών στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά. Για το πείραμα μικρής ημέρας πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά μετρήσεων όπως και στο προηγούμενο πείραμα, με τη μόνη διαφορά ότι τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης σε συνθήκες μικρής ημέρας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν αρκεί μόνο να μειωθεί ο αριθμός των φωτό-ωρών στα φυτά αλλά πρέπει να μειωθεί και η ποιότητα του φωτός που δέχονται, δηλαδή η ένταση του φωτός ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες μικρής ημέρας. Για το σκοπό αυτό, ο θάλαμος προγραμματίστηκε σε 8 ώρες φως/16 ώρες σκοτάδι με ένταση φωτός μεταξύ 70-90 PAR (Photosynthetically Active Radiation, $\mu\text{A}/\text{m}^2/\text{sec}$). Η διακύμανση της έντασης του φωτός υπάρχει λόγω της διακύμανσης της απόστασης των φυτών από τις λάμπες φωτισμού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.



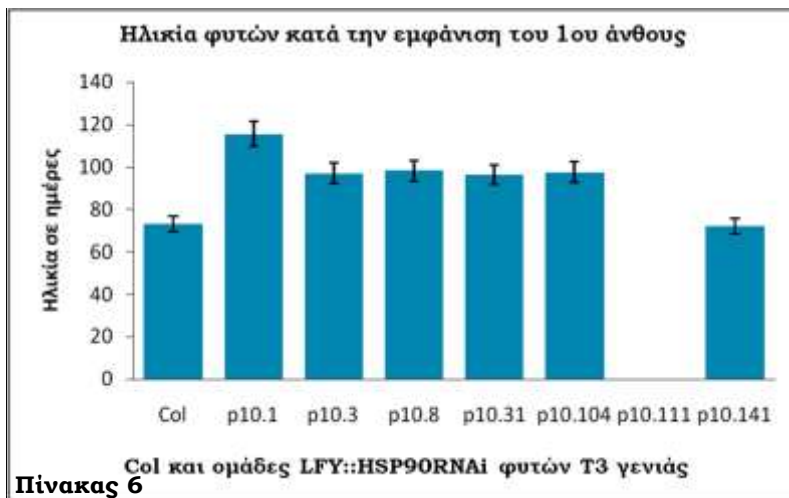
Πίνακας 4

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μετρήσεων της άνθισης σε συνθήκες μικρής ημέρας. Γράφημα μέσου όρου αριθμού φύλλων ροζέτας για κάθε ομάδα *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς και αγρίου τύπου κατά την έκπτυξη του ανθοφόρου βλαστού. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν μόνο τα φυτά της κάθε ομάδας που έκπτυξαν ανθοφόρο βλαστό και δεν αντιπροσωπεύουν τον συνολικό αριθμό των φυτών που μετρήθηκε. Δηλαδή υπήρχαν φυτά που καθυστέρησαν να ανθίσουν και φυτά που ποτέ δεν

κατάφεραν να ανθίσουν. Αναλυτικά τα ποσοστά της κάθε ομάδας που περιλαμβάνονται στον πίνακα είναι τα εξής: Col 100%, 10.1 100%, 10.3 100%, 10.8 100%, 10.31 100%, 10.104 86%, 10.111 78%, 10.141 100%.



Πίνακας 5: Αποτελέσματα μετρήσεων της άνθισης σε συνθήκες μικρής ημέρας. Γράφημα μέσου όρου αριθμού φύλλων κεντρικού βλαστού κατά την εμφάνιση του 1^{ου} ανοικτού άνθους για κάθε ομάδα LFY::HSP90RNAi φυτών T3 γενιάς και αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν μόνο τα φυτά της κάθε ομάδας που παρήγαγαν άνθη και δεν αντιπροσωπεύουν τον συνολικό αριθμό των φυτών που μετρήθηκε. Αναλυτικά τα ποσοστά της κάθε ομάδας που παρήγαγε άνθη είναι τα εξής: Col 100%, 10.1 74%, 10.3 25%, 10.8 100%, 10.31 47%, 10.104 54%, 10.111 0%, 10.141 100%.



Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων της άνθισης σε συνθήκες μικρής ημέρας. Γράφημα μέσου όρου ηλικίας σε ημέρες κάθε ομάδας LFY::HSP90RNAi φυτών T3 γενιάς και αγρίου τύπου κατά την εμφάνιση του 1^{ου} ανοικτού άνθους. Στις μετρήσεις περιλαμβάνονται τα αντίστοιχα φυτά που μετρήθηκαν στον Πίνακα 5.

Μελετώντας τα αποτελέσματα της μέτρησης της άνθισης σε συνθήκες μικρής ημέρας προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

α) Οι σειρές που μελετήθηκαν φαίνεται να εκπύσσουν ανθοφόρο βλαστό παρόμοια ή και νωρίτερα από τον άγριο τύπο με εξαίρεση τη σειρά 10.111 που καθυστερεί εξαιρετικά. Σε συνθήκες μικρής ημέρας ο άγριος τύπος Col εκπύσσει ανθοφόρο βλαστό στα 18^{+/-7} φύλλα ροζέτας και τα LFY::HSP90RNAi φυτά: για την ομάδα του 10.1 είναι 13^{+/-2} φύλλα, την 10.3 είναι 20^{+/-7} φύλλα, την 10.8 είναι 15^{+/-6} φύλλα, την 10.31 είναι 17^{+/-3} φύλλα, την 10.104 είναι 20^{+/-6} φύλλα, την 10.111 είναι 32^{+/-9} φύλλα και την 10.141 είναι 21^{+/-6} φύλλα ροζέτας. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τις ομάδες των φυτών που εμφάνισαν ανθοφόρο βλαστό, καθώς για τις ομάδες 10.104 και 10.111 υπάρχει ένα ποσοστό, 14 και 22% αντίστοιχα, που παρέμεινε καθηλωμένο στη βλαστική φάση ανάπτυξης. Και σε αυτές τις μετρήσεις φαίνεται ότι υπάρχει διαβάθμιση στην έκπτυξη του κεντρικού ανθοφόρου (IM) που κυμαίνεται από τον άγριο τύπο μέχρι καθήλωση στη βλαστική φάση ανάπτυξης. Η καθήλωση στη βλαστική φάση ανάπτυξης δείχνει ότι το μονοπάτι που είναι υπεύθυνο για τη προώθηση των μηνυμάτων της άνθισης αδυνατεί παντελώς να ολοκληρώσει τη διαδικασία της άνθισης. Δηλαδή σε αυτή την περίπτωση το GA μονοπάτι είναι πλήρως απενεργοποιημένο.

β) Η μέτρηση της δεύτερης παραμέτρου της άνθισης παρουσίασε μεγάλο ενδιαφέρον. Ο άγριος τύπος Col-O παράγει 35^{+/-9} φύλλα στον κεντρικό βλαστό μέχρι την εμφάνιση του 1^{ου} ανοικτού άνθους και στις συνθήκες μικρής ημέρας όλα τα φυτά αγρίου τύπου παρήγαγαν άνθη. Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα για τα LFY::HSP90RNAi φυτά. Εκτός από δύο ομάδες φυτών, τη 10.8 και τη 10.141 που άνθισαν περίπου παρόμοια με το Col-O και παρουσίασαν 32^{+/-7} και 31^{+/-9} φύλλα βλαστού αντίστοιχα, οι υπόλοιπες

ομάδες παρουσίασαν σημαντικά προβλήματα. Η ομάδα 10.1 άνθισε σε ποσοστό 75% παράγοντας επιπλέον 30^{+/-10} φύλλα σε σχέση με το Col-O, η 10.3 άνθισε σε ποσοστό 25% παράγοντας επιπλέον 31^{+/-13} φύλλα σε σχέση με το Col-O, η 10.31 άνθισε σε ποσοστό 47% παράγοντας επιπλέον 22^{+/-10} φύλλα σε σχέση με το Col-O, η 10.104 σε ποσοστό 54% παράγοντας 40^{+/-10} φύλλα βλαστού και η ομάδα 10.111 δεν κατάφερε να παράγει κανένα άνθος. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι αν και τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά στο σύνολό τους καταφέρνουν να μεταβούν στο αναπαραγωγικό στάδιο ανάπτυξης, αντιμετωπίζουν σοβαρά προβλήματα όσον αφορά τη διαδικασία σχηματισμού ανθών. Δύο μπορεί να είναι οι πιθανές αιτίες της έλλειψης σχηματισμού ανθών. Είτε σχηματίζεται κεντρικός ανθοφόρος, ο οποίος όμως είναι ανίκανος να παράγει ανθικό μεριστώμα, είτε ακόμη και να αποκτούν τα μεριστώματα ανθική ταυτότητα μπορεί στη συνέχεια να λαμβάνει χώρα καταστολή της ανθικής διαφοροποίησης.

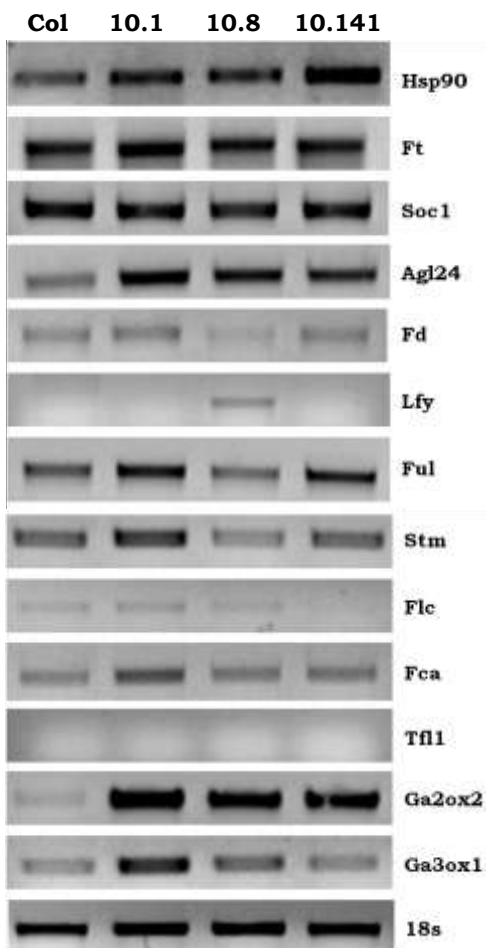
γ) Επίσης, οι μετρήσεις του μέσου όρου των ηλικιών των φυτών των σειρών σε σχέση με τον άγριο τύπο δείχνει ότι τα φυτά καθυστερούν με μεγάλη διαφορά ημερών να παράγουν το 1^ο ανοικτό άνθος το οποίο ισχύει για όλες τις ομάδες εκτός της 10.141 και της 10.111 που δεν άνθισε ποτέ. Ενώ το Col-O χρειάζεται περίπου 73^{+/-14} μέρες, η 10.1 χρειάζεται 116^{+/-20} μέρες, η 10.3 χρειάζεται 97^{+/-12} μέρες, η 10.8 χρειάζεται 98^{+/-19} μέρες, η 10.31 χρειάζεται 96^{+/-29} μέρες, η 10.104 98^{+/-18} μέρες και η 10.141 χρειάζεται 72^{+/-15} μέρες που είναι και το μοναδικό που ανταποκρίνεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε συνθήκες μικρής ημέρας υποδεικνύουν ότι παρόλο που τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά έχουν την ικανότητα να μεταβούν στην αναπαραγωγική φάση, εντούτις καθυστερούν δραματικά ως και ολοκληρωτικά να σχηματίσουν άνθη. Από τη στιγμή που σε αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος, τα δεδομένα δείχνουν ότι το μονοπάτι αυτό στο σύνολο των φυτών όχι μόνο έχει τρομερά μειωμένη δραστηριότητα αλλά δεν αντικαθίσταται κίολας από κάποιο εναλλακτικό ή κυρίαρχο δρόμο αφού τα φυτά παράγουν τόσο δραματικά αποτελέσματα.

3.γ.4. Μοριακή ανάλυση T3 γενιάς

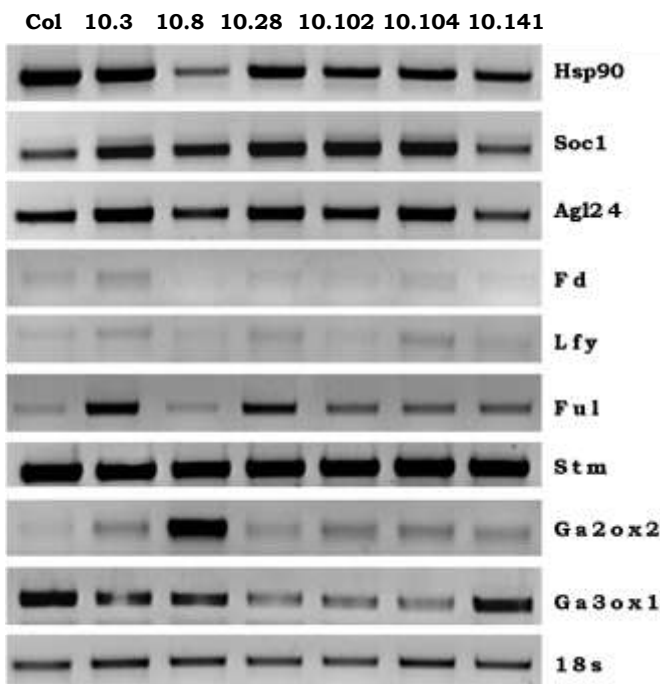
Παράλληλα με τη φαινοτυπική παρατήρηση, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων γονιδίων της άνθισης σε τρεις διαφορετικούς ιστούς, από φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα φυτά 19 ημερών από κάθε ομάδα *LFY::HSP90RNAi* φυτών, βλαστικά μεριστώματα φυτών ηλικίας 24 ημερών και ανθικά μεριστώματα φυτών ηλικίας 34 ημερών. Η δειγματοληψία περιελάμβανε 5 μικρά φυτά για τα δείγματα των 19 ημερών και 10 μεριστώματα για τα δείγματα των 24 και 34 ημερών. Οι ομάδες που επιλέχθηκαν ήταν οι 10.1, 10.8 και 10.141 αφού αντιπροσωπεύουν το σύνολο των φυτών που μελετούνται. Η μοριακή ανάλυση ξεκίνησε από μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της άνθισης. Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων παρουσιάζονται στις εικόνες 13α, 13β και 13γ.

Τα αποτελέσματα της μελέτης των επιπέδων της έκφρασης γονιδίων της άνθισης στα φυτά 19 ημερών έδειξε ότι η πλειονότητα των γονιδίων που μελετήθηκε εκφράζεται κανονικά στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά σε σχέση με τον άγριο τύπο Col-O. Μελετήθηκαν γονίδια και από τα τρία βασικά μονοπάτια της άνθισης, τα οποία δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των *LFY::HSP90RNAi* φυτών όσο και σε σχέση με τον άγριο τύπο. Σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν μόνο τα *Agl24* και *GA2ox2* γονίδια, τα οποία παρουσίασαν αυξημένα



επίπεδα έκφρασης στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά σε σχέση με τον άγριο τύπο. Το *Agl24* αποτελεί κομβικό γονίδιο του μηχανισμού της άνθισης και το *GA2ox2* αποτελεί κύριο γονίδιο του αναβολισμού του γιββερελλινικού οξέος. Φαίνεται ότι σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης μεγάλης ημέρας στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά υπάρχει υπερέκφραση ή/και συσσώρευση και των δύο γονιδίων, παρόλο που τόσο τα υπόλοιπα γονίδια που μελετήθηκαν όσο και τα *Hsp90* γονίδια φαίνεται να λειτουργούν κανονικά.

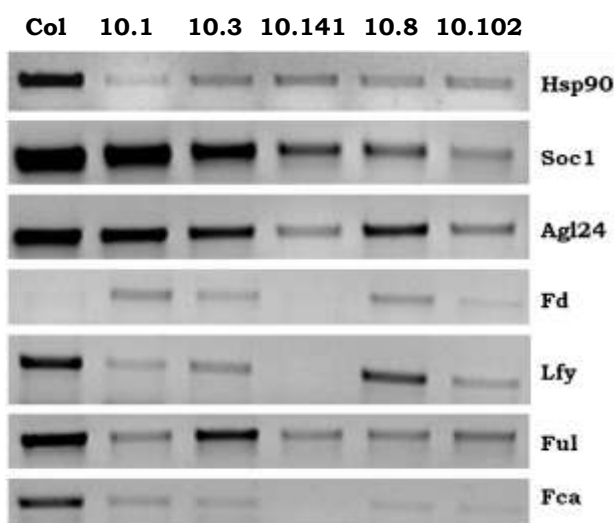
Εικόνα 13α: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR αντιδράσεων για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων της άνθισης σε ολικό RNA που απομονώθηκε από σύμπτυξη 5 φυτών ηλικίας 19 ημερών για κάθε *LFY::HSP90RNAi* ομάδα T3 γενιάς και τον άγριο τύπο. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *Hsp90*: τα 4 κυταροπλασματικά γονίδια, *Ft* (AT1G65480), *Soc1* και *Agl24*: κομβικά γονίδια των μονοπατιών της άνθισης, *Lfy*: γονίδιο μερισωματικής ταυτότητας, *Fd* (At4g35900), *Ful* (At5g60910), *Stm* (At1g62360), *Tfl1* (At5g03840): γονίδια που εκφράζονται κατά το μονοπάτι μεγάλης ημέρας, *Flc* (At5g10140), *Fca*: γονίδια που εκφράζονται στο αυτόνομο μονοπάτι, *Ga2ox2* (At1g30040), *Ga3ox1* (At1g15550): γονίδια του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με χρήση του γονιδίου *18s* που κωδικοποιεί για την 18S υπομονάδα του ριβοσώματος. Το δείγμα Col-O αντιστοιχεί στον άγριο τύπο, ενώ τα δείγματα 10.1, 10.8 και 10.141 σε τρεις διαφορετικές ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς.



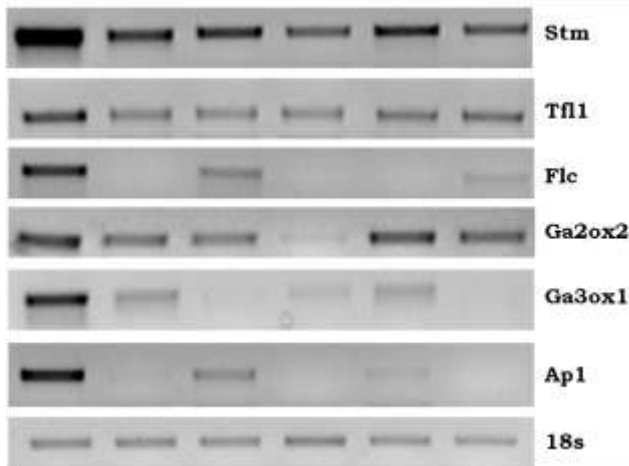
Εικόνα 13β: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR αντιδράσεων για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων της άνθισης σε ολικό RNA που απομονώθηκε από σύμπτυξη 10 βλαστικών μερισωμάτων για κάθε *LFY::HSP90RNAi* ομάδα και τον άγριο τύπο. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *Hsp90*: τα 4 κυταροπλασματικά γονίδια, *Soc1* και *Agl24*: κομβικά γονίδια των μονοπατιών της άνθισης, *Lfy*: γονίδιο μερισωματικής ταυτότητας, *Fd*, *Ful*, *Stm*: γονίδια που εκφράζονται κατά το μονοπάτι μεγάλης ημέρας, *Ga2ox2*, *Ga3ox1*: γονίδια του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος. Το δείγμα Col-O αντιστοιχεί στον άγριο τύπο, ενώ τα δείγματα 10.3, 10.8, 10.28, 10.102, 10.104 και 10.141 σε έξι διαφορετικές ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς.

Η μοριακή ανάλυση των γονιδίων που πραγματοποιήθηκε σε βλαστικό μεριστωματικό ιστό έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των *Hsp90* κυτταροπλασματικών γονιδίων εμφανίζονται μειωμένα σε σχέση με τον άγριο τύπο Col-O. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης του *Agl24* στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά φαίνεται να βρίσκονται σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα, όπως και στο *Soc1* γονίδιο. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γονίδια *GA2ox2* (At1g30040) και *GA3ox1* (At1g15550) που αποτελούν γονίδια αναβολισμού και καταβολισμού του γιββερελλινικού οξέος αντίστοιχα. Τα επίπεδα έκφρασης του *GA2ox2* παρατηρούνται αυξημένα σε σχέση με τον άγριο τύπο, όπως και στην ομάδα δειγμάτων των 19 ημερών. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του *GA3ox1* εμφανίζονται μειωμένα ενώ στην ομάδα δειγμάτων των 19 ημερών ήταν σχεδόν παρόμοια με τον άγριο τύπο. Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι όταν τα μετασχηματισμένα φυτά βρίσκονται στη βλαστική φάση ανάπτυξης, η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων στο κορυφαίο μεριστώμα αρχίζει να μειώνεται, γεγονός που δηλώνει ότι αρχίζει να εκφράζεται ο μηχανισμός της αποσιώπησης, αλλά τα γονίδια της άνθισης παραμένουν σχεδόν σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης εκτός από τα γονίδια του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος.

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα ανθικά μεριστώματα των *LFY::HSP90RNAi* φυτών εμφάνισε τελειώς διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με τις προηγούμενες ομάδες. Κανένα από τα γονίδια που μελετήθηκαν δεν παρουσίασε το ίδιο πρότυπο έκφρασης στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά και στον άγριο τύπο. Η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων εμφανίστηκε δραματικά μειωμένη σε σύγκριση με τις προηγούμενες ομάδες δειγμάτων, όπως και η έκφραση όλων το υπολοίπων γονιδίων που μελετήθηκαν. Μόνη εξαίρεση παρουσίασε το γονίδιο *Fd* (At4g35900) που φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασής του στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά, ενώ είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο στον άγριο τύπο. Η αύξηση αυτή στην έκφραση μπορεί να οφείλεται είτε σε υπερέκφραση είτε σε συσσώρευση των μηνυμάτων του γονιδίου. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσίασε η μειωμένη αλλά σταθερή έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της μεγάλης ημέρας. Τα *Stm*, *Tfl1* και *Ful* γονίδια παρόλο που εμφανίζουν μειωμένα πρότυπα έκφρασης σε σχέση με τον άγριο τύπο υποδεικνύουν μια σταθερότητα σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν. Επιπλέον, τα δύο κομβικά γονίδια *Soc1* και *Agl24* παρόλο που εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης, είναι εντούτοις ανιχνεύσιμα. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα αυτής της μοριακής ανάλυσης συμφωνούν με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των προτύπων έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων σε ανθικά μεριστώματα των προηγούμενων T1 και T2 γενιών.

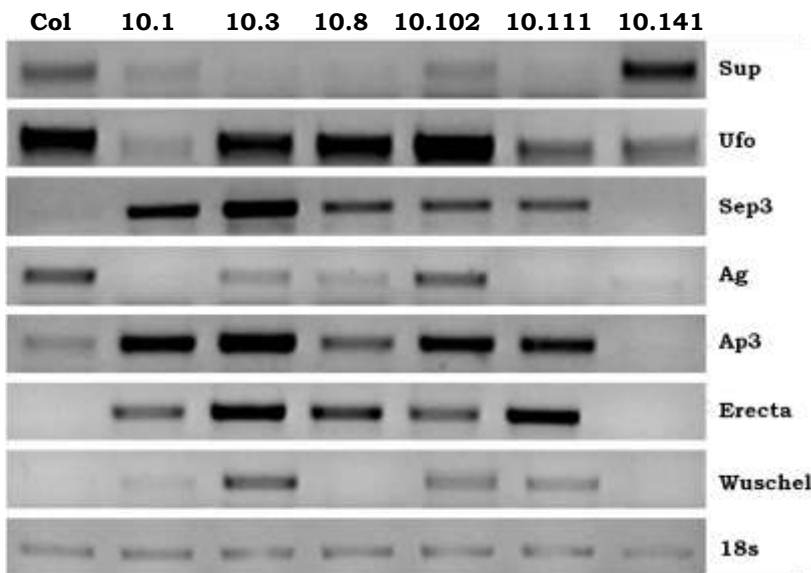


Εικόνα 13γ: Ανάλυση σε πηκτή αραρόζης 1% των προϊόντων PCR αντιδράσεων για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων της άνθισης σε ολικό RNA που απομονώθηκε από σύμπτυξη 10 ανθικών μεριστωμάτων ηλικίας 34 ημερών για κάθε *LFY::HSP90RNAi* ομάδα και τον άγριο τύπο. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *Hsp90*: τα 4 κυτταροπλασματικά γονίδια, *Soc1* και *Agl24*: κομβικά γονίδια των μονοπατιών της άνθισης, *Lfy*, *Ap1*: γονίδια μεριστωματικής ταυτότητας, *Fd*, *Ful*, *Stm*, *Tfl1*: γονίδια που εκφράζονται κατά το μονοπάτι μεγάλης ημέρας, *Flc*, *Fca*: γονίδια που εκφράζονται στο αυτόνομο μονοπάτι, *Ga2ox2*, *Ga3ox1*: γονίδια του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος. Το δείγμα Col-O αντιστοιχεί στον άγριο τύπο, ενώ τα δείγματα 10.1, 10.3, 10.8, 10.141 και 10.102 σε πέντε διαφορετικές ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς.



Τα μέχρι στιγμής δεδομένα δείχνουν ότι στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους τα γονίδια που είναι υπεύθυνα εξέλιξη του βιολογικού κύκλου και τη μετάβαση στην άνθιση λειτουργούν κανονικά, όπως επίσης λειτουργούν κανονικά και τα *Hsp90* γονίδια. Καθώς τα φυτά αρχίζουν να ξεφεύγουν από τη βλαστική ανάπτυξη και να ετοιμάζονται για τη μετάβαση στην ανθική φάση, μπαίνει σε λειτουργία ο RNAi μηχανισμός αφού ενεργοποιείται το γονίδιο *Lfy* και η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων αρχίζει να μειώνεται. Όταν

πλέον τα φυτά έχουν μεταβεί στην ανθική φάση, τότε ο RNAi μηχανισμός λειτουργεί στο μέγιστο και μειώνει σε μεγάλο ποσοστό τα επίπεδα έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων. Παράλληλα όμως μειώνονται και τα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν. Τα φυτά ωστόσο είναι ικανά να παράγουν, έστω και σε κάποιο ποσοστό, λειτουργικά άνθη. Θεωρήθηκε λοιπόν ενδιαφέρον να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης ορισμένων γονιδίων που εμπλέκονται στη δημιουργία του άνθους, ώστε να αποσαφηνιστεί αν τα γονίδια αυτά έχουν επηρεαστεί και σε πιο βαθμό από τις διαταραχές που έχουν προκληθεί λόγω της έλλειψης των *Hsp90* γονιδίων στο μηχανισμό της άνθισης. Η ανάλυση των γονιδίων αυτών πραγματοποιήθηκε σε ανθικό μεριστωματικό ιστό ηλικίας 34 ημερών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Ανάλυση σε πηκτική αгарόζης 1% των αποτελεσμάτων των PCR αντιδράσεων της μελέτης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη δημιουργία του άνθους σε ολικό RNA που απομονώθηκε από σύμπτυξη 10 ανθικών μεριστωμάτων ηλικίας 34 ημερών για κάθε *LFY::HSP90RNAi* ομάδα T3 γενιάς και αγρίου τύπου. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *Sep3*, *Ag*, *Ap3*: γονίδια του ABCE μοντέλου, *Sup*, *Ufo*: γονίδια που συμμετέχουν στη δημιουργία του άνθους, *erecta*: γονίδιο που εμπλέκεται στην ταυτότητα των οργάνων που προέρχονται από το βλαστικό μερίστωμα, *Wus*: γονίδιο που εκφράζεται στο

κορυφαίο μερίστωμα και είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό της ταυτότητας των βλαστικών κυττάρων. Το δείγμα Col-O αντιστοιχεί στον άγριο τύπο, ενώ τα δείγματα 10.1, 10.3, 10.8, 10.111, 10.102 και 10.141 σε έξι διαφορετικές ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς.

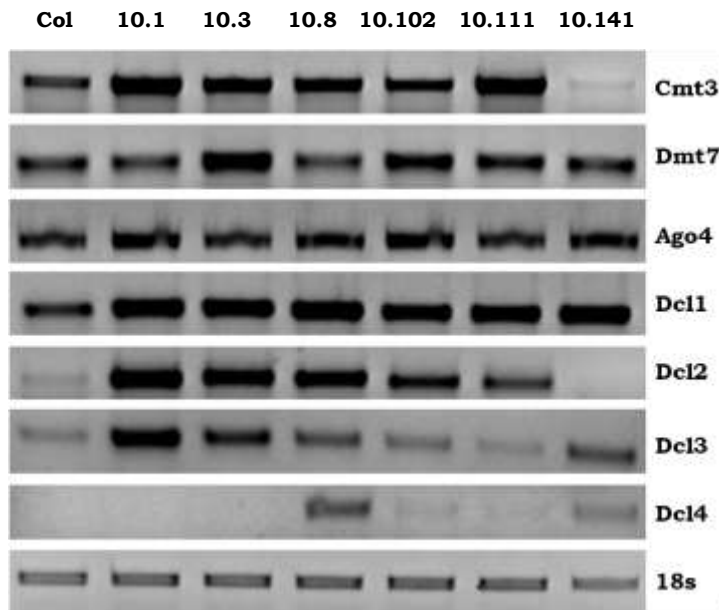
Δύο βασικά γονίδια του ABCE μοντέλου, το *Ap3* (At3g54340) και το *Sep3* (At1g24260), εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τον άγριο τύπο. Το *Ap3* είναι γονίδιο της B τάξης και εμπλέκεται στη δημιουργία των πετάλων και των

στημόνων, ενώ το *Sep3* είναι γονίδιο της Ε τάξης και εμπλέκεται στη δημιουργία όλων των οργάνων του άνθους. Επίσης, αυξημένη έκφραση παρουσίασε το *Erecta* (At2g26330), γονίδιο που εμπλέκεται στην ταυτότητα των οργάνων που προέρχονται από το βλαστικό μερίστωμα, αλλά και το *Wus* (At2g17950), γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό της ταυτότητας των βλαστικών κυττάρων στο κορυφαίο μερίστωμα. Παρόμοια έκφραση με τον άγριο τύπο παρουσίασε το *Ufo* (At1g30950), γονίδιο που εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση όχι μόνο της σωστής ταυτότητας του ανθικού μεριστώματος αλλά και του προτύπου των δακτυλίων των ανθικών οργάνων. Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι τα κύρια γονίδια που ελέγχουν ότι μόνο την παραγωγή μεριστωματικών κυττάρων αλλά και τη διαφοροποίησή τους βρίσκονται όχι μόνο σε κατάσταση υπερέκφρασης αλλά και εκτοπικής έκφρασης στο κορυφαίο ανθικό μερίστωμα. Εμφανές παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια *Ap3* και *Sep3* που φαίνεται να εκφράζονται όχι μόνο νωρίτερα από ότι είναι προγραμματισμένα αλλά και σε διαφορετικό ιστό. Τα γονίδια *Ap3* και *Sep3* αποτελούν γονίδια της Β και Ε τάξης αντίστοιχα που συμμετέχουν στον καθορισμό της ταυτότητας των οργάνων του άνθους και η έκφρασή τους ανιχνεύεται αφού έχει λάβει χώρα η διαφοροποίηση του ανθικού μεριστώματος και έχει ήδη αρχίσει η δημιουργία του άνθους. Συμπερασματικά, παρόλο που ο μηχανισμός της άνθισης είναι τρομερά διαταραγμένος και υπολειτουργεί, μέσω κάποιων άλλων εναλλακτικών ή συμπληρωματικών μηχανισμών τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά καταφέρνουν να ενισχύσουν τη δράση ορισμένων σημαντικών γονιδίων για τη δημιουργία του άνθους και να οδηγήσουν τα φυτά στην ανθοφορία.

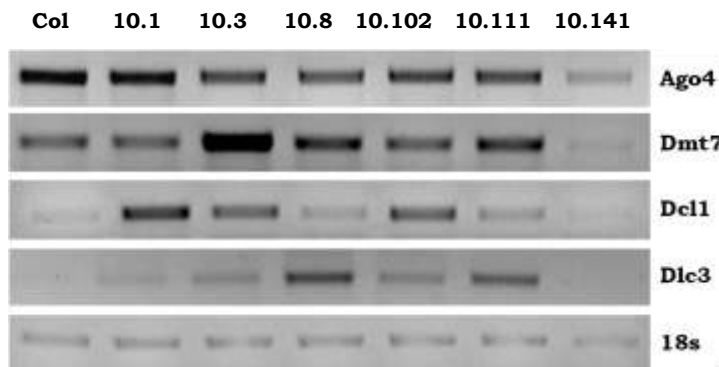
Πέραν της προσπάθειας αποσαφήνισης των αλλαγών που έχουν πραγματοποιηθεί στην άνθιση λόγω της έλλειψης των Hsp90 γονιδίων μέσω της μοριακής ανάλυσης γονιδίων κλειδιών του μηχανισμού, έγινε επίσης και ανάλυση κύριων γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό. Πρώτο επιλέχτηκε το γονίδιο *Ago4* (At2g27040) που εμπλέκεται στην στρατολόγηση των μικρών 21-27 νουκλεοτιδίων RNAs στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσιώπησης. Στη συνέχεια επιλέχτηκαν τα *Dcl* (Dicer-like) γονίδια που είναι ορθόλογα του γονιδίου *Dicer* στα ζώα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των μικρών 21-27 νουκλεοτιδίων RNAs, από το μητρικό διπλής αλυσίδας RNA (dsRNA). Στο *Arabidopsis* τα *Dcl* γονίδια είναι τέσσερα: *Dcl1* (At1g01040), *Dcl2* (At3g03300), *Dcl3* (At3g43920) και *Dcl4* (At5g20320). Το γονίδιο *Dcl1* αποτελεί ομόλογο του γονιδίου *Dicer* του ανθρώπου και εμπλέκεται στην παραγωγή των μικρών miRNAs και siRNAs. Το γονίδιο *Dcl2* αποτελεί επίσης ομόλογο του γονιδίου *Dicer* και εμπλέκεται στην παραγωγή των siRNAs. Το γονίδιο *Dcl3* απαιτείται για το σχηματισμό των siRNAs από την RDR2 ριβονουκλεάση. Το γονίδιο *Dcl4* εμπλέκεται στο σχηματισμό των siRNAs τόσο από κατασκευές ανάστροφων επαναλήψεων όσο και από ενδογενείς ακολουθίες.

Εκτός από τα παραπάνω γονίδια που επιλέχτηκαν για ανάλυση, ένα ακόμη φαινόμενο που απαιτεί ανάλυση είναι αυτό της άνθισης των T2 και T3 γενιών σε σχέση με την T1. Όπως έχει αναφερθεί, τα φυτά των γενιών T2 και T3 παράγουν άνθη ενώ τα αρχικά φυτά ήταν ανίκανα για ανθοφορία σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Μόνο μετά την εφαρμογή θερμικών σοκ, κατάσταση που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως εξωτερικό περιβαλλοντικό στρες, τα αρχικά φυτά κατάφεραν όχι μόνο να παράγουν άνθη αλλά και να μεταβιβάσουν την ικανότητα αυτή στις επόμενες γενιές. Η εγκαθίδρυση νέων ιδιοτήτων σε έναν οργανισμό μετά την εφαρμογή κάποιου εξωτερικού ερεθίσματος και η μεταβίβαση αυτών των ιδιοτήτων στις επόμενες γενιές, ονομάζεται επιγενετική. Βασικός μηχανισμός εγκαθίδρυσης των ιδιοτήτων αυτών είναι μέσω μεθυλώσεων, δηλαδή μεθυλ-ομάδων που ενσωματώνονται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του οργανισμού. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στον έλεγχο του μεθυλώματος του οργανισμού. Ενδεικτικά αναλύθηκαν δύο από αυτά, το γονίδιο *Cmt3* (At1g69770) που εμπλέκεται στη μεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης εκτός CG νησίδων και το γονίδιο *Dmt7* (At5g14620) που είναι ομόλογο του γονιδίου *Dnmt3* στα ζώα και εμπλέκεται στη διατήρηση της μεθυλίωσης

κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των PCR αντιδράσεων όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στις εικόνες 15α και 15β.



Εικόνα 15α: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των αποτελεσμάτων των PCR αντιδράσεων της μελέτης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό και στη μεθυλίωση του γενωματικού DNA των φυτών, σε ολικό RNA που απομονώθηκε από σύμπτυξη 5 φυτών ηλικίας 19 ημερών για κάθε *LFY::HSP90RNAi* ομάδα T3 γενιάς και άγριου τύπου. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *cmt3*, *dmt7*: για τη μελέτη της δράσης των μεθυλοτρανσφερασών στα φυτά, *Ago4*, *Dcl1*, *Dcl2*, *Dcl3*, *Dcl4*: για τη μελέτη του RNAi μηχανισμού. Το δείγμα Col-O αντιστοιχεί στον άγριο τύπο, ενώ τα δείγματα 10.1, 10.3, 10.8, 10.111, 10.102 και 10.141 σε έξι διαφορετικές ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς.



Εικόνα 15β: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των αποτελεσμάτων των PCR αντιδράσεων της μελέτης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό και στη μεθυλίωση του γενωματικού DNA των φυτών, σε ολικό RNA που απομονώθηκε από σύμπτυξη 10 ανθικών μεριστώματων ηλικίας 34 ημερών για κάθε *LFY::HSP90RNAi* ομάδα T3 γενιάς και άγριου τύπου. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι: *dmt7*: για τη μελέτη της δράσης των

μεθυλοτρανσφερασών στα φυτά, *Ago4*, *Dcl1*, *Dcl3*: για τη μελέτη του RNAi μηχανισμού. Το δείγμα Col αντιστοιχεί στον άγριο τύπο, ενώ τα δείγματα 10.1, 10.3, 10.8, 10.111, 10.102 και 10.141 σε έξι διαφορετικές ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών T3 γενιάς.

Τα αποτελέσματα αυτής της ομάδας γονιδίων έδειξαν ότι, το *AGO4* στα δείγματα από τα φυτά 19 ημερών και τα ανθικά μεριστώματα 34 ημερών, έχει παρόμοια έκφραση τόσο μεταξύ των *LFY::HSP90RNAi* φυτών όσο και μεταξύ των φυτών και του άγριου τύπου. Αντιθέτως, τα *Dcl* γονίδια διαφοροποιούνται από τον άγριο τύπο και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Και τα 4 γονίδια φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά, κατάσταση που μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη λειτουργία του RNAi μηχανισμού λόγω της αποσίωπησης των *Hsp90* γονιδίων. Όσον αφορά τις δύο μεθυλοτρανσφεράσες που μελετήθηκαν, *Cmt3* και *Dmt7*, και στις δυο ομάδες δειγμάτων φαίνεται να παρουσιάζουν ελάχιστες αλλαγές σε σχέση με τον άγριο τύπο. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι υπάρχει επαγωγή του RNAi μηχανισμού για την αποικοδόμηση των μηνυμάτων των

Hsp90 γονιδίων που επιβεβαιώνεται και μοριακά. Επίσης, τουλάχιστον σε μεταγραφικό επίπεδο, δεν φαίνεται να έχουν επηρεαστεί οι συγκεκριμένες μεθυλοτρανσφεράσες που μελετήθηκαν στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά γεγονός που δηλώνει ότι πιθανόν δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια αλλαγή στον τρόπο διατήρησης της μεθυλίωσης κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή στην *de novo* μεθυλίωση σε περιοχές ελεύθερες από CG νησίδες.

3.6. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις

Τόσο τα φαινοτυπικά αποτελέσματα όσο και οι μοριακές αναλύσεις των μετασχηματισμένων *LFY::HSP90RNAi* φυτών οδηγούν σε μια κεντρική παρατήρηση: τα *Hsp90* γονίδια πιθανώς να διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην άνθιση του φυτού *Arabidopsis thaliana*, καθώς μείωση ή απαλοιφή της έκφρασής τους καθιστά τα φυτά ανίκανα να αναπαραχθούν και να παράγουν απογόνους.

Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες HSP90 λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί. Δρουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο σχηματίζοντας σύμπλοκα προκειμένου να ασκήσουν τη δράση τους, η οποία περιλαμβάνει α) συμβολή στη λειτουργική διαμόρφωση της πρωτεΐνης-στόχου, β) προστασία πρωτεϊνών από αποικοδόμηση κάτω από συνθήκες στρες, γ) μεταφορά πρωτεϊνών-στόχων σε κυτταρικά διαμερίσματα ή μεταξύ κυττάρων και δ) διατήρηση της πρωτεΐνης στόχου σε κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να μπορέσει να ασκήσει τη δράση ή να δεχτεί κάποιο υπόστρωμα. Επίσης, το εύρος δράσης των HSP90 αλλά και η σημαντικότητά τους στις κυτταρικές λειτουργίες και την ανάπτυξη των οργανισμών φάνηκε και μέσω ανάλυσης του πρωτεώματος της ζύμης όπου δείχθηκε ότι οι HSP90 αλληλεπιδρούν σε πρωτεϊνικό επίπεδο με περίπου το 10% του συνόλου των πρωτεϊνών της ζύμης (Zhao et al., 2005).

3.6.1. Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων της άνθισης του *Arabidopsis thaliana*

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής, αποδεικνύεται ότι οι HSP90 πρωτεΐνες προφανώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της άνθισης αφού η έλλειψή τους προκαλεί τόσο δραματική αποδιοργάνωση στην πορεία της ανάπτυξης του φυτού. Είναι λοιπόν πολύ πιθανόν μέσα στο σύνολο των πρωτεϊνών που απαρτίζουν το μηχανισμό της άνθισης στο *Arabidopsis*, να υπάρχουν μια, δυο ή περισσότερες πρωτεΐνες που να αλληλεπιδρούν με τις HSP90. Για το λόγο αυτό κάνοντας χρήση κατάλληλων πακέτων βιοπληροφορικής, πραγματοποιήθηκε στοιχίση σε αμινοξικό επίπεδο των πρωτεϊνών της άνθισης *LFY*, *SOC1*, *Ag124*, *AP1* και *FT*. Όλες αποτελούν κομβικές πρωτεΐνες που δέχονται τα μηνύματα και από τα τέσσερα βασικά μονοπάτια της άνθισης και αποτελούν πρωτεΐνες -κλειδιά για τη μετάβαση από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης. Εγινε έλεγχος για την ύπαρξη δομικών ομολογιών μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών με πρωτεΐνες της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* που έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρούν με την HSP90 της ζύμης (Zhao et al., 2005).

Για την εύρεση των ομολογιών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ιστότοποι:

1. <http://www.arabidopsis.org/>
2. <http://www.yeastgenome.org/>
3. <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
4. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Από όλες τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν, μόνο η SOC1 παρουσίασε σημαντική ομολογία με την πρωτεΐνη YEP3 (YHL0009C) της ζύμης που αλληλεπιδρά με την HSP90. Η πρωτεΐνη SOC1 (At2g45660) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για την προαγωγή της άνθισης αφού κατέχει κομβική θέση στην αντίληψη των μηνυμάτων που προέρχονται και από τα τέσσερα μονοπάτια της άνθισης. Επίσης, δρα συνεργιστικά με την πρωτεΐνη AGL24 για να προάγει την άνθιση και συμβάλλει στη ρύθμιση της ταυτότητας του αναπαραγωγικού μεριστώματος μέσω της ρύθμισης του γονιδίου *LFY*. Η πρωτεΐνη YEP3 (YHL0009C) της ζύμης που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την HSP90, είναι επίσης μεταγραφικός παράγοντας. Τα αποτελέσματα της ομολογίας παρουσιάζονται στην εικόνα 16.

AtSoc1	1		0
YEP3	1	MTPSNMDDNTSGFMKFINPQCQEEDCCIRNSLQFQEDSKCIKQQPDLLSEQ	
AtSoc1	1		0
YEP3	51	TAPFFILEDQC PALMLDRSNNDLLQNNISFPKGSDLQAIQLTPIISGDYS	100
AtSoc1	1		0
YEP3	101	TYVMADNNNDNDSYSNTNYFSKNGISPSRSRSPVAHNENVDDSKAKK	150
AtSoc1	1	MVRGKTQMKRIENATSRQVTF SKRRNGLLKKAFEL---S	36
YEP3	15	IKAQNRAAQKAFERKEARMKELQDKLLEE--SEFNRSLLKEIEELRKAN	198
AtSoc1	37	VLCDAEVSLIIFSPKGKLYEFASNMQDTIDRYLRHTKDRVSTKPVSEEN	86
YEP3	199	TEINAENRLLLRSGN---ENFSKDIEDDTNYKYSEFTKDEFFTSMVLESK	245
AtSoc1	87	MQHL-KYEAAAN--MMKKIEQLEASKRKLLEGIGTCSIEELQQIEQQLEK	133
YEP3	246	LNHGKGYSLKDNEIMKRNTQYTDAGRHLV---TVPATWEYLYKLSEERDF	292
AtSoc1	134	SV-----KCIRARKTQVFKEQIEQLKQEKALAAENEKISEKWS	173
YEP3	293	DVTYVMSKLGQECCHTHGPAYPRSLIDFLVEE----ATLNE*	331
AtSoc1	174	HESEVWSNKNQESTGRGDEESSPSSEVETQLFIGLPCSSRK	214
YEP3	332		

Εικόνα 16: Ευθυγράμμιση της πρωτεΐνης SOC1 (At2g45660) του *Arabidopsis thaliana* με την πρωτεΐνη YEP3 (YHL0009C) της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Η περιοχή πρόσδεσης της HSP90 στην YEP3 περιλαμβάνεται στο μπλε παραλληλόγραμμο. Η πρωτεΐνη SOC1 (αμινοξέα 1-167) ευθυγραμμίζεται σχεδόν εξολοκλήρου με την περιοχή πρόσδεσης της HSP90 και είναι κατά 60% ομόλογη με την αμινοξική περιοχή 162-331 της YEP3.

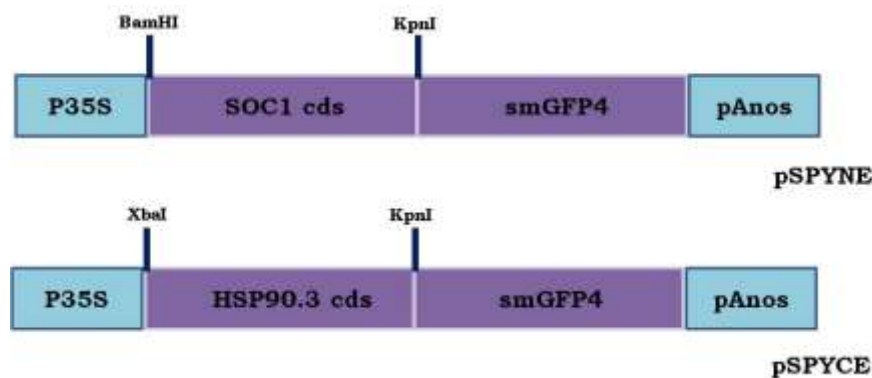
3.δ.2. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in planta*

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SOC1, επιλέχθηκε μια σειρά τεχνολογικών προσεγγίσεων οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν και να υποδεικνύουν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ένα ευρέως διαδεδομένο σύστημα ελέγχου αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε φυτικά κύτταρα (*in planta*) αποτελεί η προσέγγιση του Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) που είναι γνωστή και ως ‘Split YFP’.

Στο σύστημα αυτό στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι N- / C- τελικές υπομονάδες της πρωτεΐνης YFP (Yellow Fluorescence Protein) δεν αποτελούν από μόνες λειτουργικές πηγές φθορισμού. Ωστόσο, όταν αυτές συγχωνευθούν με πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τότε οι δύο μη φθορίζουσες υπομονάδες της

πρωτεΐνης (N-C-τελικές περιοχές) έρχονται σε στενή επαφή, αναδιπλώνονται μαζί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας στα 475nm του υπεριώδους μήκους κύματος, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκόπιο φθορισμού.

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε μεταξύ της HSP90.3 και της SOC1 πρωτεΐνης. Η HSP90.3 επιλέχτηκε γιατί κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας με τις υπόλοιπες κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες. Οι τελικές κατασκευές στους πλασμιδιακούς φορείς pSPYNE και pSPYCE παραθέτονται στην εικόνα 17.

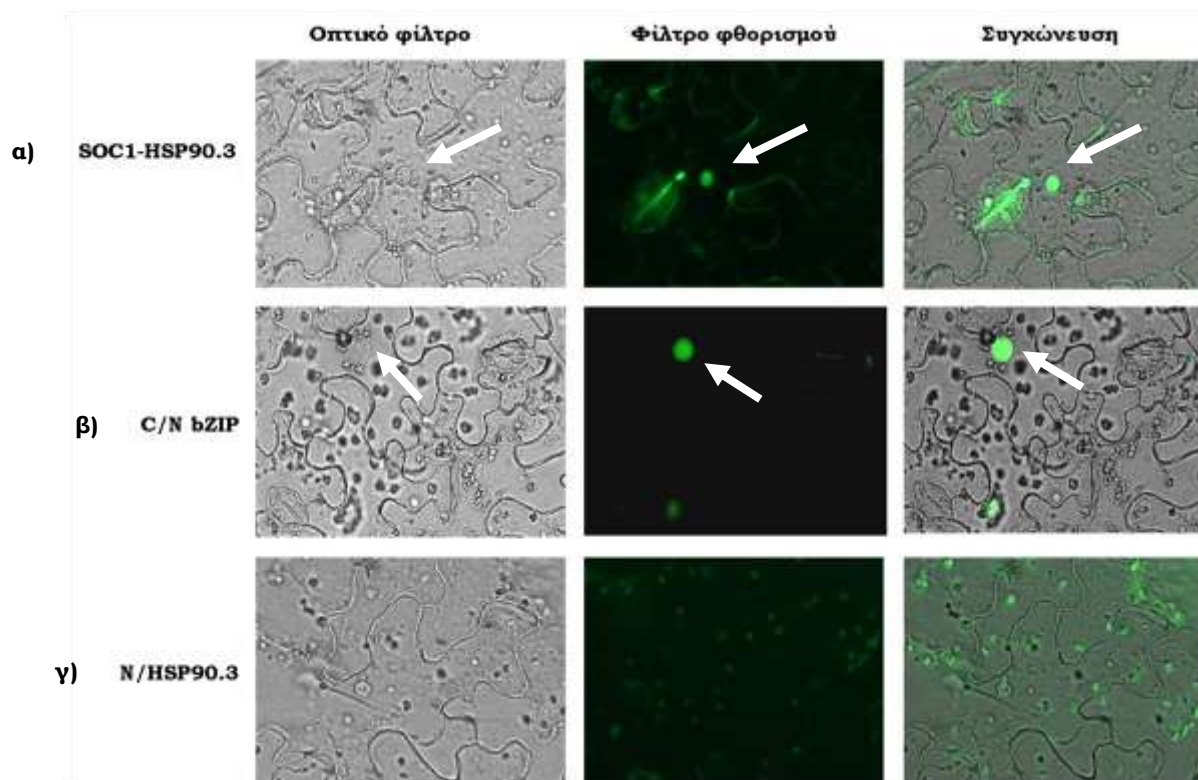


Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για το έλεγχο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών SOC1 και HSP90.3 με το σύστημα SPLIT-GFP. Η κάθε πρωτεΐνη κλωνοποιείται στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα σε μεταφραστική σύντηξη με την υπομονάδα

της GFP πρωτεΐνης που περιέχει ο φορέας. Οι κασέτες έκφρασης καθοδηγούνται από τον καθολικό προαγωγέα 35S. Στον φορέα pSPYNE είναι κλωνοποιημένη η αμινο-τελική υπομονάδα, ενώ στον pSPYCE είναι κλωνοποιημένη η καρβοξυ-τελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης.

Όταν τα φυτά καπνού αναπτύχθηκαν τόσο ώστε να έχουν παράγει 4-6 ζευγάρια πραγματικών φύλλων, πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασχηματισμός κάνοντας ένεση στην υποδερμίδα επιλεγμένων φύλλων με τους εξής συνδυασμούς κατασκευών (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι) : α) pSPYNE:SOC1/pSPYCE:HSP90.3/p19, β) pSPYNE:NbZIP/ pSPYCE:CbZIP/p19, γ) pSPYNE/pSPYCE:HSP90.3/p19. Εκτός από το συνδυασμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης, πραγματοποιήθηκαν ακόμη δυο μετασχηματισμοί, ένας για θετικό και ένας για αρνητικό έλεγχο. 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. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε ο άδειος πλασμιδιακός φορέας pSPYNE σε συνδυασμό με την pSPYCE:HSP90.3 πρωτεΐνη.

Μετά το πέρας 65 ωρών από τον εμβολιασμό των φύλλων καπνού, παρατηρήθηκε η υποδερμίδα των φύλλων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα αποτελέσματα της παρατήρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 18.

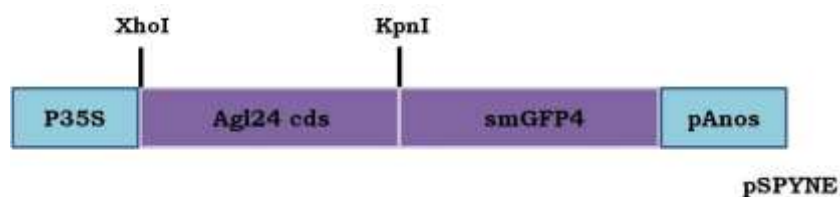


Εικόνα 18: HSP90.3-SOC1 αλληλεπίδραση. Φωτογραφίες υποδερμίδων φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τους εξής συνδυασμούς: α) pSPYNE:SOC1, pSPYCE:HSP90.3, p19, β) pSPYNE:NbZIP, pSPYCE:CbZIP, p19, γ) pSPYNE, pSPYCE:HSP90.3, p19. Τα φίλτρα του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι το οπτικό, για τις φωτογραφίες στο ορατό μήκος κύματος, και το φθορισμού, για τις φωτογραφίες στα 475nm. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν 65 ώρες μετά από το μετασχηματισμό των φύλλων. Τα άσπρα βέλη δείχνουν τους πυρήνες όπου ανιχνεύεται φθορισμός λόγω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Η αλληλεπίδραση θετικού ελέγχου λειτούργησε όπως ήταν αναμενόμενο και το αποτέλεσμα της ήταν η ανίχνευση φθορισμού στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού. Η χρήση κατασκευής αρνητικού ελέγχου επίσης λειτούργησε όπως αναμενόταν, καθώς δεν ανιχνεύθηκε φθορισμός στον πυρήνα των κυττάρων. Στην περίπτωση των φύλλων που παρατηρήθηκαν ανιχνεύτηκε μόνο αυτοφθορισμός προερχόμενος από τους χλωροπλάστες των κυττάρων. Όσον αφορά την παρατήρηση των φύλλων που μετασχηματίστηκαν με το συνδυασμό pSPYNE:SOC1, pSPYCE:HSP90.3 τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία σήματος φθορισμού στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού. Η SOC1 είναι πρωτεΐνη που τοποθετείται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων και στα ζώα έχει δείξει ότι η HSP90 εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να εκδηλώσει τη δράση της. Το γεγονός ότι ανιχνεύεται φθορισμός στον πυρήνα είναι ένδειξη ότι είτε οι πρωτεΐνες SOC1:N-smGFP και HSP90.3:C-smGFP παράγονται, εισέρχονται στον πυρήνα και αλληλεπιδρούν, φέρνοντας κοντά τις δυο υπομονάδες της GFP πρωτεΐνης και παράγοντας τη λειτουργική μορφή της που εκπέμπει ακτινοβολία στα 475nm, είτε αλληλεπιδρούν στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχονται στον πυρήνα όπου συσσωρεύεται το σήμα και ανιχνεύεται.

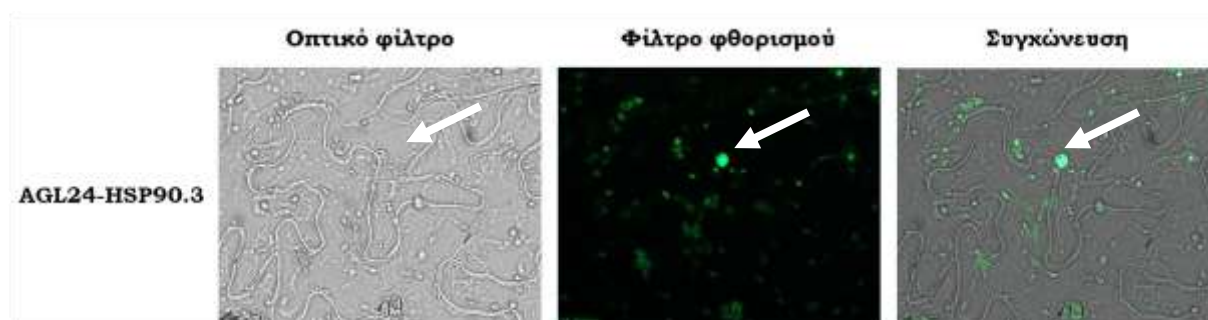
Σύμφωνα με μια πρόσφατη δημοσίευση των Lee et al (2008), η πρωτεΐνη Ag124 αλληλεπιδρά στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με την πρωτεΐνη SOC1 και στη συνέχεια μεταφέρονται μέσα στον πυρήνα προκειμένου να ενεργοποιηθεί το γονίδιο *LFY*. Με βάση το δεδομένο αυτό, επόμενο βήμα της μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αποτέλεσε η μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ της HSP90.3

και της AGL24 πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό η κωδική περιοχή της AGL24 πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pSPYNE σε μεταφραστική σύντηξη με την αμινο-τελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης για την κατασκευή της κασέτας έκφρασης (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής παροδικού μετασχηματισμού για το έλεγχο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Agl24 και HSP90.3 με το σύστημα SPLIT-GFP. Η πρωτεΐνη Agl24 κλωνοποιείται στον pSPYNE πλασμιδιακό φορέα σε μεταφραστική σύντηξη με την αμινο-τελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης.

Όπως και πριν, φυτά καπνού με 4-6 ζευγάρια πραγματικών φύλλων εμβολιάστηκαν με μίγμα αγροβακτηρίων που περιείχε τις εξής κατασκευές: pSPYNE:AGL24, pSPYCE:HSP90.3 και p19. Μετά τον εμβολιασμό, τα φυτά αφέθηκαν να ανακάμψουν και 65 ώρες μετά παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα της παρατήρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 20.



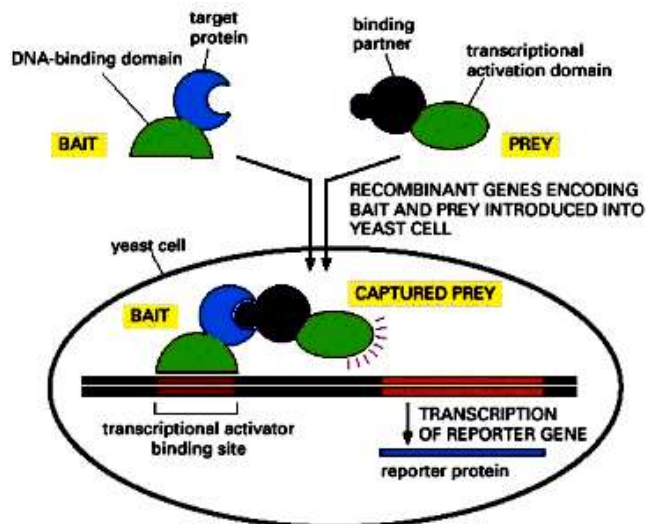
Εικόνα 20: HSP90.3-AGL24 αλληλεπίδραση. Φωτογραφίες μικροσκοπικής παρατήρησης υποδερμικών κυττάρων καπνού όπου έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με το συνδυασμό κατασκευών pSPYNE:AGL24, pSPYCE:HSP90.3 και p19. Τα φίλτρα του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι το οπτικό, για τις φωτογραφίες στο ορατό μήκος κύματος, και το φθορισμού, για τις φωτογραφίες στα 475nm. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν 65 ώρες μετά από το μετασχηματισμό των φύλλων. Τα άσπρα βέλη δείχνουν τον πυρήνα όπου ανιχνεύεται φθορισμός λόγω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα του μετασχηματισμού έδειξαν ότι στον πυρήνα των κυττάρων της υποδερμίδας του καπνού ανιχνεύεται φθορισμός υπό τη μορφή πράσινου σήματος. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι και η AGL24 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την HSP90.3 και η αλληλεπίδρασή τους τοποθετείται στον πυρήνα των κυττάρων. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στο μηχανισμό της άνθισης αφού αλληλεπιδρούν με δύο κομβικές πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στο σταυροδρόμι των σιγιάλων όλων των μονοπατιών της άνθισης. Γίνεται προφανές ότι ελλείψει των HSP90 πρωτεϊνών δεν είναι δυνατή η μεταγωγή των σιγιάλων για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της άνθισης, οπότε τα φυτά ως συνέπεια εμφανίζουν τόσο δραματικούς φαινότυπους.

3.6.3. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης *in planta*, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη HSP90.3 αλληλεπιδρά με δυο σημαντικές πρωτεΐνες της άνθισης, τη SOC1 και την AGL24. Βέβαια 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 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

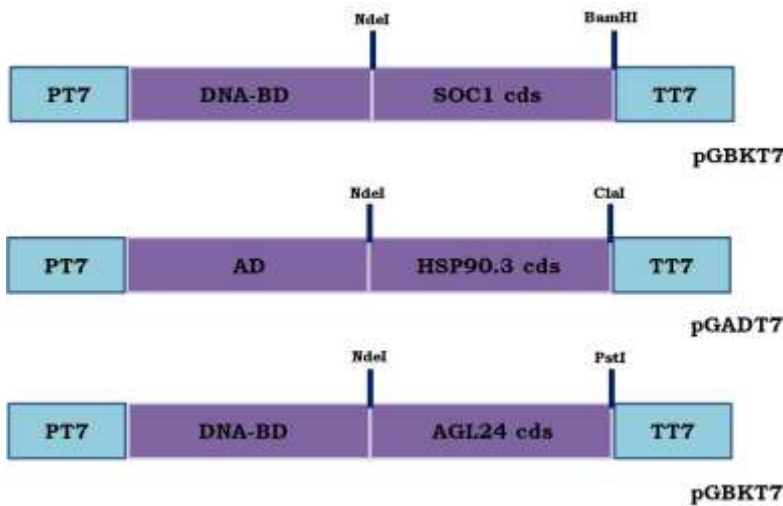
Στο σύστημα δυο υβριδίων χρησιμοποιούνται δυο πλασμιδιακοί φορείς. Ο ένας φορέας φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή της μεταγραφής και ο δεύτερος την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς με βάση το οποίο θα ελεγχτεί η αλληλεπίδραση. Σε κάθε φορέα κλωνοποιείται μια από τις δύο πρωτεΐνες που επιθυμείται να ελεγχτεί η αλληλεπίδρασή τους. Εφόσον οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, οι περιοχές πρόσδεσης στο DNA και ενεργοποίησης της μεταγραφής έρχονται κοντά, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς της Clontech pGBKT7, που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, και ο pGADT7, που φέρει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Το σχεδιάγραμμα ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς και λειτουργίας της μεθόδου παραθέεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος δυο υβριδίων στη ζύμη. Σε πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς αντίστοιχα, κλωνοποιούνται σε μεταφραστική σύντηξη οι πρωτεΐνες των οποίων επιθυμείται να ελεγχτεί η αλληλεπίδραση. Στη συνέχεια ακολουθεί μετασχηματισμός, ταυτόχρονα ή διαδοχικά, της ζύμης και με τους δυο πλασμιδιακούς φορείς. Εφόσον οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, έρχονται κοντά οι δύο ρυθμιστικές περιοχές και καθίσταται δυνατή η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς.

Για το σκοπό αυτό, η κωδική περιοχή της HSP90.3 πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7, ενώ οι πρωτεΐνες SOC1 και AGL24 κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7, σε μεταφραστική σύντηξη με την αντίστοιχη ρυθμιστική περιοχή του κάθε πλασμιδιακού φορέα (Εικόνα 22). Ακολούθησε διαδοχικός μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στελέχους SG335 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech. Οι συνδυασμοί των μετασχηματισμών που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης αλλά και για θετικό και αρνητικό έλεγχο ήταν οι εξής: α) pGBKT7/pGADT7:HSP90.3, β) pGBKT7:SOC1/pGADT7:HSP90.3, γ) pGBKT7:AGL24/pGADT7:HSP90.3, δ) pGBKT7:SOC1/pGADT7, ε) pGBKT7:AGL24/pGADT7, στ) pGBKT7:53/pGADT7:T.

Οι συνδυασμοί β) και γ) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης, οι συνδυασμοί α), δ) και ε) ως αρνητικοί έλεγχοι του πειράματος και ο συνδυασμός στ) ως θετικός έλεγχος του πειράματος.

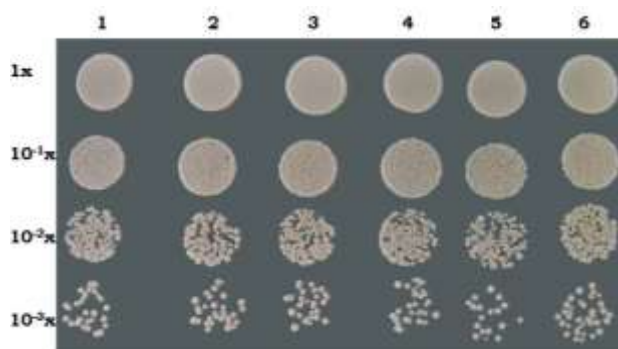


Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών μετασχηματισμού ζύμης για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών SOC1 και AGL24 με την HSP90.3 μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων. Η κάθε πρωτεΐνη κλωνοποιείται στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα σε μεταφραστική σύντηξη με την υπομονάδα του ενεργοποιητή του γονιδίου αναφοράς. DNA-BD: υπομονάδα πρόσδεσης στο DNA, AD: υπομονάδα ενεργοποίησης της μεταγραφής, PT7: T7 εκκινήτης, TT7: αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής.

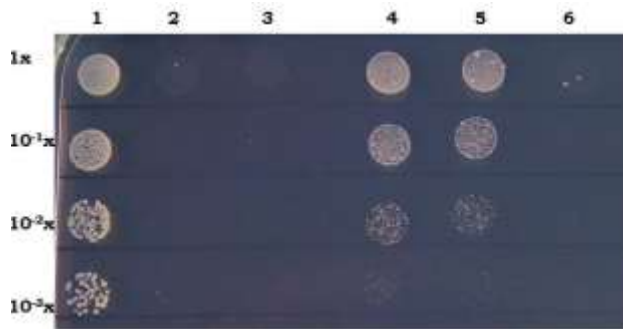
Τα γεγονότα του διπλού μετασχηματισμού ήταν αποικίες ζύμης που είχαν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο απουσία των αμινοξέων τρυπτοφάνη και λευκίνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναπτυσσόμενη ζύμη έχει μετασχηματιστεί και με τα δυο πλασμίδια. Από κάθε μετασχηματισμό επιλέχτηκαν κάποιες αποικίες που στρώθηκαν ξανά σε διπλή επιλογή και στη συνέχεια επιλέχτηκαν μια για κάθε μετασχηματισμό προκειμένου να γίνει ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης. Για τα κύτταρα SG335 ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται με ανάπτυξη των ζυμών σε θρεπτικό μέσο όπου απουσιάζουν τέσσερα αμινοξέα: τρυπτοφάνη, λευκίνη, ιστιδίνη και αδενίνη. Το γονίδιο αναφοράς που ενεργοποιείται όταν οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν είναι για την παραγωγή ιστιδίνης. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ζυμών στα κατάλληλα θρεπτικά μέσα παρουσιάζονται στις εικόνες 23α, 23β και 23γ.



Εικόνα 23α: Φωτογραφίες αποικιών επιλεγμένων μετασχηματισμένων SG335 κυτάρων ζύμης που αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής, δηλαδή χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη. 1: pGBKT7:53/pGADT7:T,0 2: pGBKT7:SOC1/pGADT7. 3: pGBKT7:AGL24/pGADT7, 4: pGBKT7:SOC1/pGADT7:HSP90.3, 5: pGBKT7:AGL24/pGADT7:HSP90.3, 6: pGBKT7/pGADT7:HSP90.3. Κάθε αποικία επιλέχτηκε από τον αρχικό μετασχηματισμό και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκε για ανάπτυξη σε διπλή επιλογή, χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη.



Εικόνα 23β: Φωτογραφίες αποικιών ζυμών που επιλέχτηκαν από κάθε μετασχηματισμό SG335 κυτάρων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο YPDA, που περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα ανάπτυξης της ζύμης. Οι αποικίες διαλύθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο YPD, ισοποσοτικοποιήθηκαν και στη συνέχεια στρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο YPDA πραγματοποιώντας μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων. Ξεκινώντας από πυκνή καλλιέργεια, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις σε 10^{-1} , 10^{-2} , και 10^{-3} . 1:pGBKT7:53/pGADT7:T,2:pGBKT7:AGL24/pGADT7,3:pGBKT7:SOC1/pGADT7,4:pGBKT7:SOC1/pGADT7:HSP90.3,5:pGBKT7:AGL24/pGADT7:HSP90.3και6:pGBKT7/pGADT7:HSP90.3. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν μετά από 5 μέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.



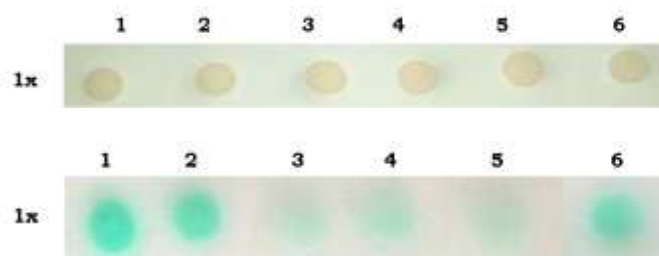
Εικόνα 23γ: Φωτογραφία αποικιών επιλεγμένων ζυμών που αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο τριπλής επιλογής. Από το υπόστρωμα απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη, που επιλέχτηκαν από κάθε μετασχηματισμό SG335 κυττάρων. Οι αποικίες διαλύθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο YPD, ισοποσοτικοποιήθηκαν και στη συνέχεια στρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο YPDA πραγματοποιώντας μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων. Ξεκινώντας από

πυκνή καλλιέργεια, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις σε 10^{-1} , 10^{-2} , και 10^{-3} . 1: pGBKT7:53/pGADT7:T. 2: pGBKT7:AGL24/pGADT7, 3: pGBKT7:SOC1/pGADT7, 4: pGBKT7:SOC1/pGADT7:HSP90.3, 5: pGBKT7:AGL24/pGADT7:HSP90.3 και 6: pGBKT7/pGADT7:HSP90.3. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν μετά από 11 μέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C .

Τα αποτελέσματα του πειράματος με το σύστημα των δύο υβριδίων επιβεβαιώνουν ότι η HSP90.3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τη SOC1 και με την AGL24 πρωτεΐνη. Στην εικόνα 23γ παρατηρείται ότι σε θρεπτικό μέσο όπου απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη, τα δείγματα 4 και 5, που αντιπροσωπεύουν τους μετασχηματισμούς των συνδυασμών pGBKT7:SOC1/pGADT7:HSP90.3 και pGBKT7:AGL24/pGADT7:HSP90.3 αντίστοιχα, είναι τα μόνα που έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν στην τριπλή επιλογή λόγω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει στο δείγμα 1 που αντιπροσωπεύει το θετικό έλεγχο.

Επιπλέον, οι ίδιες πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν και για το μετασχηματισμό ενός διαφορετικού στελέχους ζύμης, το Y187. Στο στέλεχος αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών μέσω του μεταβολισμού του X-a-gal που αποτελεί υπόστρωμα για την α-γαλακτοσιδάση. Η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς *GAL-4* το οποίο καταβολίζει το X-a-gal που περιέχεται στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το προϊόν καταβολισμού του X-a-gal είναι η παραγωγή μπλε χρώματος, που υποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη αποικία μετασχηματισμένης ζύμης.

Επιλέχτηκαν στη συνέχεια αποικίες από κάθε μετασχηματισμό οι οποίες αναπτύχθηκαν σε δυο θρεπτικά μέσα. Στο μεν θρεπτικό μέσο επιλογής απουσίαζαν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη, ενώ στο δε απουσίαζαν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη αλλά είχε επιστρωθεί με 10μl X-a-gal (20mg/ml). Τα αποτελέσματα της επιλογής παρουσιάζονται στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: Φωτογραφία επιλεγμένων αποικιών ζυμών που αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο SD με έλλειψη των αμινοξέων λευκίνη και τρυπτοφάνη. α) Επιλεγμένες αποικίες μετασχηματισμένων ζυμών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο SD με έλλειψη των αμινοξέων λευκίνη και τρυπτοφάνη. β) Οι ίδιες επιλεγμένες αποικίες αναπτύσσονται στο παραπάνω

θρεπτικό μέσο που περιέχει και x-a-gal. Οι αποικίες διαλύθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο YPD, ισοποσοτικοποιήθηκαν και στη συνέχεια επιστρώθηκαν στο θρεπτικό μέσο σχηματίζοντας σταγόνα των 10μl. 1: pGBKT7:53/pGADT7:T, 2: pGBKT7:SOC1/pGADT7:HSP90.3, 3: pGBKT7:SOC1/pGADT7, 4: pGBKT7:AGL24/pGADT7, 5: pGBKT7/pGADT7:HSP90.3 και 6: pGBKT7:AGL24/pGADT7:HSP90.3. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν μετά από 11 μέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C .

Ανακεφαλαιώνοντας, όλες οι τεχνολογικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν υποδεικνύουν ότι η HSP90.3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά τόσο *in planta* όσο και *in vivo* με τις SOC1 και AGL24 πρωτεΐνες. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές υπογραμμίζουν τον εξέχοντα ρόλο που διαδραματίζουν οι HSP90 πρωτεΐνες στον έλεγχο της μεταγωγής των μηνυμάτων της άνθισης.

3.ε. Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες, υπάρχει μια μεγάλη διαφορά μεταξύ των αρχικών *LFY::HSP90RNAi* μετασχηματισμένων φυτών της T1 γενιάς και των T2 και T3 γενεών: τα φυτά των T2 και T3 γενεών ανθίζουν κανονικά σε φυσιολογικές συνθήκες χωρίς την εφαρμογή κανενός εξωτερικού βοηθητικού παράγοντα.

Η εφαρμογή ισχυρών εξωτερικών καταπονήσεων στους οργανισμούς μπορεί να προκαλέσει τροποποιήσεις στην αλληλουχία του DNA των οργανισμών, χωρίς όμως να συμβεί καμία αλλαγή στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Οι τροποποιήσεις αυτές εισέρχονται υπό τη μορφή μεθυλομάδων σε κατάλοιπα κυτοσίνης και τροποποιούν την κατάσταση του μεθυλώματος του οργανισμού. Τροποποίηση του μεθυλώματος ενός οργανισμού σημαίνει ότι α) διαφοροποιείται η έκφραση γονιδίων, δηλαδή γονίδια εκφράζονται ή αποσιωπούνται όταν θα έπρεπε να συμβαίνει το αντίθετο, και β) ολόκληρες περιοχές διαφοροποιούνται ως προς την ικανότητά τους να είναι ενεργές ή όχι, μεταγραφικά.

Σε όλα τα ευκαρυωτικά γενώματα, είναι γνωστό ότι η μεθυλίωση παρατηρείται σε κατάλοιπα κυτοσίνης και συνήθως λαμβάνει χώρα σε επαναλαμβανόμενες ακολουθίες σε ποσοστό μεγαλύτερο από ότι εντοπίζεται στο υπόλοιπο γονιδίωμα. Η μεθυλίωση των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών μπορεί να καταστείλλει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των ακολουθιών αυτών σε διάφορες θέσεις του γενώματος, το οποίο, αν συνέβαινε, θα οδηγούσε σε μετατοπίσεις και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Η μεθυλίωση μπορεί επίσης να προκαλέσει απώλεια της RNA πολυμεράσης II εξαρτώμενης μεταγραφής των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, όπως συμβαίνει με τα μεταθετά στοιχεία, είτε προλαμβάνοντας την έναρξη της μεταγραφής είτε εμποδίζοντας την συνέχισή της. Πολλές έρευνες δείχνουν τη σχέση μεταξύ της μεθυλίωσης προαγωγών γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και της απενεργοποίησης των γονιδίων αυτών. Αντιθέτως, ο ρόλος της μεθυλίωσης στην μεταγραφή γονιδίων που καθοδηγείται από τις RNA πολυμεράσες I και III είναι ελάχιστα κατανοητός. Εντούτοις, τα γονίδια των 5S rRNA, των tRNA και των SINE μεταθετών στοιχείων μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III. Γενικεύοντας, μπορεί να ειπωθεί ότι η αύξηση της μεθυλίωσης αναστέλλει τη μεταγραφή που πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση III, με την ύπαρξη βέβαια και εξαιρέσεων (Mathieu et al., 2002).

Ο οικότυπος Col-0 του *Arabidopsis thaliana* έχει βρεθεί ότι περιέχει περίπου 1000 αντίγραφα των 5S rRNA γονιδίων ανά απλοειδές γένωμα. Τα αντίγραφα αυτά οργανώνονται σε κατά σειρά επαναλήψεις που τοποθετούνται στην περικεντρομερική ετεροχρωματινή στα χρωμοσώματα 3, 4 και 5. Κάθε 5S rRNA επανάληψη αποτελείται από μια μεταγραφόμενη περιοχή 120bp και μια περίπου 380bp μη μεταγραφόμενη περιοχή (Cloix et al., 2001). Τα γονίδια αυτά είναι μεθυλωμένα σε ποσοστό περίπου 79%. Το ποσοστό αυτό είναι πολύ υψηλό σε σχέση με τα χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης του γενώματος του *Arabidopsis*, που είναι 6.3%. Παρόλα τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης, τα γονίδια είναι ενεργά, χωρίς να επηρεάζεται η μεταγραφή τους από την RNA πολυμεράση III (Mathieu et al, 2002).

Το κεντρομερές των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων είναι μια σημαντική δομή για τον ακριβή διαχωρισμό των αδερφών χρωματιδών κατά τη διάρκεια των μιτωτικών και μειωτικών κυτταρικών διαιρέσεων. Στο *Arabidopsis*, οι κεντρομερικές περιοχές και των πέντε χρωμοσωμάτων αποτελούνται από επαναλήψεις μιας ακολουθίας 180bp (Shibata και Murata, 2004). Η κεντρομερική αλληλουχία των 182bp αποτελεί την βασική μονάδα που επαναλαμβάνεται χιλιάδες φορές προκειμένου να σχηματιστεί η περιοχή του κεντρομερούς των χρωμοσωμάτων. Είναι ανενεργή, ετεροχρωματινική περιοχή και πλήρως μεθυλιώμενη ώστε να βρίσκεται συνεχώς σε καταστολή. Η καταστολή αυτή είναι απαραίτητη για την αποσιώπηση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, όπως τα μεταθετά στοιχεία, που μπορεί να βλάψουν την κανονική λειτουργία των γονιδίων ενός οργανισμού. Αλλαγή στο μεθυλίωμα, δηλαδή στην κατάσταση μεθυλίωσης, ενός οργανισμού μπορεί να αλλάξει την κατάσταση μεθυλίωσης του κεντρομερούς. Για το λόγο αυτό η κεντρομερική αλληλουχία αποτελεί δείκτη της κατάστασης του μεθυλιώματος.

Οι ακολουθίες τόσο του 5S rRNA όσο και της κεντρομερικής ακολουθίας χρησιμοποιούνται ως δείκτες μεθυλίωσης των γενωμάτων τόσο στο *Arabidopsis* όσο και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Λόγω των πολλαπλών επαναλήψεων και των πλούσιων CG (κυτοσίνης-γουανίνης) περιοχών που περιέχουν, οι ακολουθίες αυτές είναι μεθυλιωμένες σε φυσιολογικές συνθήκες. Σε φυτά *Arabidopsis*, των οποίων έχει τροποποιηθεί το γένωμα, παρατηρείται αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης των περιοχών αυτών.

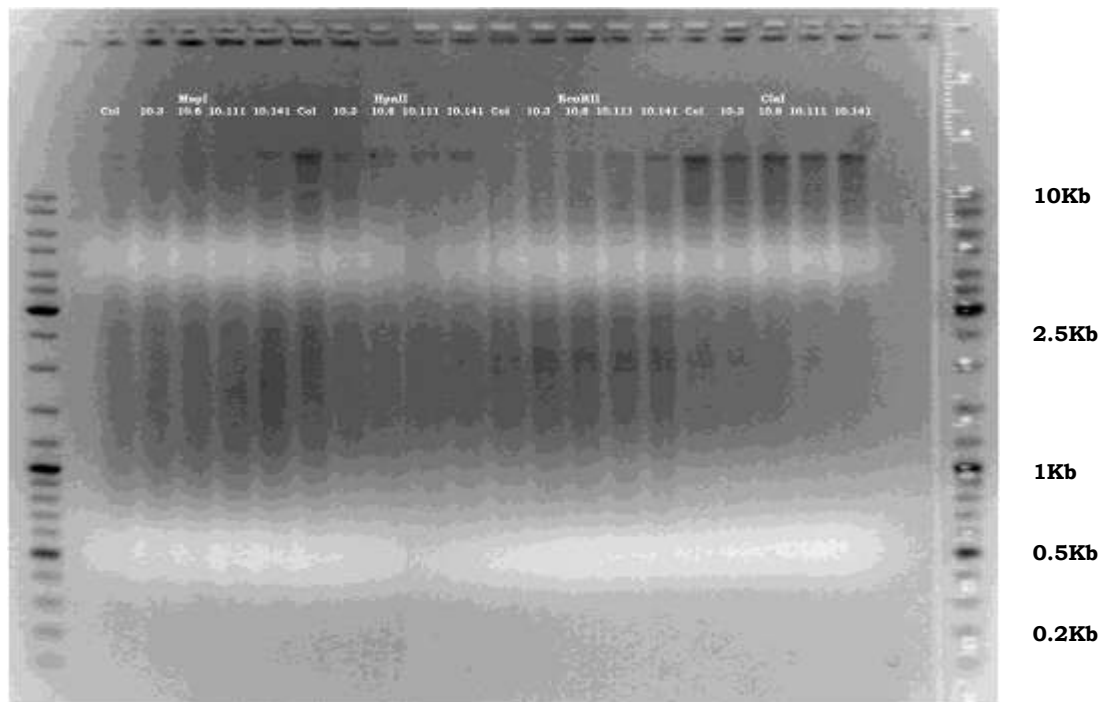
Για τη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την ενίσχυση των ακολουθιών της 5S rRNA και της κεντρομερικής (CEN) ακολουθίας (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι; Vaillant et al., 2006) που θα χρησιμοποιηθούν σαν ανιχνευτές, αντίστοιχα.

3.ε.1. Αποτελέσματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων κατά Southern

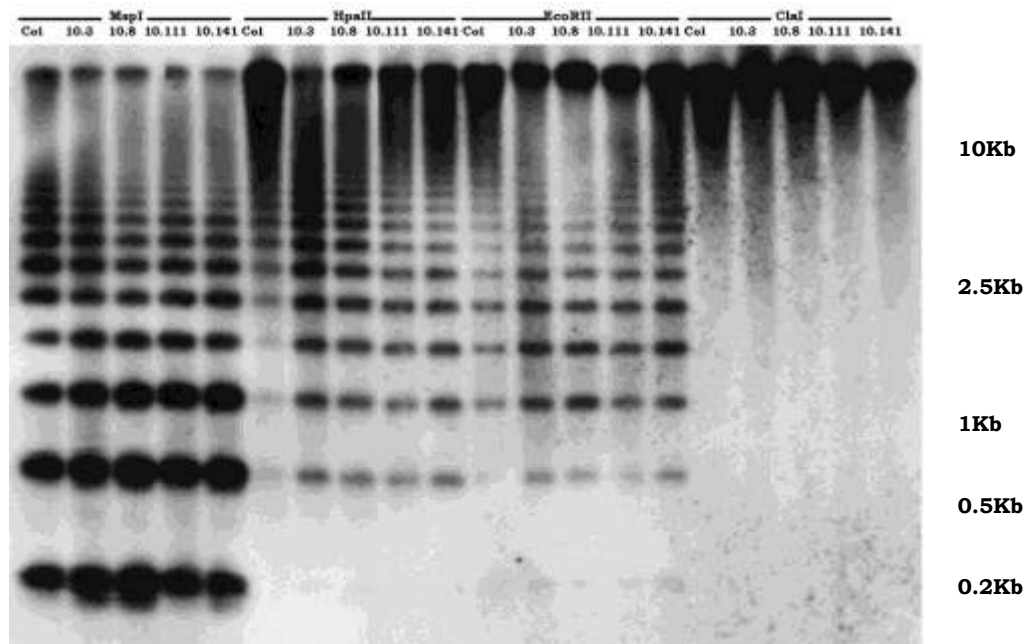
Τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά T3 γενιάς που επιλέχθηκαν για την ανάλυση κατά Southern ήταν τα 10.3, 10.8, 10.111 και 10.141. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου *Arabidopsis* για σύγκριση. Αρχικά απομονώθηκε γενωματικό DNA από τα αναπαραγωγικά μέρη των φυτών (βλαστός, φύλλα βλαστού, άνθη) από κάθε ομάδα δειγμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις γενωματικού DNA από όλα τα δείγματα με τα ένζυμα περιορισμού MspI, HpaII, EcoRII και ClaI απότο καθένα σε ξεχωριστή αντίδραση. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι ευαίσθητα στην μεθυλίωση δηλαδή έχουν τη δυνατότητα να πέσουν ή όχι την ακολουθία-στόχο που αναγνωρίζουν ανάλογα με το αν είναι μεθυλιωμένη ή όχι. Οι πέψεις αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (εικόνες 26α και 27α) και τα Southern αποτυπώματα που προέκυψαν υβριδοποιήθηκαν με τους ανιχνευτές 5S rRNA και CEN, που σημάνθηκαν με DIG-11-dUTP, στους 65°C. Τα πρότυπα υβριδισμού είναι ορατά στην εικόνα 26β και 27β, αντίστοιχα.

Στις πέψεις με το ένζυμο περιορισμού MspI όλα τα δείγματα που υβριδοποιήθηκαν με τον 5S ανιχνευτή παρουσίασαν το ίδιο πρότυπο, τόσο τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά μεταξύ τους όσο και σε σχέση με τον άγριο τύπο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο τύπος mCNG μεθυλίωσης δεν έχει τροποποιηθεί στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά. Στη δεύτερη ομάδα δειγμάτων, που περιλαμβάνουν τις πέψεις με το ένζυμο περιορισμού HpaII, παρατηρείται ότι υπάρχει διαφορετικό πρότυπο μεταξύ του αγρίου τύπου και των *LFY::HSP90RNAi* φυτών. Η ένταση των ζωνών αυξάνεται στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά, γεγονός που σημαίνει ότι το ένζυμο περιορισμού HpaII έχει βελτιωμένη ικανότητα στο να κόβει τα 5S γονίδια. Αυτό υποδεικνύει ελάττωση των επιπέδων μεθυλίωσης του 5S rRNA στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά σε σχέση

με τον άγριο τύπο. Ενώ στον άγριο τύπο που αντιπροσωπεύεται από το δείγμα Col-O, παρατηρείται μια συσσώρευση του σήματος υβριδισμού προς τα μεγαλύτερα μοριακά βάρη λόγω της ύπαρξης mCG μεθυλίωσης στο *Arabidopsis*, στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά το σήμα εμφανίζεται και σε χαμηλότερα μοριακά βάρη. Παρόμοιο πρότυπο παρατηρείται και στην επόμενη ομάδα πέψεων με το ένζυμο περιορισμού EcoRII. Πάλι στο δείγμα Col-O το σήμα υβριδισμού συσσωρεύεται προς τα μεγαλύτερα μοριακά βάρη λόγω της ύπαρξης Dcm μεθυλίωσης στο *Arabidopsis*, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα το σήμα ανιχνεύεται με μεγαλύτερη ένταση και στα μικρότερα μοριακά βάρη.



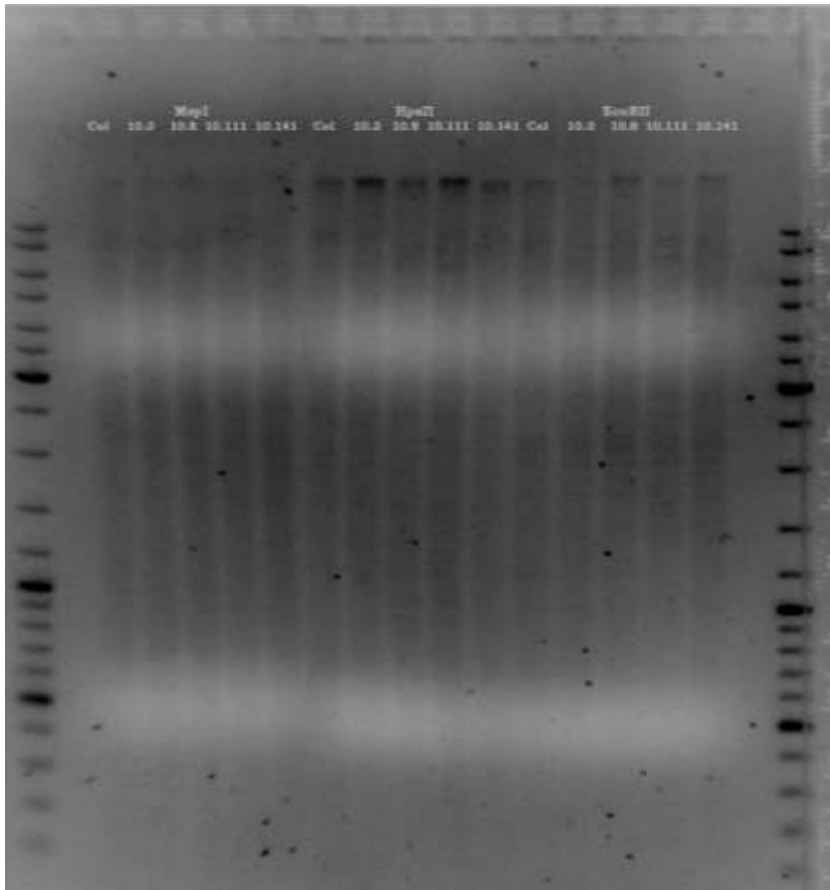
Εικόνα 26α: Ανάλυση σε τηκτική αгарόζης 0.8% των προϊόντων των πέψεων γενωμικού DNA (200ng/στήλη) απομονωμένων από *LFY::HSP90RNAi* φυτά και από φυτά *Arabidopsis* άγριου τύπου. Η κάθε απομόνωση υπεβλήθη σε τέσσερις πέψεις με ένζυμο περιορισμού ευαίσθητα στη μεθυλίωση ή μη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.3, 10.8, 10.111, 10.141 T3 γενιάς για τις *LFY::HSP90RNAi* σειρές και Col-O για τον άγριο τύπο. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα MspI, HpaII, EcoRII και ClaI.



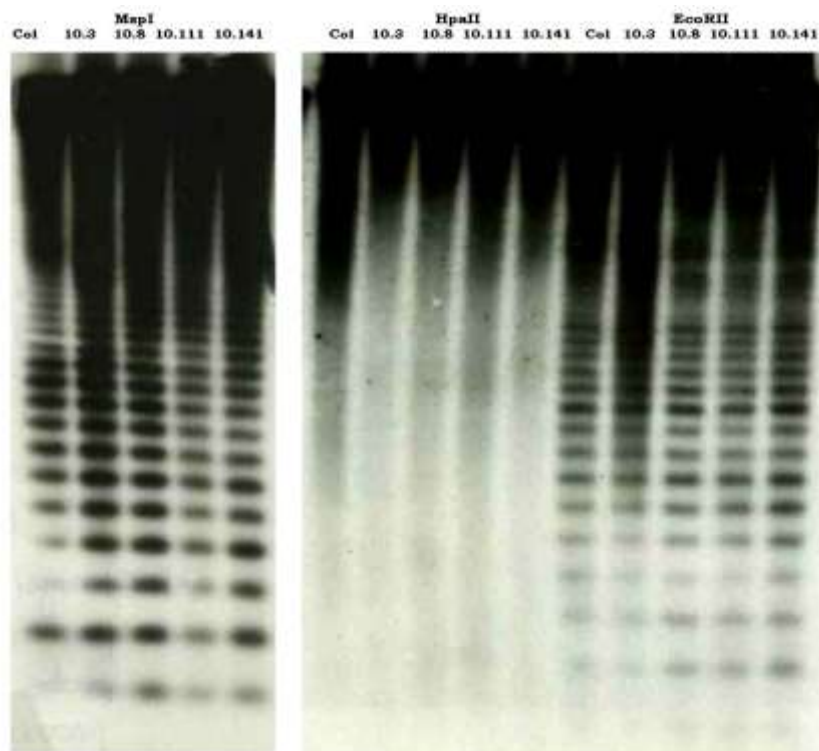
Εικόνα 26β: Αυτοραδιογραφία που υποδεικνύει το πρότυπο υβριδισμού που προέκυψε μετά από υβριδοποίηση του αποτυπώματος με τον ανιχνευτή 5S rRNA. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.3, 10.8, 10.111, 10.141 T3 γενιάς για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col-O για τον άγριο τύπο.

Όσον αφορά την ομάδα δειγμάτων του ενζύμου ClaI, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ του αγρίου τύπου και των μετασχηματισμένων σειρών και ότι σε όλα τα δείγματα το σήμα ανιχνεύεται πολύ ψηλά σε μοριακά βάρη πάνω από τις 5000bp περίπου.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το πρότυπο μεθυλίωσης mCNG των *LFY::HSP90RNAi* φυτών σε σχέση με τον άγριο τύπο δεν έχει επηρεαστεί. Σε όλα τα δείγματα και στον άγριο τύπο το ένζυμο περιορισμού MspI πέπτει με το ίδιο πρότυπο τις ακολουθίες του 5S rRNA γεγονός που δηλώνει ότι δεν ανιχνεύεται μεταβολή του ποσοστού μεθυλίωσης τύπου mCNG. Αντίθετα, το πρότυπο μεθυλίωσης mCG των *LFY::HSP90RNAi* φυτών σε σχέση με τον άγριο τύπο έχει επηρεαστεί. Ενώ στον άγριο τύπο το ένζυμο περιορισμού HpaII φαίνεται να πέπτει σε μικρό ποσοστό τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του 5S rRNA, γεγονός που είναι φυσιολογικό, στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά το πρότυπο μεθυλίωσης εμφανίζεται αρκετά διαφοροποιημένο. Στα δείγματα αυτά προφανώς το ποσοστό μεθυλίωσης είναι μειωμένο αφού το HpaII αναγνωρίζει και πέπτει πολύ περισσότερες αλληλουχίες και καταστά δυνατή την εμφάνιση της μικρότερης υπομονάδας των 200bp που μπορεί να πέψει το ένζυμο, ενώ δεν εμφανίζεται στον άγριο τύπο. Το ίδιο ισχύει και για τη μεθυλίωση τύπου Dcm στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά. Φαίνεται ότι τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα επίπεδα Dcm μεθυλίωσης αφού και εδώ το ένζυμο περιορισμού EcoRII αναγνωρίζει και πέπτει πολύ περισσότερες θέσεις και καταστά δυνατή επίσης την εμφάνιση της μικρότερης υπομονάδας των 200bp που μπορεί να πέψει, χωρίς να εμφανίζεται στον άγριο τύπο. Όσον αφορά το ένζυμο ClaI, τα επίπεδα της Dam μεθυλίωσης βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα χωρίς καμία διαφορά από τον άγριο τύπο.



Εικόνα 27α: Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 0.8% των προϊόντων των πέψωνγενωματικώνDNA (200ng/στήλη) απομονωμένων από *LFY::HSP90RNAi* φυτά και τον άγριο τύπο. Η κάθε απομόνωση υπεβλήθει σε τρεις πέψεις με ένζυμα περιορισμού ευαίσθητα στη μεθυλίωση ή μη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.3, 10.8, 10.111, 10.141 T3 γενιάς για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col-O για τον άγριο τύπο. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα MspI, HpaII και EcoRII.

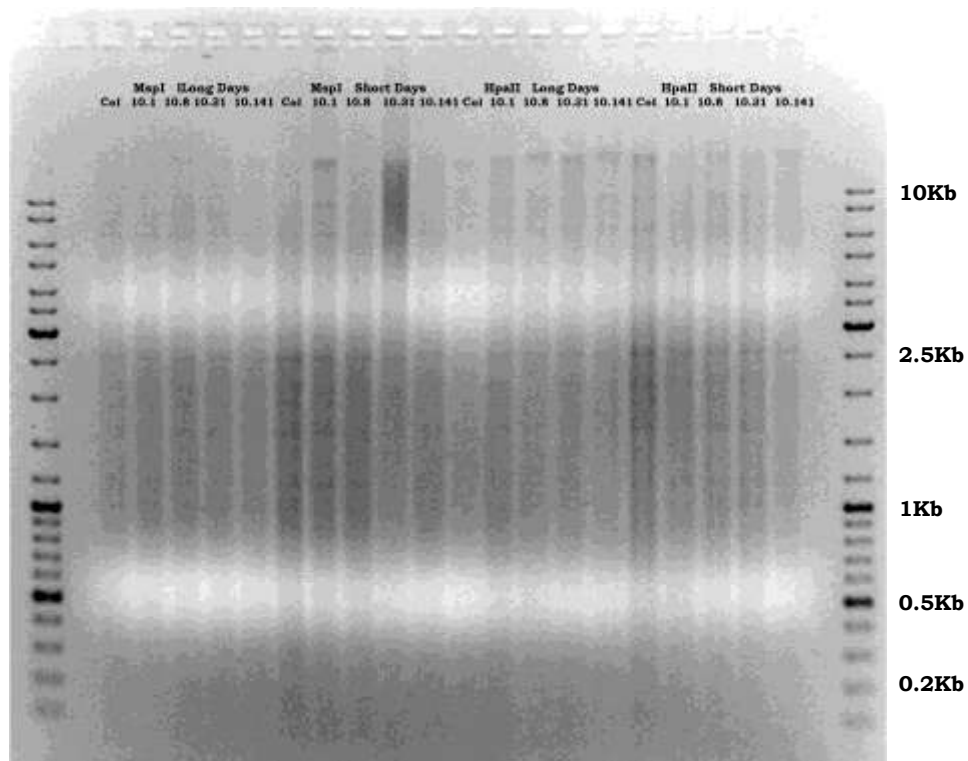


Εικόνα 27β: Φωτογραφικό φιλμ όπου έχουν αποτυπωθεί τα αποτελέσματα υβριδισμού κατά Southern των απομονωμένων γενωματικών DNAs, των *LFY::HSP90RNAi* σειρών και του άγριου τύπου Col-O, με τον ανιχνευτή CEN. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.3, 10.8, 10.111, 10.141 T3 γενιάς για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col-O για τον άγριο τύπο. Η έκθεση της πλαστικής μεμβράνης υβριδισμού στο φωτογραφικό φιλμ

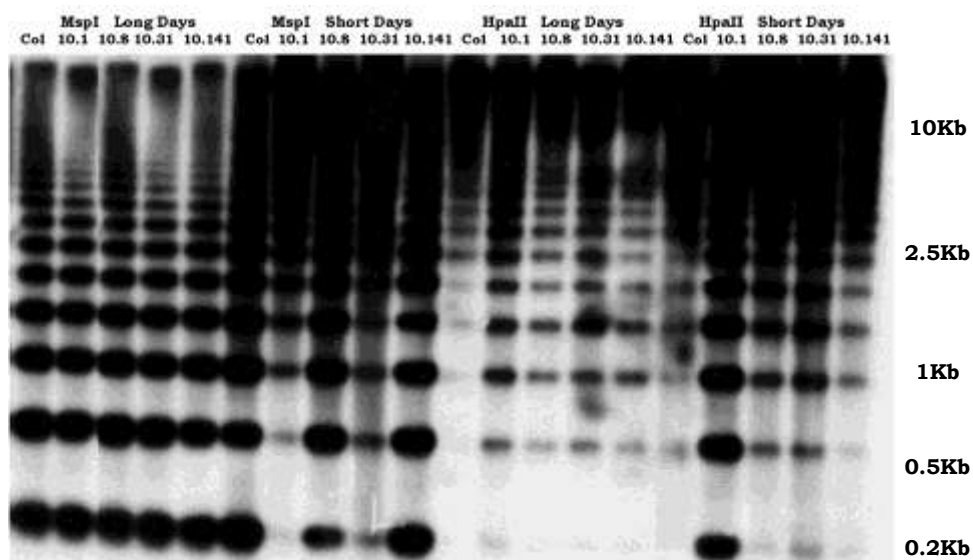
διήρκεσε 20 λεπτά και στη συνέχεια έγινε εμφάνιση του φιλμ σύμφωνα με πρότυπη τεχνική αυτοραδιογραφίας.

Η χρήση του ανιχνευτή CEN για την κεντρομερική περιοχή των 182bp εμφάνισε διαφορετικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τον 5S rRNA ανιχνευτή. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν τα MspI, HpaII και EcoRII. Και οι τρεις ομάδες των πέψων έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Τόσο στον άγριο τύπο όσο και στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στο πρότυπο μεθυλίωσης με το συγκεκριμένο ανιχνευτή, γεγονός που δηλώνει ότι τα καθολικά πρότυπα μεθυλίωσης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών δεν έχουν αλλάξει. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης του προτύπου έκφρασης των μεθυλοτρανσφερασών γονιδίων στα ανθικά μεριστώματα. Η κανονική έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της μεθυλίωσης μέσα στον οργανισμό και το σταθερό πρότυπο της μεθυλίωσης της κεντρομερικής περιοχής συνάδει στο γεγονός ότι δεν έχουν συμβεί γενικευμένες αλλαγές στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά που να επηρεάζουν τον οργανισμό στο σύνολό του. Από την άλλη, η αλλαγή στο πρότυπο μεθυλίωσης του 5S rRNA δηλώνει ότι πιθανώς να έχουν εγκατασταθεί επιγενετικές αλλαγές οι οποίες έχουν στοχευμένη τοποθέτηση.

Τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής δείχνουν ότι σε συνθήκες μεγάλης ημέρας τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης. Δηλαδή, μέσα στο γένωμα των φυτών υπάρχουν περισσότερες ενεργοποιημένες περιοχές από ότι στον άγριο τύπο. Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη των προτύπων μεθυλίωσης των φυτών σε συνθήκες μικρής ημέρας. Όπως παρατηρήθηκε στις μετρήσεις της άνθισης, τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά ανταποκρίνονται διαφορετικά σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η κατάσταση του μεθυλιώματος των φυτών και στις δυο συνθήκες, με τους ίδιους ανιχνευτές για να διαπιστωθεί αν οι διαφορές στην ικανότητα της άνθισης συνδέονται με αλλαγές στην κατάσταση των μεθυλιώματος. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εμφανίζονται στις εικόνες 28α, 28β, 29α και 29β.



Εικόνα 28α: Ανάλυση σε πηκτική αгарόζης 0.8% των προϊόντων των πέψεων γενωματικών DNA (200ng/στήλη) απομονωμένων από *LFY::HSP90RNAi* φυτά και τον άγριο τύπο, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας. Η κάθε απομόνωση υποβλήθηκε σε δυο πέψεις με ένζυμα περιορισμού ευαίσθητα στη μεθυλίωση ή μη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.1, 10.8, 10.31, 10.141 T3 γενιάς για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col-O για τον άγριο τύπο. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *MspI* και *HpaII*.



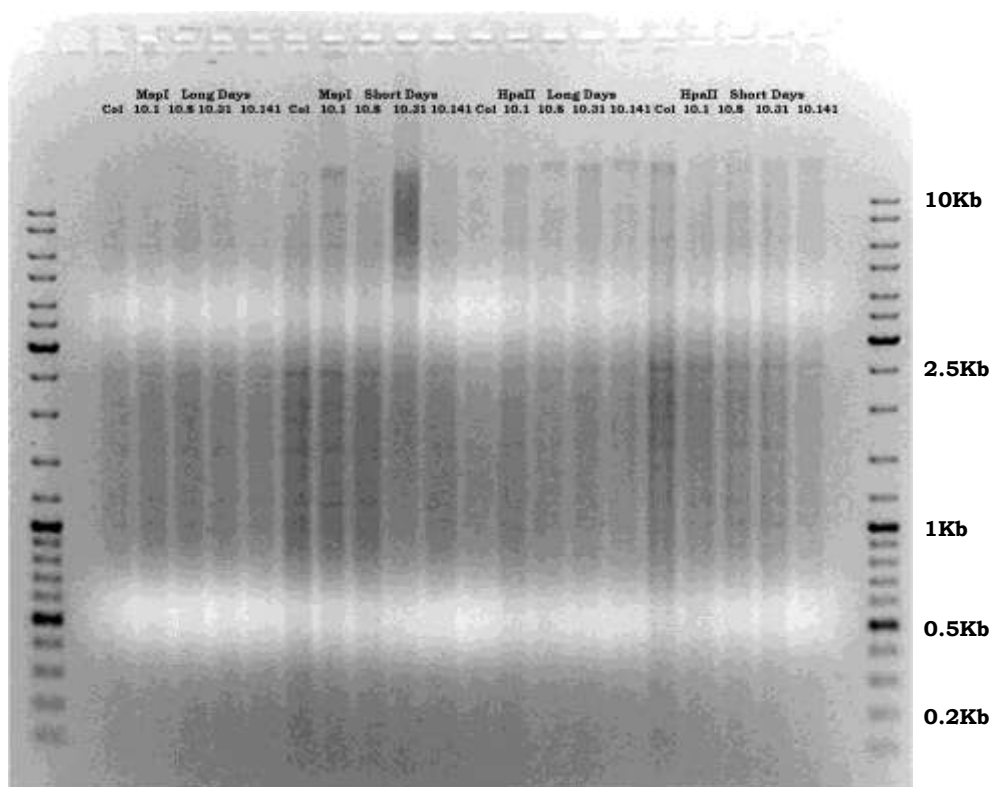
Εικόνα 28β: Εικόνα φωτογραφικού φιλμ στο οποίο έχουν αποτυπωθεί τα αποτελέσματα υβριδισμού κατά Southern των απομονωμένων γενωματικών DNAs, των *LFY::HSP90RNAi* σειρών και του άγριου τύπου Col-O που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας, με τον ανιχνευτή 5S rRNA. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.1, 10.8, 10.31, 10.141 T3 γενιάς για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col-O για τον άγριο τύπο. Η έκθεση της πλαστικής μεμβράνης υβριδισμού στο φωτογραφικό φιλμ διήρκεσε 20 λεπτά και στη συνέχεια έγινε εμφάνιση του φιλμ σύμφωνα με πρότυπη τεχνική αυτοραδιογραφίας.

Η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού των γενωματικών DNAs που απομονώθηκαν από φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας και υβριδίστηκαν με τον ανιχνευτή 5S rRNA εμφάνισε τα παρακάτω αποτελέσματα. Οι αντιδράσεις πέψεων των δειγμάτων μεγάλης ημέρας 10.1, 10.8, 10.31, 10.141 και Col-O με το ένζυμο περιορισμού *MspI* δεν έδειξε διαφορές στο πρότυπο μεθυλίωσης τόσο μεταξύ των δειγμάτων των *LFY::HSP90RNAi* φυτών όσο και μεταξύ των φυτών και τον άγριο τύπο, όπως ακριβώς και στην προηγούμενη ανάλυση κατά Southern με τον ίδιο ανιχνευτή (Εικόνα 28β). Διαφορετικά ήταν τα αποτελέσματα της ανίχνευσης του σήματος στις συνθήκες μικρής ημέρας. Τα δείγματα Col, 10.8 και 10.141 εμφάνισαν παρόμοιο πρότυπο μεθυλίωσης στην πέψη με το *MspI* το οποίο ακολουθεί το πρότυπο που παρατηρήθηκε στις συνθήκες μεγάλης ημέρας (Εικόνα 28β). Στα δείγματα 10.1 και 10.31 το σήμα υβριδισμού ανιχνεύεται με πολύ μικρότερη ένταση στα μικρά μοριακά βάρη και φαίνεται να συσσωρεύεται στα μεγαλύτερα μοριακά βάρη, γεγονός που δηλώνει ότι τα δείγματα παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης τύπου mCNG.

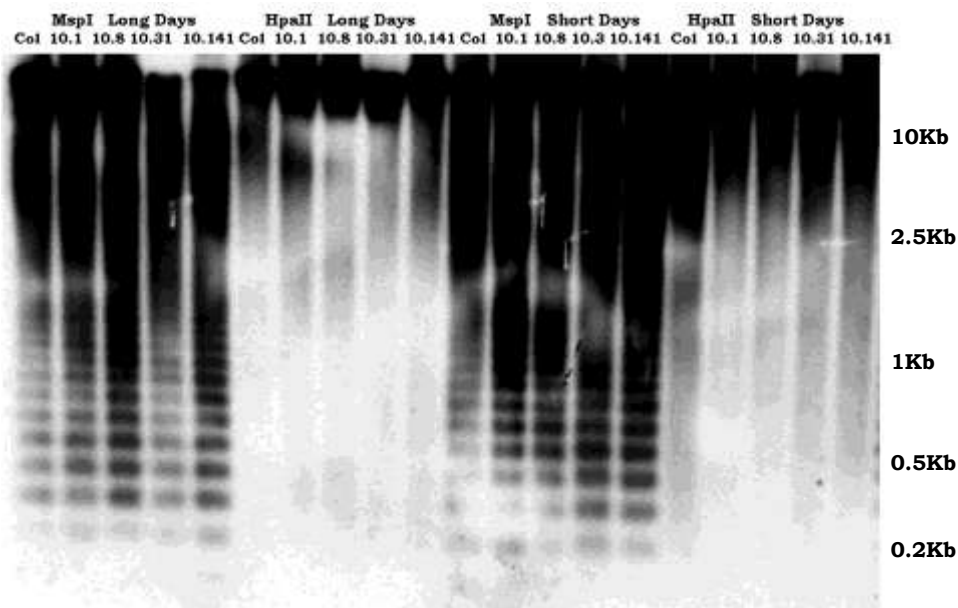
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μελέτης των προτύπων μεθυλίωσης με τα αποτελέσματα του πειράματος μικρής ημέρας εμφανίζεται η εξής συσχέτιση. Οι ομάδες δειγμάτων που σε συνθήκες μικρής ημέρας άνθισαν σε πολύ μικρό ποσοστό, εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα mCNG μεθυλίωσης σε σχέση με τον άγριο τύπο αλλά και ομάδες *LFY::HSP90RNAi* φυτών που άνθισαν ικανοποιητικά στις ίδιες συνθήκες. Παρατηρούμε λοιπόν ότι οι ομάδες φυτών που αντιμετωπίζουν δυσκολία στην άνθιση

εμφανίζουν και αυξημένα πρότυπα mCNG μεθυσίωσης. Η διαφορά στην ικανότητα άνθισης σε συνθήκες μικρής ημέρας έγκειται στο γεγονός ότι τα φυτά αντιλαμβάνονται διαφορετικά το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος, που είναι και το κυρίαρχο, ή έχουν ενεργοποιήσει σε διαφορετικό βαθμό εναλλακτικούς δρόμους προκειμένου να επιτευχθεί η άνθιση. Πιθανώς, τα διαφοροποιημένα πρότυπα μεθυσίωσης μεταξύ των δειγμάτων να σχετίζονται με την ικανότητα των δειγμάτων να κρατούν ενεργοποιημένο το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος ή την ικανότητα ενεργοποίησης των εναλλακτικών μονοπατιών για την ολοκλήρωση της άνθισης.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα που έδωσαν τα δείγματα στις αντιδράσεις πέψεων με το ένζυμο περιορισμού HpaII (Εικόνα 28β). Τόσο σε συνθήκες μεγάλης όσο και μικρής ημέρας, τα φυτά παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο μεθυσίωσης, που είναι αντίθετο του αγρίου τύπου. Ενώ στο δείγμα Col-O, και στις δυο συνθήκες, φαίνεται να συσσωρεύεται το σήμα στα μεγάλα μοριακά βάρη, στα υπόλοιπα δείγματα το σήμα ανιχνεύεται μέχρι την μικρότερη μονάδα 5S rRNA των 200bp που μπορεί να παραχθεί από την αντίδραση πέψης. Η διαφορά αυτή δηλώνει ότι και στις δύο συνθήκες ανάπτυξης, στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά τα επίπεδα μεθυσίωσης τύπου mCG είναι μειωμένα.



Εικόνα 29α: Ανάλυση σε πηκτική αгарόζης 0.8% των προϊόντων των πέψεων γενωματικών DNA (200ng/στήλη) απομονωμένων από *LFY::HSP90RNAi* φυτά και τον άγριο τύπο, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας. Η κάθε απομόνωση υπεβλήθει σε δυο πέψεις με ένζυμο περιορισμού ευαίσθητα στη μεθυσίωση ή μη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.1, 10.8, 10.31, 10.141 για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col για τον άγριο τύπο. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα MspI και HpaII.



Εικόνα 29β: Εικόνα φωτογραφικού φιλμ όπου έχουν αποτυπωθεί τα αποτελέσματα υβριδισμού κατά Southern των απομονωμένων γενωματικών DNAs, των *LFY::HSP90RNAi* ομάδων και του άγριου τύπου Col που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας, με τον ανιχνευτή CEN. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 10.1, 10.8, 10.31, 10.141 για τις *LFY::HSP90RNAi* ομάδες και Col για τον άγριο τύπο. Η έκθεση της πλαστικής μεμβράνης υβριδισμού στο φωτογραφικό φιλμ έλαβε χώρα 20 λεπτά και στη συνέχεια έγινε εμφάνιση του φιλμ σύμφωνα με πρότυπη τεχνική αυτοραδιογραφίας.

Τα αποτελέσματα του υβριδισμού του CEN ανιχνευτή έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα και στις δυο συνθήκες ανάπτυξης. Όλα τα δείγματα των *LFY::HSP90RNAi* φυτών δεν διέφεραν από τον άγριο τύπο Col-O και στις δύο ομάδες αντιδράσεων πέψειων. Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν ότι τόσο σε συνθήκες μεγάλης όσο και μικρής ημέρας, τα καθολικά πρότυπα μεθυλίωσης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών δεν τροποποιούνται.

Η ανάλυση του πρότυπου μεθυλίωσης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών δείχνει ότι, σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, τα φυτά έχουν τροποποιηθεί επιγενετικά. Αλλαγές έχουν εγκατασταθεί στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του γενώματος των φυτών οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στην ανταπόκρισή τους ως προς την άνθιση. Φαίνεται ότι η ικανότητα άνθισης των φυτών, που τα διαφοροποιεί από τα αρχικά *LFY::HSP90RNAi* φυτά, να έγκειται στην εγκαθίδρυση επιγενετικών αλλαγών στο γένωμά τους που τους επιφέρει την ιδιότητα αυτή.

3.στ. Bisulfite sequencing

Η ανάλυση του προτύπου του μεθυλιώματος των *LFY::HSP90RNAi* φυτών έδειξε ότι τα φυτά βρίσκονται σε κατάσταση αυξημένης υπομεθυλίωσης, σε σχέση με τον άγριο τύπο. Όπως έχει ειπωθεί, η ικανότητα των φυτών T2 και T3 γενιάς να ανθίζουν σε κανονικές συνθήκες χωρίς υποβοήθηση αποτελεί ένδειξη ύπαρξης επιγενετικών αλλαγών στο γένωμα των φυτών. Οι ενδείξεις επιβεβαιώθηκαν με την ανάλυση της μεθυλίωσης κατά Southern χρησιμοποιώντας τον 5S rRNA ανιχνευτή. Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα του CEN ανιχνευτή έδειξαν ότι τα καθολικά πρότυπα μεθυλίωσης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών είναι αμετάβλητα προτρέπει στην εστίαση της εύρεσης επιγενετικών αλλαγών σε συγκεκριμένους στόχους οι οποίοι να συσχετίζονται με το μηχανισμό της άνθισης. Η τεχνική που επιτρέπει την αναζήτηση εξιδεικευμένων

στόχων που έχουν τροποποιηθεί επιγενετικά είναι η Sodium Bisulfite PCR. Με βάση τη μεθοδολογία αυτή, το προς ανάλυση DNA χειρίζεται με Sodium Bisulfite και μέσω μιας σειράς χημικών αντιδράσεων τα μη μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης μετατρέπονται σε κατάλοιπα ουρακίλης ενώ τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα παραμένουν ανεπηρέαστα. Στη συνέχεια, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών ενισχύεται η περιοχή ενδιαφέροντος που επιθυμείται να μελετηθεί η κατάσταση μεθυλίωσής της και στη συνέχεια κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι το γενωματικό DNA κάθε κυττάρου ενός οργανισμού, δεν είναι απαραίτητο να κατέχει ακριβώς το ίδιο πρότυπο μεθυλίωσης με τα υπόλοιπα. Για το λόγο αυτό, η κλωνοποίηση της επιθυμητής ενισχυμένης γενωματικής περιοχής σε πλασμιδιακό φορέα έχει ως αποτέλεσμα την κατασκευή βιβλιοθήκης με τα ποικίλα διαφορετικά αντίγραφα της ενισχυμένης περιοχής. Στη συνέχεια, ανάλογα με το ποσοστό της μεθυλίωσης που εμφανίζεται σε κάθε κατάλοιπο κυτοσίνης στην αναλυόμενη περιοχή, κρίνεται αν το συγκεκριμένο κατάλοιπο είναι μεθυλιωμένο ή όχι. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των ενισχυμένων τμημάτων DNA ήταν ο pGEMT-easy (Promega).

3.στ.1. Επιλογή γενωματικών περιοχών και σχεδιασμός εκκινητών

Τα αποτελέσματα, μέχρι στιγμής, υποδεικνύουν ότι: α) οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες εμπλέκονται στο μηχανισμό της άνθισης του φυτού *Arabidopsis* και ότι η έλλειψή τους επιφέρει δραματικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη του φυτού. β) Τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά ενώ ήταν ανίκανα να αναπαραχθούν στην T1 γενιά, μετά την εφαρμογή θερμικών καταπονήσεων κατάφεραν να υπερπηδήσουν τα εμπόδια που είχαν δημιουργηθεί, να αναπαραχθούν και να μεταβιβάσουν την ιδιότητα αυτή στις επόμενες γενιές. Η τροποποίηση στην αναπαραγωγική συμπεριφορά των *LFY::HSP90RNAi* φυτών αποδίδεται σε επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες αποδειχθήκανε με την ανάλυση κατά Southern. Υπάρχει όμως η δυνατότητα, πέραν της ολικής αλλαγής του μεθυλιώματος των φυτών, να έχουν συμβεί στοχευμένες αλλαγές σε επίπεδο μεθυλίωσης του DNA σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές. Είναι γνωστό ότι η πληθώρα των γονιδίων που απαρτίζουν το μηχανισμό της άνθισης, ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των MADS-Box μεταγραφικών παραγόντων. Όταν ένα γονίδιο κατέχει την ιδιότητα του μεταγραφικού παράγοντα, αυτό σημαίνει ότι η πρωτεΐνη του συγκεκριμένου γονιδίου έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε ακολουθίες στόχους στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου που ρυθμίζει και να το ενεργοποιεί ή να το καταστέλλει αντίστοιχα. Υπάρχει λοιπόν μεγάλη πιθανότητα, μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων σε επίπεδο μεθυλίωσης του DNA, να έχουν δημιουργηθεί αλλαγές σε ρυθμιστικές περιοχές προαγωγέων γονιδίων που να επηρεάζουν την ικανότητα έκφρασής τους και να τροποποιούν το αποτέλεσμα της άνθισης. Έχοντας ως βάση τα δεδομένα αυτά, πραγματοποιήθηκε μελέτη των προαγωγέων γονιδίων της άνθισης που περιέχουν ρυθμιστικές περιοχές ελέγχου από άλλα ή και για άλλα γονίδια.

Μετά από ανάλυση των γενωματικών περιοχών των προαγωγέων βασικών γονιδίων της άνθισης, επιλέχθηκαν τα εξής γονίδια για περαιτέρω μελέτη: *Soc1*, *Lfy* και *Ap1*. Η περιοχή των προαγωγέων, οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και οι ρυθμιστικές περιοχές που περιέχουν παρουσιάζονται στις εικόνες 32α, 32β και 32γ.

AGTGATTAAGCAAATGAGCAAAGGTTTTATGTGGTTTATTTTATTATATGATTGACATCAAATGTATATATAT
GGTTGTTTTATTTAACAATATATATGGATATAACGTACAACTAAATATGTTTGATTGACGAAAAAATATATGT
ATGTTTGATTAACAACATAGCACATATTTCAACTGATTTTTGTCTGATCATCTACAACCTTAATAAGAACACACAAC
ATTGAACAAATCTTTGACAAAATACTATTTTGGGTTTTGAAATTTTGAATACTTACAATTTCTTCTCGATCTTC
CTCTCTTTCCTTAAATCCTGCGTACAAATCGTTCGACGCAATACATTACACAGTTGTCAATTGGTTCTCAGCTCTA
CCAAAAACATCTATTGCCAAAAGAAAGGTTCTATTTGTACTTCACTGTTACAGCTGAGAACATTAATATAATAAGC
AAATTTGATAAAAACAAAGGGTTCTCACCTTATTCCAAAAGAATAAGTAAATAAGGTAATAGAGAAATGTTAATA
AAAGGAAATTAATAATAGATATTTTGGTGGTTCAGATTTTGTTCGTAGATCTACAGGGAAATCTCCGCCGTCAA
TGCAAAGCGAAGGTGACACTTGGGGAAGGACAGTGTCTCCGTACAATGTTACTTACCCATTTCTCTTCACGAGACG
TCGATAATCAAATGTTTATTTTTCATATTTTAAAGTCCGCAAGTTTTATTAATAAAATCATGGACCCGACATTAGTAC
GAGATATAACAATGAGAAAGTCGACACGCAAATCCTAAAGAAACCCTTTGGTTTTTGCAAAACAAGGAAACCCAGCT
TTAGCTTTTCCCTAAAACCCTCTTACCCAAATCTCTCCATAAATAAAGATCCCGAGACTCAAACACAAGTCTTTT
TATAAAGGAAAGAAAGAAAACCTTCCCTAATGGTTTCATACCAAAGTCTGAGCTCTTCTTTATATCTCTCTTGTAG
TTTCTTATTGGGGTCTTTGTTTTGTTTGGTCTTTTAGAGTAAGAAGTTTCTTAAAAAAGGATCAAAAATG

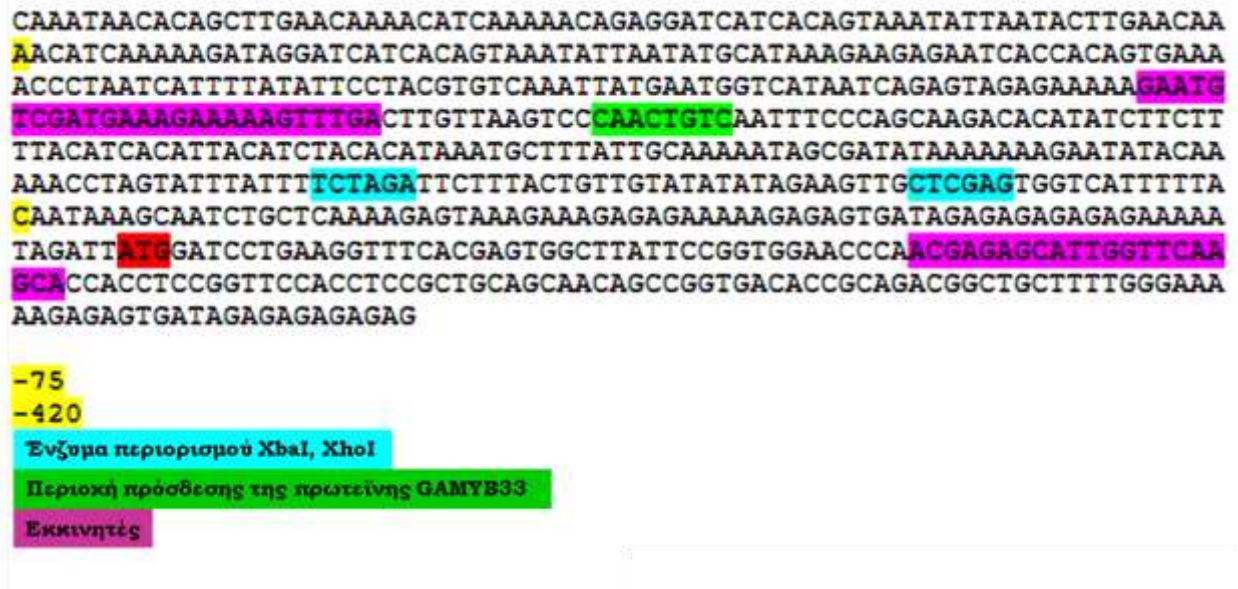
-500
Περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης LFY
C-box μοτίβο (περιοχή πρόσδεσης b-zip)
Περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης SPL3
Περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης FD
Εκκινητές

Εικόνα 32α: Απεικόνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής του προαγωγέα του Ap1 γονιδίου που επιλέχτηκε προκειμένου να μελετηθεί με την τεχνική του Bisulfite sequencing. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της περιοχής μεγέθους 329bp. Με πράσινο χρώμα έχουν σημειωθεί οι δυο ρυθμιστικές περιοχές πρόσδεσης του γονιδίου *Lfy* στον προαγωγέα, με κίτρινο χρώμα η περιοχή του ρυθμιστικού στοιχείου C-box core που είναι υπεύθυνο για την αντίληψη του φωτός και με κόκκινο χρώμα η περιοχή πρόσδεσης του γονιδίου *Spl3* (At2g33810) που εμπλέκεται στην αναπαραγωγική ανάπτυξη. Με μαύρη γραμμή στα δεξιά της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έχει σημειωθεί η περιοχή πρόσδεσης του γονιδίου *Fd* που εμπλέκεται στη προαγωγή της άνθισης. Η περιοχή που επιλέχθηκε ξεκινάει στο -228 από το σημείο έναρξης της μετάφρασης. Με γαλάζιο χρώμα έχουν σημειωθεί οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού BglIII και Sall τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της μετατροπής της περιοχής από το χειρισμό του Bisulfite.

CACCATTACCATAACTACAACGAGAAGAGGATCTTTTTTAAGGAGAAAAGCAGAGAGAGAAGAGACGAG
TGTGTGAAGTTTTTTTGTCTTTTGTTCCTTTTATTACACACAATAGATGAAACGAGGAAAGCTACTTTC
TTTTGCTACTTCCATAAAAAGGTTCTTCTTTTCGACAGAGAATCAACTTTTGATCATCTTCTTCTTCTCT
TTCTTTCTTCTTCTCCCTCCAGTAATGCTTATATAGTCTCCTCCTATATCTCTACCTATACATACACAA
ACCCTTTATCCTCGAAAGCTTCTCCTGGTTAGGTTTTTATCAAACCCTTTTAGCCAATCGGTAAGATC
TCTTCGTCATGATCTTTTCTTTTCTTTTGTCTTGTACTCTGATGGATCTATAAACTTATATGGGTTT
GGTTTCATTTGGTTCGATTTGATGTGTTTGGTTTCTTTGTCCATAATCTCATGAAAGGAGGTTGCATCC
TTCAATTAACCATAAACAAGTTTCCATTACAGACTTATAGATCAGATACATTTAGATTGTTTTGCT
TTTTGGGTACTTAATCTTTTTCGTTGACTTCATCAGTCTTCTCCCACCCAAACAAAAAAGTCATATTTGCA
TCATATCTTCATTTTTTAACTACTCTCTTTGATTTCATATATGAAATGGGTTGTTTTATGTGTGTGAC
TAATCTTGTATTGAGGTGGTTGCACCATTGATCTACCGTTTTCTTCAATTTTTGAAAAAATAATTTTA
TTTTTTTTCTGTGTGCAAGGGAAATTAATAAAGAAGAAGATATCGGTGAGGGGCAAACTCAGATGAAG
AGAATAGAGAATGCAACAAGCAGACAAGTGACTTTCTCCAAAAGAAGGAATGTTTTGTTGAAGAAAGCC

-525
-180
Ένζυμα περιορισμού HindIII, EcoRII
Περιοχή που περιέχει τα ρυθμιστικά στοιχεία πρόσδεσης των πρωτεϊνών FLC και CO
Εκκινητές

Εικόνα 32β: Απεικόνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής του προαγωγέα του *Soc1* γονιδίου που επιλέχτηκε προκειμένου να μελετηθεί με την τεχνική του Bisulfite sequencing. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της περιοχής μεγέθους 371bp. Με κόκκινο χρώμα έχει σημειωθεί η περιοχή που περιέχει τα ρυθμιστικά στοιχεία ελέγχου του γονιδίου από τα γονίδια *F1c* και *Co*. Με γαλάζιο χρώμα έχουν σημειωθεί οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* και *EcoRII* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της μετατροπής της περιοχής από το χειρισμό του Bisulfite. Η περιοχή που επιλέχτηκε ξεκινάει στο -320 από το σημείο έναρξης της μετάφρασης.



Εικόνα 32γ: Απεικόνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής του προαγωγέα του γονιδίου *Lfy* που επιλέχτηκε προκειμένου να μελετηθεί με την τεχνική του Bisulfite sequencing. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της περιοχής μεγέθους 353bp. Με πράσινο χρώμα έχει σημειωθεί η ρυθμιστική περιοχή πρόσδεσης του γονιδίου *Gamyb33* (*At5g06100*) που εμπλέκεται στη ρύθμιση της άνθισης μέσω του μονοπατιού των γιββερίλλινών. Με γαλάζιο χρώμα έχουν σημειωθεί οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού *XbaI* και *XhoI* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της μετατροπής της περιοχής από το χειρισμό του Bisulfite. Η περιοχή που επιλέχτηκε ξεκινάει στο +65 από το σημείο έναρξης της μετάφρασης.

Για να γίνει εφικτή η εξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων σχετικά με το πρότυπο μεθυλίωσης της προς μελέτης περιοχής, απαιτείται ανάλυση μεγάλου αριθμού ξεχωριστών κλώνων μετά την κλωνοποίηση της ενισχυμένης περιοχής σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Ο ίδιος περιορισμός ισχύει και για τον σχεδιασμό των εκκινητών. Λόγω του ότι ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο κυτοσίνης μπορεί να είναι μεθυλιωμένο σε κάποια κύτταρα ενώ σε κάποια άλλα όχι, ο εκκινητής στο συγκεκριμένο κατάλοιπο πρέπει να είναι εκφυλισμένος για να αποφευχθούν εσφαλμένες διακρίσεις μεταξύ των προς ενίσχυση αλληλουχιών. Στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι αναφέρονται οι εκφυλισμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παραπάνω επιλεγμένων γενωματικών περιοχών.

3.στ.2. Απομόνωση γενωματικού DNA και χειρισμός με Sodium Bisulfite

Για την ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης επιλέχτηκαν φυτά αγρίου τύπου που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας και φυτά *LFY::HSP90RNAi* των ομάδων 10.1 και 10.141 που αναπτύχθηκαν σε αντίστοιχες

συνθήκες. Οι δυο ομάδες των *LFY::HSP90RNAi* φυτών επιλέχθηκαν γιατί παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης σε σχέση με τον άγριο τύπο σε συνθήκες μεγάλης ημέρας αλλά και μεταξύ τους σε συνθήκες μικρής ημέρας. Επίσης, σύμφωνα με τις μετρήσεις της άνθισης τόσο σε συνθήκες μεγάλης όσο και μικρής ημέρας ανταποκρίνονται διαφορετικά και παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους. Οι ομάδες φυτών 10.1 και 10.141 τόσο με το φαινότυπο όσο και με τα πρότυπα μεθυλίωσης που εμφανίζουν αποτελούν αντιπροσωπευτικά δείγματα του συνόλου των φυτών που έχουν μελετηθεί.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων κλωνοποίησης των ενισχυμένων περιοχών, επιλέχθηκαν τυχαία 10 αποικίες ώστε να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις πέψων με ένζυμο περιορισμού. Οι αντιδράσεις πέψων πραγματοποιήθηκαν για δυο λόγους: α) κάθε ένζυμο που επιλέχτηκε περιέχει τουλάχιστον ένα κατάλοιπο κυτοσίνης στην νουκλεοτιδική ακολουθία που αναγνωρίζει. Εάν η συγκεκριμένη θέση είναι μεθυλιωμένη τότε ο χειρισμός με Bisulfite θα την τροποποιήσει και δεν θα αναγνωρίζεται πλέον από το ένζυμο περιορισμού. Έτσι υπάρχει μια ένδειξη ύπαρξης μεθυλίωσης στην περιοχή ή όχι. β) Επειδή δεν είναι απαραίτητο όλα τα κατάλοιπα κυτοσίνης να είναι μεθυλιωμένα σε μια περιοχή, επιλέχτηκε και ένα δεύτερο ένζυμο περιορισμού του οποίου τα αποτελέσματα θα συμπληρώνουν τα αποτελέσματα του πρώτου ενζύμου. Δηλαδή, αν και τα δυο ένζυμα αναγνωρίζουν την ακολουθία στόχο και την πέπτουν, τότε πιθανώς η συγκεκριμένη περιοχή να μην είναι μεθυλιωμένη, ενώ αν και τα δυο ένζυμα αναγνωρίζουν και πέπτουν την ακολουθία στόχο σε κάποιο ποσοστό, τότε πολύ πιθανόν η συγκεκριμένη περιοχή να παρουσιάζει ένα διαφοροποιημένο πρότυπο μεθυλίωσης.

3.στ.3. Ανάλυση του προαγωγέα *Ap1*

Μια περιοχή μεγέθους 329bp του προαγωγέα του γονιδίου *Ap1* ενισχύθηκε, από όλες τις σειρές *LFY-RNAi* φυτών που χρησιμοποιήθηκαν μετά από επώαση με Sodium Bisulfite. Επιλέχθηκαν 10 αποικίες για κάθε δείγμα DNA στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι εξής πέψεις: πέψη *EcoRI* για την επιβεβαίωση του μεγέθους του ενθέτου και πέψεις *BglII* και *Sall* για τον έλεγχο του προτύπου μεθυλίωσης (Εικόνα 33).

Δείγμα DNA	Ένζυμο περιορισμού		
	<i>EcoRI</i>	<i>BglII</i>	<i>Sall</i>
Col μεγάλης ημέρας	10/10, 329bp	0/10	0/10
Col μικρής ημέρας	10/10, 329bp	0/10	0/10
10.1 μεγάλης ημέρας	10/10, 329bp	0/10	0/10
10.1 μικρής ημέρας	10/10, 329bp	0/10	0/10
10.141 μεγάλης ημέρας	10/10, 329bp	0/10	0/10
10.141 μικρής ημέρας	10/10, 329bp	0/10	0/10

Εικόνα 33: Πίνακας αποτελεσμάτων πέψων για τη μελέτη μεθυλίωσης του προαγωγέα *Ap1*. Για κάθε δείγμα DNA ελέγχθηκαν 10 αποικίες όπου πραγματοποιήθηκαν τρεις πέψεις στην κάθε μια. 1) *EcoRI* για την επιβεβαίωση του μεγέθους του ενθέτου, 2) *BglII* και 3) *Sall* για τον έλεγχο της μεθυλίωσης.

Τα αποτελέσματα των πέψεων υποδηλώνουν ότι η θέση αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού έχει καταστραφεί σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στην περιοχή του προαγωγέα του *Ap1* γονιδίου δεν ανιχνεύονται τροποποιήσεις του μεθυλιώματος, αφού και τα δυο ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν δεν αναγνωρίζουν την ακολουθία στόχο. Για το λόγο αυτό, δεν μελετήθηκε περαιτέρω η περιοχή αυτή.

3.στ.4. Ανάλυση του προαγωγέα *Soc1*

Όμοια αναλύθηκε η περιοχή μεγέθους 371bp του προαγωγέα του *Soc1* γονιδίου. Πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων, με τη μόνη διαφορά ότι τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *HindIII* και *EcoRII* (Εικόνα 34).

Δείγμα DNA	Ένζυμα περιορισμού		
	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRII</i>
Col μεγάλης ημέρας	10/10, 371bp	0/10	0/10
Col μικρής ημέρας	10/10, 371bp	0/10	0/10
10.1 μεγάλης ημέρας	10/10, 371bp	0/10	0/10
10.1 μικρής ημέρας	10/10, 371bp	0/10	0/10
10.141 μεγάλης ημέρας	10/10, 371bp	0/10	0/10
10.141 μικρής ημέρας	10/10, 371bp	0/10	0/10

Εικόνα 34: Πίνακας αποτελεσμάτων πέψεων της μελέτης μεθυλίωσης του προαγωγέα *Soc1*. Για κάθε δείγμα DNA ελέγχθηκαν 10 αποικίες όπου πραγματοποιήθηκαν τρεις πέψεις στην κάθε μια. 1) *EcoRI* για την επιβεβαίωση του μεγέθους του ενθέτου, 2) *HindIII* και 3) *EcoRII* για τον έλεγχο της μεθυλίωσης.

Τα αποτελέσματα των πέψεων και σε αυτή την περιοχή υποδηλώνουν ότι η θέση αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού έχει καταστραφεί σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στην περιοχή του προαγωγέα του *Soc1* γονιδίου δεν ανιχνεύονται τροποποιήσεις του μεθυλιώματος, αφού και τα δυο ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν δεν αναγνωρίζουν την ακολουθία στόχο. Για το λόγο αυτό, δεν μελετήθηκε περαιτέρω η περιοχή αυτή.

3.στ.5. Ανάλυση του προαγωγέα *Lfy*

Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για την περιοχή μεγέθους 353bp του προαγωγέα του *Lfy* γονιδίου. Και εδώ τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ακολουθούν την ίδια σειρά με τη μόνη διαφορά ότι τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *XbaI* και *XhoI* (Εικόνα 35) και αναλύθηκαν 20 αποικίες αντί για 10.

Δείγμα DNA	Ένζυμα περιορισμού		
	EcoRI	XbaI	XhoI
Col μεγάλης ημέρας	10/10, 353bp	0/20	0/20
Col μικρής ημέρας	10/10, 353bp	0/20	0/20
10.1 μεγάλης ημέρας	10/10, 353bp	10/20	5/20
10.1 μικρής ημέρας	10/10, 353bp	4/20	7/20
10.141 μεγάλης ημέρας	10/10, 353bp	2/20	1/20
10.141 μικρής ημέρας	10/10, 353bp	3/20	1/20

Εικόνα 35: Πίνακας αποτελεσμάτων πέψεων της μελέτης μεθυλίωσης του προαγωγέα *Lfy*. Για κάθε δείγμα DNA ελέγχτηκαν 20 αποικίες όπου πραγματοποιήθηκαν τρεις πέψεις στην κάθε μια. 1) EcoRI για την επιβεβαίωση του μεγέθους του ενθέτου, 2) XbaI και 3) XhoI για τον έλεγχο της μεθυλίωσης.

Η ανάλυση των πέψεων που πραγματοποιήθηκαν έδειξε ότι όλες οι αποικίες των δειγμάτων Col-0 μεγάλης και μικρής ημέρας δεν έδωσαν κανένα προϊόν με τις πέψεις XbaI και XhoI, αποτέλεσμα που δηλώνει ότι στον άγριο τύπο η συγκεκριμένη περιοχή δεν είναι μεθυλιωμένη. Στα υπόλοιπα δείγματα ορισμένες αποικίες έδωσαν προϊόντα στις αντιδράσεις πέψεων XbaI και XhoI, που δηλώνει ότι οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων παραμένουν λειτουργικές λόγω μεθυλίωσής τους. Στην εικόνα 35 φαίνεται ότι τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης από ότι ο άγριος τύπος και στις δυο συνθήκες ανάπτυξης. Οι αντιδράσεις πέψεων με το ένζυμο περιορισμού XbaI δεν παράγουν προϊόντα (0%) και για τα δύο δείγματα αγρίου τύπου, ενώ παρήγαγαν 50% για το 10.1 μεγάλης ημέρας, 25% για το 10.1 μικρής ημέρας, 10% για το 10.141 μεγάλης ημέρας και 15% για το 10.141 μικρής ημέρας. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για το XhoI. Πάλι, τα δυο δείγματα αγρίου τύπου παρήγαγαν 0% προϊόντα στις αντιδράσεις πέψεων, ενώ το 10.1 μεγάλης ημέρας παρήγαγε 25%, το 10.1 μικρής ημέρας 35%, το 10.141 μεγάλης ημέρας 5% και το 10.141 μικρής ημέρας 5%. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι τουλάχιστον στα κατάλοιπα κυτοσίνης που περιέχονται στις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού το πρότυπο μεθυλίωσης στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά είναι διαφοροποιημένο σε σχέση με τον άγριο τύπο και στις δύο συνθήκες ανάπτυξης.

Επειδή όμως οι πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν ένδειξη της ύπαρξης ή απουσίας μεθυλίωσης στα συγκεκριμένα κατάλοιπα κυτοσινών, για να καταστεί δυνατή η μελέτη ολόκληρης της περιοχής απαιτείται η αλληλούχισή της. Για το σκοπό αυτό, αλληλουχήθηκαν όλοι οι κλώνοι που ελέγχθηκαν με τις αντιδράσεις των πέψεων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στις εικόνες 37α και 37β.

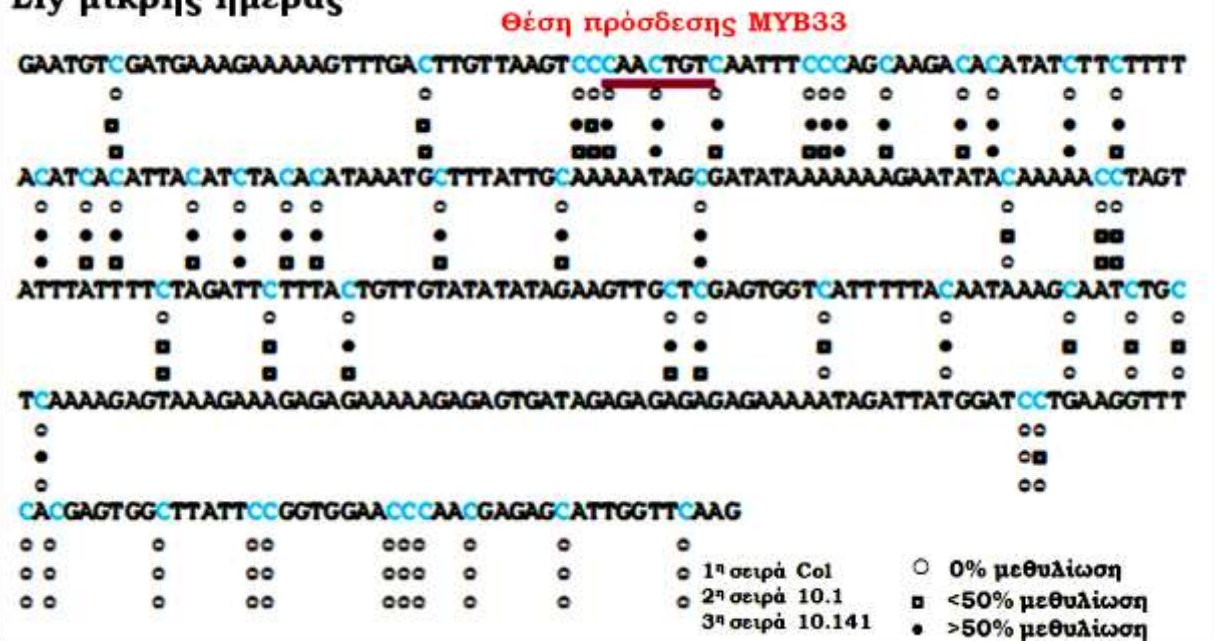
Αναλύοντας τους συγκεντρωτικούς πίνακες των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης των δειγμάτων και των δύο συνθηκών γίνεται φανερό ότι ο προαγωγέας του *Lfy* γονιδίου βρίσκεται κάτω από επιγενετικό έλεγχο. Τόσο στις συνθήκες μεγάλης όσο και μικρής ημέρας φαίνεται να έχει υποστεί αλλαγές η κατάσταση του μεθυλιωμάτος του, οι οποίες αποθηκεύονται ως μεθυλο-ομάδες στα κατάλοιπα της κυτοσίνης. Στα αποτελέσματα των συνθηκών μεγάλης ημέρας φαίνεται ότι στο δείγμα 10.1 παρατηρούνται υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης σε σχέση με το 10.141. Όμως, στην περιοχή πρόσδεσης της MYB33 πρωτεΐνης και τα δύο δείγματα εμφανίζουν όμοια υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης. Η MYB33 πρωτεΐνη αποτελεί μια πρωτεΐνη κλειδί του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος μέσω της οποίας το συγκεκριμένο μονοπάτι

ενεργοποιεί το *Lfy* γονίδιο προκειμένου να επαχθεί η άνθιση. Στα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι η περιοχή πρόσδεσης της MYB33 πρωτεΐνης στον προαγωγέα του *Lfy* είναι πλήρως μεθυλιωμένη. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και στα δείγματα των συνθηκών μικρής ημέρας με τη διαφορά όμως ότι στην περιοχή πρόσδεσης της MYB33 πρωτεΐνης, το δείγμα 10.1 εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης από ότι το δείγμα 10.141. Δηλαδή, ενώ στο δείγμα 10.1 και τα τρία κατάλοιπα κυτοσίνης της περιοχής πρόσδεσης CAACTGTC χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης, στο δείγμα 10.141 μόνο το ένα κατάλοιπο είναι υψηλά μεθυλιωμένο, ενώ στα υπόλοιπα δυο το ποσοστό μεθυλίωσης είναι χαμηλό.



Εικόνα 37α: Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Bisulfite sequencing της περιοχής του προαγωγέα του *Lfy* γονιδίου στα δείγματα 10.1 και 10.141 για τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά και Col-O για τον άγριο τύπο. Όλα τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας. Με γαλάζιο έχουν σημειωθεί τα κατάλοιπα κυτοσίνης που περιέχονται στην προς μελέτη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Κάθε κατάλοιπο κυτοσίνης χαρακτηρίζεται από τρεις ετικέτες. Η κάθε σήμανση αποτελεί το τελικό ποσοστιαίο αποτέλεσμα που μετρήθηκε για το συγκεκριμένο κατάλοιπο και στους 20 κλώνους που αναλύθηκαν στο εκάστοτε δείγμα. Οι σημάνσεις της κάθε σειράς αντιπροσωπεύουν από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Col, 10.1 και 10.141. Στην νουκλεοτιδική αλληλουχία έχει σημειωθεί το 8-νουκλεοτίδιο CAACTGTC που αποτελεί τη ρυθμιστική αλληλουχία πρόσδεσης της MYB33 πρωτεΐνης (At5g06100).

Lfy μικρής ημέρας



Εικόνα 37α: Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Bisulfite sequencing της περιοχής του προαγωγέα του *Lfy* γονιδίου στα δείγματα 10.1 και 10.141 για τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά και Col-O για τον άγριο τύπο. Όλα τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μικρής ημέρας. Με γαλάζιο έχουν σημειωθεί τα κατάλοιπα κυτοσίνης που περιέχονται μελετούμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Κάθε κατάλοιπο κυτοσίνης χαρακτηρίζεται από τρεις ετικέτες. Η κάθε σήμανση αποτελεί το τελικό ποσοστιαίο αποτέλεσμα που μετρήθηκε για το συγκεκριμένο κατάλοιπο και στους 20 κλώνους που αναλύθηκαν στο εκάστοτε δείγμα. Οι σημάνσεις της κάθε σειράς αντιπροσωπεύουν από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Col, 10.1 και 10.141. Στην νουκλεοτιδική αλληλουχία έχει σημειωθεί το 8-νουκλεοτίδιο CAACTGTC που αποτελεί τη ρυθμιστική αλληλουχία πρόσδεσης της MYB33 πρωτεΐνης (At5g06100).

3.στ.6. Ανάλυση του προαγωγέα *Sup*

Ένα ακόμη γονίδιο στο οποίο μελετήθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης του προαγωγέα του ήταν το *Superman* (At3g23130). Το *Sup* είναι ένα γονίδιο που εκφράζεται εξειδικευμένα στο άνθος και εμπλέκεται στο σχηματισμό των ανθών και του υπέρου. Σε υπομεθυλωμένο γενετικό υπόβαθρο ένα μέρος της περιοχής του προαγωγέα του γονιδίου *Sup* μεθυλιώνεται επιλεκτικά καταστέλλοντας την έκφραση του (Jacobsen et al., 1999). Λόγω του γεγονότος ότι και τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά βρίσκονται σε κατάσταση υπομεθυλίωσης, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ανταπόκριση του προαγωγέα του γονιδίου αυτού στο γενετικό υπόβαθρο των *LFY::HSP90RNAi* φυτών. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκφυλισμένοι εκκινητές για την ενίσχυση της ακολουθίας του προαγωγέα του *Sup* γονιδίου που έχει δείξει ότι τροποποιείται. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα που έχουν μελετηθεί (Εικόνα 37).

TGTTGATTTTCACGAAACTTAAAGGTGTAACATCATTAAATGAAAGTAATAGATGTACTTAATTAACCTTG
 TGTTCATCTCCATAGATCAAATCATGGAAAAGCTCGCTTAATACATGTTTACCCCAACATAAAATAAAGCTT
 TTTCTTTAAAGTTTCATTTTATTTAAATCTAAGATGGGGATTTGATAATGCGTCCAA**GAAATCAGTCTCTTT**
CACAGTCTTAACACCAAAGAGCCCCAACCCCTATCATCACACACACCTCTCTCTCATCTCTATATCTCTCT
 CTCTCTCTCTAAGAGACAGACAGACATAGATATATCTTAGATTTTTCCCAGGGGAAAAAAGTGAGTTTCAT
 CTTTTCAGATCTTACAAACACTTTTGCCTTTTATAAACT**GATGTACCCAAATCATTACTAGT**ACTATCTTA
 ATTATCTTTACAATTTTTTATCTAGCATAGCCAAAAAGAAAGAGCTTGCA**AT****AT**GAGAGATCAAACA
 GCATAGAGTTGAGGAACAGCTTCTATGGCCGTGCAAGAACTTCACCATGGAGCTATGGAGATTATGATAA
 TTGCCAACAGGATCATGATTATCTTCTAGGGTTTTTCATGGCCACCAAGATCTACACTTGCAGCTTCTGC

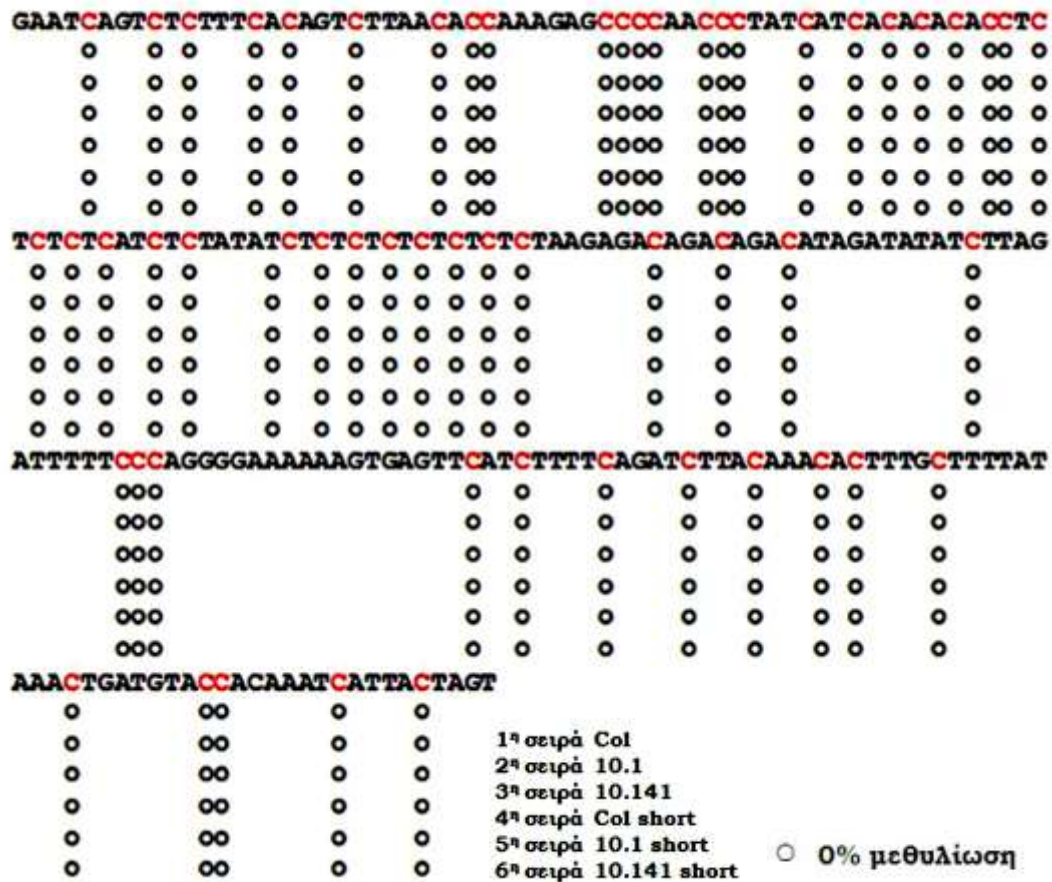
Εκκινητές

Εικόνα 37: Απεικόνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής του προαγωγέα του γονιδίου *Sup* που επιλέχτηκε προκειμένου να αναλυθεί με την τεχνική του Bisulfite sequencing. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της γενωματικής περιοχής μεγέθους 215bp. Η περιοχή που επιλέχτηκε ξεκινάει στο -63 από το σημείο έναρξης της μετάφρασης.

Και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων. Επειδή όμως στην ενισχυμένη περιοχή δεν περιέχεται θέση αναγνώρισης για κάποιο συμβατικό ένζυμο περιορισμού, επιλέχτηκε ο ίδιος αριθμός κλώνων όπως και στην περίπτωση του προαγωγέα του *Lfy* και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στην εικόνα 37α. Η μελέτη των αποτελεσμάτων για τη γενωματική περιοχή του *Sup* προαγωγέα δείχνει ότι σε όλα τα δείγματα και συνθήκες δεν εμφανίζεται κάποια αλλαγή στο πρότυπο μεθυλίωσης της αλληλουχίας. Όλα τα δείγματα των *LFY::HSP90RNAi* φυτών είναι πανομοιότυπα με τον άγριο τύπο γεγονός που δηλώνει ότι η συγκεκριμένη περιοχή δεν έχει επηρεαστεί από την αλλαγή του μεθυλιώματος των *LFY::HSP90RNAi* φυτών.

Συγκεντρώνοντας τα δεδομένα από το πείραμα του Bisulfite sequencing παρατηρείται ότι έχουν συμβεί εξειδικευμένες αλλαγές στο μεθυλίωμα των *LFY::HSP90RNAi* φυτών τουλάχιστον σε μια γενωματική περιοχή. Γίνεται προφανές ότι τα φυτά για να καταφέρουν να υπερπηδήσουν το εμπόδιο που προκάλεσε στην άνθιση η απώλεια των HSP90 πρωτεϊνών επιστράτευσαν βοηθητικούς μηχανισμούς, όπως είναι οι αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσής τους. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να εξυπηρετούν είτε στην ενεργοποίηση γονιδίων ή μηχανισμών που υποβοηθούν την ολοκλήρωση της άνθισης, είτε στην απενεργοποίηση περιοχών που τα φυτά πλέον δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν λόγω έλλειψης των HSP90 πρωτεϊνών.

Sup μεγάλης/μικρής ημέρας



Εικόνα 37α: Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Bisulfite sequencing της περιοχής του προαγωγέα του γονιδίου *Sup* στα δείγματα 10.1 και 10.141 για τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά και Col-O για τον άγριο τύπο. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας. Με κόκκινο έχουν σημειωθεί τα κατάλοιπα κυτοσίνης που περιέχονται στην προς μελέτη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Κάθε κατάλοιπο κυτοσίνης χαρακτηρίζεται από έξι σημάνσεις. Η κάθε σήμανση αποτελεί το τελικό ποσοστιαίο αποτέλεσμα που μετρήθηκε για το συγκεκριμένο κατάλοιπο και στους 20 κλώνους που αναλύθηκαν στο εκάστοτε δείγμα. Οι σημάνσεις της κάθε σειράς αντιπροσωπεύουν από πάνω προς τα κάτω τα δείγματα Col-O, 10.1 και 10.141 μεγάλης ημέρας και στη συνέχεια Col-O, 10.1 και 10.141 μικρής ημέρας.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.α. Θεωρητικό υπόβαθρο

Οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούν μια πολύ συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών τόσο μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών όσο και μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών. Παρόλο που ονομάζονται θερμοεπαγόμενες, η έκφρασή τους δεν εμφανίζεται μόνο κάτω από συνθήκες καταπόνησης, με το θερμικό σοκ να αποτελεί μια από αυτές, αλλά ανιχνεύεται ικανοποιητικά και σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των οργανισμών. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν χαρακτηριστεί 7 μέλη της οικογένειας. Τα *Hsp90.1*, *2*, *3* και *4* γονίδια που αποτελούν τα κυτταροπλασματικά μέλη, είναι το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα τα ομόλογα των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων, έχει δειχθεί η σημαντικότητα και αναγκαιότητα της έκφρασής τους όχι μόνο για τη σωστή ανάπτυξη των οργανισμών αλλά και τη βιωσιμότητά τους. Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και στο *Arabidopsis* μέσω της τεχνικής των T-DNA μεταλλαγμάτων όπου απαλοίφεται η έκφραση των γονιδίων. Τα πειράματα μελέτης των τεσσάρων γονιδίων μέσω T-DNA μετάλλαξης παρουσίασαν δύο πολύ σημαντικά αποτελέσματα. Πρώτον, κάθε απλή *hsp90* μετάλλαξη παρουσίαζε παρόμοιο φαινότυπο με τις υπόλοιπες. Καμία απλή *hsp90* μετάλλαξη για καθένα από τα τέσσερα γονίδια δεν απειλούσε τη βιωσιμότητα του φυτού και τα αποτελέσματα της απαλοιφής της έκφρασής του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση εύρους φαινοτύπων που επαναλαμβάνονταν και στις μεταλλάξεις των υπολοίπων μελών (Samakonli et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν ότι υπάρχει πιθανώς αλληλοεπικάλυψη των δράσεων των τεσσάρων γονιδίων στο *Arabidopsis*. Δεύτερον, ήταν αδύνατη η δημιουργία τριπλών και τετραπλών μεταλλαγμάτων των γονιδίων μιας και οι απόγονοι των διασταυρώσεων δεν ήταν βιώσιμοι. Κάθε προσπάθεια απαλοιφής παραπάνω από δυο γονιδίων συγχρόνως επέφερε θνησιγόνα αποτελέσματα γεγονός που δείχνει πόσο απαραίτητη είναι η δράση τους για τη βιωσιμότητα του οργανισμού.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, σχεδιάστηκε ένα ερευνητικό έργο προκειμένου να καταστεί δυνατή η μελέτη της λειτουργίας των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο μηχανισμός της RNA γονιδιακής αποσιώπησης (RNAi, RNA interference). Ο RNAi μηχανισμός κατέχει τα εξής πλεονεκτήματα: πρώτον, επιλέγοντας μια γενωματική περιοχή υψηλής ομολογίας των προς μελέτη γονιδίων, καθίσταται δυνατή η αποσιώπηση όλων των προς μελέτη γονιδίων συγχρόνως. Δεύτερον, το σημαντικότερο πλεονέκτημα του μηχανισμού έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαλείφει πλήρως την έκφραση του ή των προς μελέτη γονιδίων. Η RNA αποσιώπηση λειτουργεί ποσοστιαίως και σε κάθε προϊόν μετασχηματισμού μπορεί να κυμαίνεται από 0-100%. Καθίσταται λοιπόν δυνατή η μελέτη του γονιδίου ή γονιδίων στόχων που η απαλοιφή τους προκαλεί θνησιγενή αποτελέσματα στον οργανισμό. Τρίτον, έχει αποδειχθεί ότι ο μηχανισμός είναι σταθερός και εξακολουθεί να εκφράζεται για αρκετές γενιές οργανισμό που μελετάται. Ειδικά για το *Arabidopsis*, έχει δειχθεί ότι παραμένει σταθερός μέχρι και 5 γενιές (Stoutjesdijk et al., 2002). Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει τη δυνατότητα εκτενής παρατήρησης των γονιδίων που μελετούνται για αρκετές γενιές. Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει τη δυνατότητα εκτενούς παρατήρησης των γονιδίων που αποσιωπούνται για αρκετές γενιές.

Πραγματοποιήθηκε στοχευμένη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο χρησιμοποιώντας τον ιστο-ειδικό προαγωγέα του γονιδίου *Lfy*. Το *Lfy* γονίδιο, που εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο κορυφαίο βλαστικό και αναπαραγωγικό μερίστωμα, είναι υπεύθυνο για τη μετάβαση του

φυτού από τη βλαστική στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης, ορίζει την ταυτότητα του κορυφαίου μεριστώματος και γίνεται το έναυσμα για την έναρξη του σχηματισμού των ανθέων (Blazquez et al., 1997). Αποτελεί λοιπόν κυρίαρχο γονίδιο που ελέγχει την ταυτότητα του μεριστώματος επιτρέποντας τη μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης και τη δημιουργία ανθέων. Η κατεύθυνση της RNA αποσιώπησης στην ανθική φάση ανάπτυξης του φυτού μειώνει το φαινοτυπικό αποτέλεσμα και θέτει τις προϋποθέσεις για μια πιο επικεντρωμένη παρατήρηση του φαινομένου.

4.β. Οι HSP90 επηρεάζουν δραματικά το φαινότυπο της άνθισης

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός φυτών *Arabidopsis* με την κατασκευή αποσιώπησης. Η φαινοτυπική παρατήρηση σε συνδυασμό με τη μοριακή ανάλυση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών έδειξε ότι τα αρχικά μεταλλάγματα χωρίζονταν φαινοτυπικά σε δυο κύριες κατηγορίες: φυτά που έμειναν καθηλωμένα στη βλαστική φάση ανάπτυξης και αυτά που μετέβαιναν στην αναπαραγωγική φάση. Και στις δυο περιπτώσεις τα φυτά ήταν ανίκανα να παράγουν άνθη ακόμα και μετά την ολοκλήρωση αρκετών εβδομάδων ανάπτυξης. Χαρακτηριστικό αποτέλεσμα αποτέλεσε η συνεχής παραγωγή φυλλοειδών δομών ή αδιαφοροποιητών καλλοειδών μορφών στις καταβολές που είναι προγραμματισμένες να παραχθούν άνθη πάνω στον ανθοφόρο βλαστό. Μορφολογικές μελέτες στο *Arabidopsis* έχει δείξει ότι οι ανθικές καταβολές εκδηλώνονται στις ίδιες καταβολές που παράγονται τα φύλλα κατά τη βλαστική φάση ανάπτυξης. Με βάση τη βιβλιογραφία, όταν το φυτό βρίσκεται κάτω από τις κατάλληλες επαγωγικές συνθήκες, οι καταβολές της βλαστικής φάσης μετατρέπονται σε ανθικές καταβολές ή παράγονται χιμαιρικά όργανα (Long και Barton, 2000). Επίσης, υπάρχουν αναφορές όπου αποδεικνύεται το γεγονός ότι μεταλλάξεις γονιδίων που αφορούν την ταυτότητα του ανθικού μεριστώματος (FMI, Floral Meristem Identity) έχουν ως αποτέλεσμα τα φυτά να συνεχίζουν να παράγουν φύλλα και βλαστούς ακόμα και μετά τη μετάβαση στην αναπαραγωγική φάση ανάπτυξης (Schultz and Haughn, 1991). Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη μοριακή χαρτογράφηση των ενθέσεων που απέδειξε ότι το φαινοτυπικό αποτέλεσμα δεν εξαρτάται από τη θέση ένθεσης της κατασκευής αποσιώπησης στο γένωμα των φυτών, δημιουργεί βάσιμες υποψίες για την αλλοίωση της ορθής μεταγώγισης των μηνυμάτων της άνθισης και την εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στο μηχανισμό της άνθισης. Η λειτουργία του μηχανισμού αποσιώπησης επιβεβαιώθηκε με μελέτη των επιπέδων έκφρασης και των τεσσάρων *Hsp90* γονιδίων, που παρουσίασαν δραματική μείωση σε σχέση με τον άγριο τύπο. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που να επιβεβαιώνουν την επίδραση των *Hsp90* γονιδίων στη διαδικασία της άνθισης. Έχει δειχθεί ότι φυτά με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων εμφανίζουν αλλοιωμένο χρόνο άνθισης (Sangster et al., 2007) και ότι η μείωση της έκφρασης επηρεάζει γενωματικές περιοχές ρύθμισης ποιοτικών χαρακτηριστικών (QTLs, Quantitative Trait Loci) που ελέγχουν χαρακτηριστικά της άνθισης (Sangster et al., 2008).

Η ανικανότητα παραγωγής ανθέων στα αρχικά *LFY::HSP90RNAi* φυτά αντιμετωπίστηκε με εφαρμογή θερμικών καταπονήσεων στους 37°C ώστε να υπερπηδηθεί η παρεμβολή της αποσιώπησης. Τα θερμικά σοκ προκάλεσαν πολλαπλασιασμό των μηνυμάτων των *Hsp90* γονιδίων στα μέρη του φυτού που παραμένουν λειτουργικά, παρέχοντας τη δυνατότητα να αντιμετωπιστεί η έλλειψη στο κορυφαίο μερίστωμα και το μονοπάτι της άνθισης να «κλείσει» με αποτέλεσμα το σχηματισμό ανθέων. Από τη φαινοτυπική παρατήρηση των απογόνων των φυτών που κατάφεραν να ανθίσουν προέκυψε μια σημαντική αντίθεση με τους

προγόνους: τα φυτά της T2 γενιάς παρήγαγαν άνθη τα οποία στη συνέχεια είχαν την ικανότητα να δέσουν σε καρποταξίες και να ολοκληρώσουν έτσι τα φυτά το βιολογικό τους κύκλο. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα φυτά της T3 γενιάς.

4.γ. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης των Hsp90 γονιδίων διαταράσσει τη λειτουργία των μονοπατιών της άνθισης

Όπως είναι γνωστό, η άνθιση είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο με πολλά μονοπάτια και ακόμα περισσότερα γονίδια. Οι φαινοτυπικές παραμορφώσεις που παρατηρήθηκαν στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά, συσχετίστηκαν με μετατροπές των προτύπων έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό της άνθισης. Μοριακές αναλύσεις γονιδίων πραγματοποιήθηκαν σε διάφορους ιστούς στην T1, T2 και T3 γενιά των φυτών όπου και παρατηρήθηκε επανάληψη του φαινότυπου της T2 γενιάς.

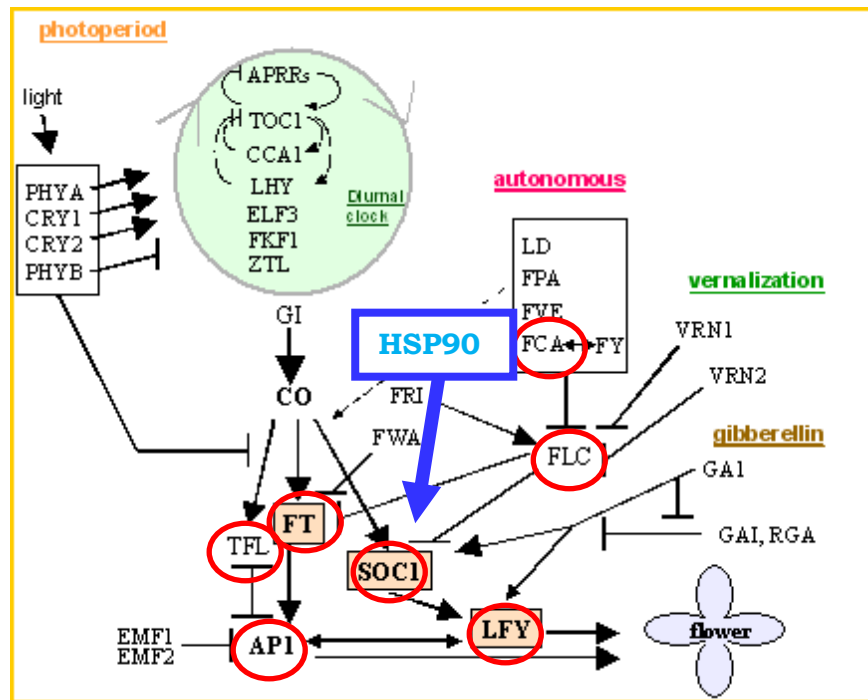
Στις T1 και T2 γενιές πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις για τα *Hsp90* κυτταροπλασματικά γονίδια αλλά και για κομβικά γονίδια της άνθισης όπως είναι τα *Soc1*, *Agl24*, *Ap1*, *Leafy* και *Cal*. Και στις δύο γενιές σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν οι εκφράσεις των παραπάνω γονιδίων ήταν παρόμοιες μεταξύ τους και δραματικά μειωμένες σε σχέση με τον άγριο τύπο. Σε πολλές περιπτώσεις δε, η έκφραση των μελετούμενων γονιδίων ήταν μη ανιχνεύσιμη. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι ελλείπει των *Hsp90* γονιδίων επηρεάζεται δραματικά η διαμεσολάβηση των μηνυμάτων της άνθισης με όλα τα κεντρικά γονίδια που δρουν στο κορυφαίο μεριστώμα κατά την αλλαγή της ταυτότητάς του να υπολειπονται στο μέγιστο βαθμό.

Στην T3 γενιά πραγματοποιήθηκε διεξοδικότερη ανάλυση των προτύπων έκφρασης όχι μόνο των παραπάνω γονιδίων αλλά και γονιδίων που αντιπροσωπεύουν το κάθε μονοπάτι της άνθισης ξεχωριστά. Επίσης, η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε και σε τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των φυτών. Πρώτον, σε μικρά φυτά ηλικίας 19 ημερών, δεύτερον σε απομονωμένα βλασικά μεριστώματα ηλικίας 24 ημερών και τέλος σε ανθικά μεριστώματα ηλικίας 34 ημερών. Οι δειγματοληψίες αυτές σκοπό είχαν να δείξουν από πιο σημείο της ανάπτυξης και μετά παρατηρείται αλλοίωση της έκφρασης των γονιδίων που μελετούνται ώστε να σχηματιστεί μια εικόνα σχετικά με το πώς έχει επιδράσει η μείωση της έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων στα μοριακά μονοπάτια της άνθισης των φυτών. Η ανάλυση έδειξε ότι στα μικρά φυτά τα *Hsp90* γονίδια εκφράζονται κανονικά, στα βλαστικά μεριστώματα αρχίζει να μειώνεται η έκφρασή τους και στα ανθικά πλέον μεριστώματα μειώνεται δραματικά. Τα μοριακά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των φυτών η κατασκευή αποσιώπησης δεν λειτουργεί. Η κατάσταση αυτή έρχεται σε συμφωνία με το πρότυπο έκφρασης του προαγωγέα *Leafy*, το οποίο είναι πολύ χαμηλό έως μη ανιχνεύσιμο στο στάδιο αυτό. Στην επόμενη ομάδα δειγμάτων των 24 ημερών, που παρατηρήθηκε η μείωση του προτύπου έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων, η έκφραση του γονιδίου *Leafy* αρχίζει να εμφανίζεται ομοιόμορφα τόσο μεταξύ των δειγμάτων όσο και σε σχέση με τον άγριο τύπο. Στα δείγματα των ανθικών μεριστωμάτων παρατηρείται αντίστοιχη μείωση στην έκφραση τόσο των *Hsp90* γονιδίων όσο και στο *Leafy* σε σχέση πάντα με τον άγριο τύπο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κατασκευή αποσιώπησης λειτουργεί στο μέγιστο βαθμό αλλά η δραματική μείωση των μηνυμάτων των *Hsp90* γονιδίων έχει επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου *Leafy* που πλέον δεν λειτουργεί κανονικά.

Σε γενικές γραμμές τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν στις ομάδες δειγμάτων των 19 και 24 ημερών δεν αποκλίνουν από τον άγριο τύπο. Από το μονοπάτι της μεγάλης ημέρας επιλέχθηκαν τα γονίδια *FD*,

FUL, *STM* και *TFL1*. Και τα τέσσερα γονίδια παρουσίασαν παρόμοια πρότυπα έκφρασης μεταξύ όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν δηλώνοντας ότι μέχρι τα φυτά να ολοκληρώσουν το βλαστικό στάδιο ανάπτυξης δεν επηρεάζεται η λειτουργία του μονοπατιού. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για το αυτόνομο μονοπάτι μιας και η ανάλυση των γονιδίων *FLC* και *FCA* έδειξε ασήμαντες διαφορές. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι αναλύσεις των γονιδίων *GA2ox2* και *GA3ox1* που αποτελούν γονίδια καταβολισμού και αναβολισμού του γιββερελλινικού οξέος αντίστοιχα. Και στις δύο ομάδες δειγμάτων παρατηρήθηκε συσσώρευση της έκφρασης του *GA2ox2* γονιδίου, με μεγαλύτερη συσσώρευση να παρουσιάζεται στα δείγματα των 19 ημερών. Όσον αφορά το *GA3ox1* γονίδιο, ενώ στα μικρά φυτά παρουσιάζεται μικρή συσσώρευση των μηνυμάτων του γονιδίου σε σχέση με τον άγριο τύπο, στα βλαστικά μεριστώματα παρατηρείται μεγάλη μείωση του προτύπου έκφρασης. Η μείωση αυτή αυξάνεται ακόμα περισσότερο όταν το κορυφαίο μεριστώμα έχει μεταβεί στην ανθική φάση ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πιθανώς τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά είναι ανίκανα να καταβολίσουν το γιββερελλινικό οξύ που παράγεται κατά τον αναβολισμό, κατάσταση που δηλώνει ότι δεν μπορεί να κλείσει ο κύκλος του γιββερελλινικού οξέος. Η ανικανότητα ολοκλήρωσης του κύκλου σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι της άνθισης δεν λειτουργεί σωστά ώστε να προάγει την άνθιση. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των *LFY::HSP90RNAi* φυτών σε συνθήκες μικρής ημέρας.

Οι συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας ανάπτυξης των φυτών, εκτός από ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές της εντάσεως του φωτός, χαρακτηρίζονται και από διαφορές σε μοριακό επίπεδο. Είναι γνωστό ότι προκειμένου να προαχθεί η άνθιση τα φυτά έχουν αναπτύξει τέσσερα κύρια μονοπάτια μεταγωγής των σημάτων της άνθισης και ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης αλλάζει η ιεράρχηση των μονοπατιών για την προαγωγή της. Σε συνθήκες μεγάλης ημέρας κύριο ρόλο κατέχει το μονοπάτι της φωτοπεριόδου και ακολουθούν με σειρά σημαντικότητας το αυτόνομο, γιββερελλινών και εαρινοποίησης. Σε συνθήκες μικρής ημέρας τον κύριο ρόλο κατέχει το μονοπάτι των γιββερελλινών και ακολουθούν το αυτόνομο, φωτοπεριόδου και εαρινοποίησης (Reeves and Coupland, 2001). Αναλύοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις συνθήκες μικρής ημέρας παρατηρούνται τα εξής. Το 50% των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν δεν άνθισε στις συνθήκες αυτές, ενώ το υπόλοιπο 50% άνθισε αρκετά καθυστερημένα σε σχέση με τον άγριο τύπο. Γενικά παρατηρήθηκε μεγάλη καθυστέρηση ως προς την ικανότητα των φυτών να παράγουν άνθη, κατάσταση που παρατηρήθηκε σε πολύ μικρότερο βαθμό στις συνθήκες μεγάλης ημέρας. Η παρατήρηση αυτή δηλώνει ότι η διαφορετική ιεράρχηση των μονοπατιών σε συνθήκες μικρής ημέρας επανέφερε ορισμένα από τα φυτά της T3 γενιάς στην αρχική κατάσταση που είχαν αντιμετωπίσει τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά της T1 γενιάς, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν τον αρχικό φαινότυπο, δηλαδή της μη άνθισης. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη μοριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δείχνουν ότι τουλάχιστον το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος είναι μη λειτουργικό και ανίκανο να προάγει την άνθιση. Παραμένει απενεργοποιημένο τόσο στις συνθήκες μεγάλης όσο και μικρής ημέρας, οπότε δεν μπορεί να συμβάλει στην άνθιση των φυτών που παρατηρείται τόσο στην T3 όσο και στην προηγούμενη T2 γενιά.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών της άνθισης και των γονιδίων που τα απαρτίζουν (Welch et al., 2004). Με κόκκινο κύκλο είναι σημειωμένα τα γονίδια που μελέτηθηκαν κατά τη μοριακή ανάλυση των προτύπων έκφρασης. Με μπλε τετράγωνο έχει σημειωθεί το HSP90 σύστημα μοριακού συνόδου που συμμετέχει στην προαγωγή της άνθισης.

4.6. Οι HSP90 αλληλεπιδρούν με κομβικά συστατικά του μονοπατιού της άνθισης

Το γεγονός ότι τα μετασχηματισμένα *LFY::HSP90RNAi* φυτά αδυνατούν να σχηματίσουν άνθη απουσία των *Hsp90* γονιδίων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανώς οι HSP90 πρωτεΐνες να εμπλέκονται σε κομβικά σημεία του μηχανισμού της άνθισης αφού τα αποτελέσματα της έλλειψής τους είναι τόσο δραματικά. Έχοντας υπόψη τις έρευνες στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* που δείχνουν ότι το 10% του πρωτεώματός της αλληλεπιδρά με την HSP82 (Zhao et al., 2005), πολύ πιθανόν οι HSP90 πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν με κάποια ή κάποιες πρωτεΐνες της άνθισης στο *Arabidopsis*. Ομολογίες βρέθηκαν μεταξύ της SOC1 (At2g45660) πρωτεΐνης του *Arabidopsis* (που θεωρείται κομβικό γονίδιο της άνθισης) και της YEP3 (YHL0009C) στη ζύμη, η οποία ανήκει επίσης χαρακτηρίζεται ως μεταγραφικός παράγοντας, όπως η SOC1 πρωτεΐνη. Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των HSP90-3 και SOC1 πρωτεϊνών με διαφορετικές τεχνολογικές προσεγγίσεις υπέδειξε τόσο *in planta* όσο και *in vivo* οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Η SOC1 πρωτεΐνη αποτελεί κομβική και απαραίτητη πρωτεΐνη για τη μεταγωγή σιγνάλων που προέρχονται από όλα σχεδόν τα κύρια μονοπάτια της άνθισης. Εκτός από αυτό, πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι αφού αλληλεπιδράσει με την AGL24 πρωτεΐνη, εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων για να ενεργοποιήσει το γονίδιο *Leafy* και να προαχθεί η άνθιση (Lee et al., 2008). Συγκεκριμένα, η SOC1 δημιουργεί ετεροσύμπλοκο με την AGL24 (De Folter et al., 2005) και στη συνέχεια το σύμπλοκο αυτό εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων και ενεργοποιεί τον προαγωγέα του γονιδίου *Leafy* με απευθείας πρόσδεση της SOC1 πρωτεΐνης σε ρυθμιστικές περιοχές του προαγωγέα. Διττός φαίνεται να είναι ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίζει η HSP90 σε αυτό το σημείο του μονοπατιού. Πιθανώς η SOC1 πρωτεΐνη να είναι ανίκανη να τροποποιείται και

να λαμβάνει την ορθή διαμόρφωση που τη θέτει σε λειτουργική κατάσταση. Η αλληλεπίδρασή της με την HSP90 που λειτουργεί ως μοριακός συνοδός, επιτρέπει την τροποποίηση και διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης της SOC1 πρωτεΐνης, προάγοντας τοιουτοτρόπως την αλληλεπίδραση με την AGL24 πρωτεΐνη. Δεύτερον, η HSP90 μπορεί να είναι απαιτείται για τη μετακίνηση του συμπλόκου SOC1/AGL24 στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να ενεργοποιηθεί το γονίδιο *Leafy*. Υπάρχει βέβαια η πιθανότητα οι δυο παραπάνω ρόλοι της HSP90 να δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, να χρειάζεται τόσο για τη λήψη και διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης της SOC1 πρωτεΐνης όσο και για την είσοδο του συμπλόκου στον πυρήνα των κυττάρων.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα ζωικά συστήματα, έχουν δείξει ότι για να μετακινηθούν οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να προσδεθούν στα υποστρώματά τους, χρειάζονται παρουσία της HSP90. Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στους υποδοχείς οιστρογόνων (Devin-Leclerc et al., 1998, Elbi et al., 2004) όσο και στους υποδοχείς γλουκοκορτικοειδών ορμονών (Katar et al., 2006; Echeverria et al., 2009; Elbi et al., 2004). Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στο μοντέλο ότι ο υποδοχέας σχηματίζει ετεροσύμπλοκο με την HSP90 το οποίο εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων. Στη συνέχεια η HSP90 αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα ώστε να μπορέσει ο υποδοχέας να προσδεθεί στην αντίστοιχη ορμόνη (Echeverria et al., 2009). Στο *Arabidopsis*, έχει παρατηρηθεί παρόμοια εμπλοκή της HSP90 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασινοστεροειδών ορμονών. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η HSP90 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των μπρασινοστεροειδών ορμονών BR11 αλλά επίσης αλληλεπιδρά και με τον μεταγραφικό παράγοντα BIN2 βοηθώντας στην ολοκλήρωση του μονοπατιού (Σαμακοβλή Δέσποινα, προσωπική επικοινωνία).

Ένα παρόμοιο μοντέλο μπορεί να προταθεί και για την εμπλοκή του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού στην άνθιση. Η αλληλεπίδραση της HSP90 πρωτεΐνης με την SOC1 μπορεί να συμβάλλει τόσο στη λήψη της ορθής διαμόρφωσης της SOC1, που την καθιστά ικανή να αλληλεπιδράσει με την AGL24, όσο και στη διατήρηση της κατάστασης της πρωτεΐνης ή του συμπλόκου για να μπορέσει να αναγνωριστεί από τους υποδοχείς των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης και να ολοκληρωθεί η μετακίνηση στον πυρήνα των κυττάρων. Η ανικανότητα ικανοποιητικής ενεργοποίησης του *Leafy* παρατηρείται και από τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων μελέτης της έκφρασης των γονιδίων που πραγματοποιήθηκαν στο κορυφαίο ανθικό μερίστωμα. Στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά η έκφραση του γονιδίου *Soc1* είναι σε παρόμοια επίπεδα σε σχέση με τον άγριο τύπο, ενώ η έκφραση του *Agl24* είναι μειωμένη. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Leafy* είναι δραματικά μειωμένα σε σχέση με τον άγριο τύπο. Τα δεδομένα αυτά επιδεικνύουν ότι παρόλο που τα αρχικά γονίδια του συγκεκριμένου σινιάλου είναι λειτουργικά, αδυνατούν να ολοκληρώσουν την ενεργοποίηση του *Leafy*, πολύ πιθανώς λόγω της έλλειψης των HSP90.

Μέχρις στιγμής μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο *Arabidopsis* έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών επηρεάζουν μονοπάτια απόκρισης σε βιοτροφικά παράσιτα, μικροβιακά παθογόνα και ιούς. Οι μοναδικές πρωτεΐνες, μέχρι σήμερα, που έχουν χαρακτηριστεί ως υποστρώματα του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού στο *Arabidopsis* είναι οι R πρωτεΐνες που λειτουργούν στην άμυνα των φυτών ενάντια όλων των παραπάνω παθογόνων (Sangster et al., 2007; Salathia και Queitsch, 2007). Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν αποδείξει το ρόλο των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων στην ανθεκτικότητα εναντίον ασθενειών. Οι Liu et al., (2004) έδειξαν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα δύο πιο βασικά γονίδια της αμυντικής αντίδρασης των φυτών, *Sgt1* και *Rar1* γονίδια, καθώς και με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας N που προσδίδει ανθεκτικότητα για τον ιό του μωσαϊκού του καπνού. Οι Takahashi et al.

(2003), εξέτασαν τη συμμετοχή των *Hsp90* γονιδίων στα μονοπάτια ανθεκτικότητας του *Arabidopsis* που περιείχαν τα R γονίδια *Rpm1* και *Rps2*.

4.ε. Αλλοίωση της φαινοτυπική πλαστικότητας/καναλοποίησης λόγω της έλλειψης των HSP90

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι HSP90 πρωτεΐνες συμμετέχουν ενεργά στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών εναντίων διαφόρων τύπων εχθρών και μολύνσεων μέσω της αλληλεπίδρασή τους με τις R πρωτεΐνες. Η επαγωγή αμυντικών αντιδράσεων αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα φαινοτυπικής πλαστικότητας αφού οι R πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται και να αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον προκειμένου να ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού. Η αλληλεπίδραση των HSP90 με τις R πρωτεΐνες πιθανώς συμβάλλει στη διατήρηση της πλαστικότητας που χαρακτηρίζει τις R πρωτεΐνες, αφού έλλειψη των HSP90 πρωτεϊνών αλλοιώνει την ικανότητα των φυτών να αποκρίνονται στους εχθρούς και τις μολύνσεις. Εκτός από το μηχανισμό της άμυνας, το σύμπλοκο των HSP90 μοριακών συνοδών έχει την ικανότητα να αντιλαμβάνεται το περιβάλλον και να επάγει τα κατάλληλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ανάλογα με την περίπτωση. Παράδειγμα αποτελεί η απόκριση νεαρών φυτών *Arabidopsis* που μεγαλώνουν στο σκοτάδι παρουσία του φαρμάκου ιζελνιταμυκίνη, που αποτελεί αναστολέα των HSP90 πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ελλείψει των HSP90, επηρεάζεται δραματικά η επιμήκυνση των υποκοτυλίων των φυτών (Queitsch et al., 2002). Ομοίως, το εύρος της επιμήκυνσης της ρίζας, η απόκριση στη βαρύτητα και το πρασίνισμα του φυτού παρουσία φωτός επίσης εξαρτώνται από τις HSP90. Όταν αναστέλλεται η λειτουργία των HSP90, παρατηρείται αύξηση στην ποικιλομορφία τουλάχιστον των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών. Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν ότι το σύμπλοκο του HSP90 μοριακού συνοδού πολύ πιθανώς να σταθεροποιεί την ανάπτυξη στα φυτά (Queitsch et al., 2002). Κάτι αντίστοιχο όμως δεν έχει παρατηρηθεί στη μύγα *Drosophila melanogaster* (Milton et al., 2003).

Άλλο ένα παράδειγμα φαινοτυπικής πλαστικότητας αποτελεί ο χρόνος άνθισης στο *Arabidopsis*. Ο χρόνος άνθισης είναι μείζονος σημασίας για τη διαμόρφωση της σωστής ανάπτυξης του φυτού. Επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η ποιότητα και η ένταση του φωτός, η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία και η επάρκεια θρεπτικών στοιχείων (Samach and Coupland, 2000). Φυσιολογικές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πλαστικότητα που παρουσιάζει η άνθιση έγκειται στο γεγονός ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ των μηνυμάτων που επάγουν την άνθιση αλλά και των κατασταλτικών διαδικασιών, που περιλαμβάνουν τα μετακινούμενα μηνύματα της ενεργοποίησης και καταστολής αντίστοιχα (Perilleux and Bernier, 2002). Στο *Arabidopsis*, ο μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων των γονιδίων που εμπλέκονται στο χρόνο άνθισης έχει οδηγήσει σε μοντέλα που περιγράφουν τη γενετική ρύθμιση του χρόνου άνθισης. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις αλληλεπιδράσεις των πολλαπλών μονοπατιών για την επαγωγή της άνθισης (Simpson and Dean, 2002). Παρόλο που η φαινοτυπική πλαστικότητα έχει μελετηθεί κυρίως στο πεδίο της οικολογίας και της εξέλιξης μέσω των αλληλεπιδράσεων του γενότυπου με το περιβάλλον, υπάρχουν και μελέτες που ασχολούνται σε επίπεδο οργανισμού με τη μελέτη των αναπτυξιακών λειτουργιών και με την επίδραση που ασκούν στην πλαστικότητα του οργανισμού (Pigliucci, 1997; Ruteau et al., 2004; Ruteau et al., 2006). Φαινοτυπική παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε σε 80 μεταλλάγματα *Arabidopsis* που ανθίζουν πρόωρα έδειξε ότι όλα τα μεταλλάγματα παρουσίαζαν

πλαστικότητα ως προς την απόκρισή τους στο φως, το σκοτάδι και τη φωτοπερίοδο. Δηλαδή, παρόλο που το βασικό χαρακτηριστικό των μεταλλαγμάτων ήταν η πρόωρη άνθιση, εντούτοις μεταξύ τους εμφάνιζαν ποικίλες φαινοτυπικές διαφορές ως προς τα διάφορα χαρακτηριστικά της άνθισης. Τα πλειοτροπικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν υποδηλώνουν ότι η αδυναμία καταστολής της άνθισης μπορεί να συνδέεται με διαταραχές στην ανάπτυξη που λαμβάνουν χώρα σε ολόκληρο το φυτό παρόλο που η κάθε μετάλλαξη αφορά μόνο ένα γονίδιο της άνθισης (Routeau et al., 2004).

Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των φαινοτύπων καθυστερημένου χρόνου άνθισης των *LFY::HSP90RNAi* φυτών. Παρόλο που όλα τα αρχικά μετασχηματισμένα φυτά παρουσίαζαν το κοινό φαινότυπο της καθυστερημένης άνθισης με πλήρη απουσία ανθέων σε σχέση με τον άγριο τύπο, εντούτοις μεταξύ τους εμφάνιζαν αρκετές διαφορές. Τα χαρακτηριστικά στα οποία διέφεραν τα φυτά μεταξύ τους ήταν ο αριθμός φύλλων ροζέτας, η εμφάνιση ή απουσία κεντρικού βλαστού, το ύψος του κεντρικού βλαστού και ο αριθμός των πλευρικών βλαστών. Προσεκτική παρατήρηση των φυτών έδειξε ότι ενώ το κάθε ξεχωριστό αποτέλεσμα μετασχηματισμού παρουσίασε σε σχέση με τα υπόλοιπα τον ίδιο βασικό φαινότυπο, στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλομορφία. Όμως, στα μετασχηματισμένα αυτά φυτά δεν έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση κάποιου γονιδίου που να προκαλεί καθυστερημένη άνθιση αλλά των *Hsp90* κυτταροπλασματικών γονιδίων. Επίσης, η μοριακή ανάλυση των φυτών έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων ήταν δραματικά μειωμένα. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται προφανές ότι η μείωση των *HSP90* πρωτεϊνών διαταράσσει την κανονικότητα της άνθισης των φυτών που πηγάζει από την αλλοίωση της φαινοτυπικής πλαστικότητας. Τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά είναι ανίκανα να ανθίσουν γιατί έχει διαταραχθεί στο μέγιστο βαθμό η ικανότητά τους να ρυθμίζουν το χρόνο άνθισης λόγω της έλλειψης των *Hsp90* κυτταροπλασματικών γονιδίων.

Η ανάλυση των *LFY::HSP90RNAi* φυτών αποκαλύπτει επίσης την ανικανότητα των φυτών να ρυθμίσουν την πορεία των αναπτυξιακών και μορφογενετικών διαδικασιών τους. Η μελέτη τόσο των φαινοτύπων όσο και η μοριακή ανάλυση δείχνει ότι η απουσία των *Hsp90* γονιδίων καθιστά τα φυτά ανίκανα να διατηρήσουν τη φαινοτυπική κανονικότητά τους, παράγοντας φαινοτύπους που αποκλίνουν δραματικά από τον άγριο τύπο. Η παρατήρηση των ανθέων των μετασχηματισμένων φυτών έδειξε αυτό ακριβώς το συμπέρασμα. Καλλοειδείς δομές αδιαφοροποίητων κυττάρων, φυλλοειδείς κατασκευές ή τρομερά αλλοιωμένα άνθη ήταν η κύρια εικόνα που εμφανίζονταν στις ανθικές καταβολές των *LFY::HSP90RNAi* φυτών. Η μείωση της λειτουργίας των *HSP90* πρωτεϊνών επέφερε διεύρυνση των ορίων του εύρους των κανονικών φαινοτύπων που μπορεί να εμφανίσει το *Arabidopsis*, αφήνοντας να εκδηλωθούν ποικίλοι φαινότυποι που απέκλιναν τρομερά από τον άγριο τύπο. Μελέτες που έχουν γίνει σε T-DNA μεταλλάγματα των *Hsp90* γονιδίων έχουν δείξει ότι μείωση της έκφρασης των γονιδίων προκαλεί επέκταση των ορίων μέσα στα οποία έχει την ικανότητα να κινηθεί ένας φαινότυπος αγρίου τύπου και όσο περισσότερο μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων τόσο απομακρύνονται τα όρια μεταξύ τους. Η απομάκρυνση των ορίων οδηγεί σε ακόμα εντονότερες φαινοτυπικές αποκλίσεις οι οποίες μεγιστοποιούνται όσο περισσότερο μειώνεται η έκφραση των *Hsp90* γονιδίων, φτάνοντας τελικά στο μέγιστο βαθμό που είναι ο θάνατος του οργανισμού (Samakovli et al., 2007).

Είναι γνωστό ότι οι αναπτυξιακές διαδικασίες που ευθύνονται για την αύξηση και ανάπτυξη των οργανισμών βρίσκονται κάτω από το μανδύα της στοχαστικότητας. Τα στοχαστικά φαινόμενα λαμβάνουν χώρα μέσα στον οργανισμό, επηρεάζονται από το περιβάλλον και έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή φαινοτύπων μέσα σε έναν πληθυσμό οι οποίοι κυμαίνονται μέσα στα

επιτρεπτά φυσιολογικά όρια που ορίζονται από τις HSP90 πρωτεΐνες (Samakovli et al., 2007). Η διατάραξη της κανονικής λειτουργίας των HSP90 πρωτεϊνών στο κορυφαίο μεριστώμα του *Arabidopsis*, προκάλεσε την εμφάνιση φαινοτύπων στα άνθη οι οποίοι απέκλιναν δραματικά από τον άγριο τύπο. Η πληθώρα των φαινοτύπων που παρουσιάστηκαν αποτελεί κυρίαρχη ένδειξη απώλειας ελέγχου ρύθμισης της ανάπτυξης. Η επιλογή του ανθικού μεριστώματος για τη δημιουργία τέλει άνθους, ατελούς άνθους ή οποιασδήποτε παραμόρφωσης εξαρτάται από την κατανομή των μηνυμάτων των μονοπατιών η οποία όμως είναι στοχαστική.

Αξιοσημείωτο παράδειγμα ρύθμισης που ασκούν οι HSP90 πρωτεΐνες στα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού αποτελεί η μελέτη του άκρως συντηρημένου αριθμού και τοποθέτησης των θωρακικών και λεπιδωτών τριχών στη μύγα *Drosophila melanogaster* (Milton et al., 2006). Παρατηρήθηκε ότι ενώ ο αριθμός και η τοποθέτηση των λεπιδωτών και θωρακικών τριχών σε μεταλλαγμένα *hsp90* έντομα επηρεάστηκε δραματικά, άλλα χαρακτηριστικά όπως ο κυμαινόμενος εκ φύσεως τύπος των τριχών και το μέγεθος των φτερών αλλά και η εκ φύσεως ασυμμετρία μεταξύ δεξιού και αριστερού φτερού παρέμειναν σχετικά ανεπηρέαστα. Επίσης, τόσο το μέγεθος όσο και η κατεύθυνση της φαινοτυπικής αλλοίωσης ήταν αδύνατο να προβλεφθεί, μιας και παρουσιάστηκε τρομερή ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών φαινοτυπικών γεγονότων που παρατηρήθηκαν μέσα στον ίδιο πληθυσμό. Μέσα από αυτό το παράδειγμα, φαίνεται ότι το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού χαρακτηρίζεται από μια εκλεκτικότητα ως προς τα χαρακτηριστικά που ρυθμίζει. Η επιλογή τείνει προς χαρακτηριστικά που εμφανίζονται σταθερά και κληρονομούνται αυστηρά στον πληθυσμό αγρίου τύπου, ενώ χαρακτηριστικά που από τη φύση τους παρουσιάζουν έναν κυμαινόμενο φαινότυπο δεν βρίσκονται κάτω από τη ρύθμιση των HSP90 πρωτεϊνών. Η ίδια συντηρητικότητα χαρακτηρίζει και τον μηχανισμό της άνθισης στο φυτό *Arabidopsis*. Παρόλο που στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρούνται διακυμάνσεις ως προς τον αριθμό φύλλων ροζέτας, το μήκος ρίζας και άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, η άνθιση ως τελικό αποτέλεσμα της ανάπτυξης του φυτού είναι σταθερή και παρατηρείται σε οποιοδήποτε φυτό μέσα σε έναν πληθυσμό αγρίου τύπου. Τα μονοπάτια που απαρτίζουν το μηχανισμό της άνθισης είναι άκρως συντηρημένα και ο υψηλός αριθμός εναλλακτικών μονοπατιών και αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονοπατιών δηλώνει την κυρίαρχη σημασία και των αυστηρό έλεγχο κάτω από τον οποίο βρίσκεται ο μηχανισμός. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούν βασικό ρυθμιστή των διαδικασιών της άνθισης, αφού η έλλειψή τους έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη ανικανότητα για αναπαραγωγή και διαίωση των φυτών. Ενδεχομένως, οι HSP90 να παίζουν το ρόλο του ενορχηστρωτή της αναπτυξιακής διαδικασίας της άνθησης. Ο ρόλος του ενορχηστρωτή είναι εξαιρετικά σημαντικός και πολύπλοκος καθώς καλείται να αποφασίσει ποιες πρωτεΐνες θα συμμετάσχουν στην διεκπεραίωση της άνθησης, είναι εκείνος που θα αποφασίσει για τις δυναμικές που θα έχουν σε διάφορες συνθήκες (π.χ. φωτοπερίοδου) οι εκτελεστές (μονοπάτια άνθησης) και να καθορίσει τις σχέσεις που μπορεί να αναπτυχθούν μεταξύ τους,

4.στ. Η ανεπάρκεια των HSP90 προκαλεί ανωμαλίες στον επιγενετικό έλεγχο

Τα δεδομένα των φαινοτυπικών και μοριακών χαρακτηρισμών αλλά και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η κυτταροπλασματική *Hsp90* οικογένεια γονιδίων διαδραματίζει εξέχον ρόλο στην

άνθιση του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγούμαστε λόγω της ανικανότητας των φυτών να ανθίσουν και να αναπαραχθούν απουσία των *Hsp90* γονιδίων, αφού είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση της HSP90 πρωτεΐνης με τις κομβικές πρωτεΐνες της άνθισης SOC1 και AGL24 ώστε να επαχθεί ο μηχανισμός της άνθισης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η δραματική φαινοτυπική διαφορά μεταξύ των γενεών των *LFY::HSP90RNAi* φυτών. Ενώ τα αρχικά φυτά χρειάστηκαν την επίδραση ενός εξωτερικού παράγοντα, της θερμικής καταπόνησης, ώστε να παράγουν άνθη, τα φυτά των επόμενων γενεών παρήγαγαν άνθη σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Δηλαδή παρατηρείται ένα φαινόμενο κατά το οποίο η απώλεια της ικανότητας άνθισης που παρουσιάστηκε στα αρχικά *LFY::HSP90RNAi* φυτά, τροποποιήθηκε στις επόμενες γενέες και εγκαθιδρύθηκαν και κληρονομήθηκαν χαρακτηριστικά που δίνουν τη δυνατότητα στα φυτά να ανθίζουν αυτόνομα. Η γενίκευση αυτής της παρατήρησης εννοεί ότι το περιβαλλοντικό στρες μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην κατάσταση των φυτών οι οποίες κληρονομούνται στις επόμενες γενιές. Το συμπέρασμα αυτό αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό της επιγενετικής κληρονομικότητας.

Είναι γνωστό ότι το γένωμα που χαρακτηρίζει όλους τους ζωντανούς οργανισμούς περιέχει την νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA που περιλαμβάνει όλες τις πληροφορίες για την ύπαρξη, ανάπτυξη και κληρονομικότητα των οργανισμών. Υπάρχει όμως και το επιγένομα. Σαν επιγένομα, ορίζεται μία γενετική κατάσταση που διαμορφώνει την δράση των γονιδίων και κληρονομείται από τη μια γενιά στην επόμενη, χωρίς όμως να επηρεάζεται στο ελάχιστο η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος του οργανισμού. Το επιγένομα εκφράζεται με δυο τρόπους: είτε με την προσθήκη ή αφαίρεση μεθυλομάδων (CH₃) στα νουκλεοτίδια κυτοσίνης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA, είτε με τροποποιήσεις των ιστονών πρωτεϊνών που απαρτίζουν τη χρωματίνη. Και οι δυο περιπτώσεις αντιπροσωπεύουν επιγενετικά φαινόμενα που εγκαθιδρύονται και κληρονομούνται μέσα στους οργανισμούς.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η επιγενετική κατάσταση ενός οργανισμού μπορεί να εκτιμηθεί με τη βοήθεια των ακολουθιών του 5S ριβοσωμικού NA (5S rRNA) και της κεντρομερικής ακολουθίας (CEN). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αναλύθηκε το επιγένομα διαφόρων *LFY::HSP90RNAi* σειρών τόσο σε συνθήκες μεγάλης όσο και μικρής ημέρας. Στις συνθήκες μεγάλης ημέρας τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά παρουσίασαν πρότυπο υπομεθυλίωσης σε σχέση με τον άγριο τύπο. Είναι γνωστό ότι το γένωμά του *Arabidopsis thaliana* είναι μεθυλιωμένο σε ποσοστό 24%, ποσοστό που αντιπροσωπεύει την ανενεργή ετεροχρωματινική περιοχή των κεντρομερών. Το χαρακτηριστικό αυτό αποτυπώνεται στις αναλύσεις κατά Southern της μελέτης των προτύπων μεθυλίωσης. Σε σχέση με αυτή την αποτύπωση, το πρότυπο του μεθυλιώματος των *LFY::HSP90RNAi* φυτών παρουσιάζεται μειωμένο αφού τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν τις θέσεις πέψης που κανονικά είναι απενεργοποιημένες στον άγριο τύπο (βλ. αποτελέσματα). Δηλαδή, τα φυτά όπου τα επίπεδα έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων είναι μειωμένα παρουσιάζουν υπομεθυλιωμένο επιγενετικό πρότυπο.

Η εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στη διατήρηση του μεθυλιώματος των οργανισμών αποτελεί έναν τομέα αρκετά μελετημένο στα ζώα. Οι Sollars et al. (2003) έκαναν μια σημαντική ανακάλυψη όσον αφορά την εμπλοκή των HSP90 σε μοριακά μοντέλα επιγενετικής ρύθμισης. Αλλοιώνοντας την έκφραση του *hsp90* γονιδίου στη *Drosophila*, είτε μέσω μεταλλάξεων είτε μέσω φαρμακευτικής αναστολής, παρατήρησαν ότι εμφανίστηκε ένας πολύ ιδιαίτερος φαινότυπος στο μάτι της μύγας. Ο φαινότυπος αυτός ήταν κληρονομήσιμος στις επόμενες γενιές ακόμα και απουσία επιλεκτικής πίεσης, αλλά επίσης παρατηρήθηκε αλλαγή στην κατάσταση της χρωματίνης που επηρέαζε συνολικά τα επίπεδα ακετυλίωσης της H3 ιστόνης μέσα στον οργανισμό. Συγχρόνως, παρατήρησαν ότι μεταλλάξεις στο *trithorax* γονίδιο της οικογένειας TrxG, που αποτελούν πρωτεΐνες χρωματίνης που

ρυθμίζουν την τύχη κυττάρων κατά την ανάπτυξη μέσω ελέγχου επιγενετικών μονοπατιών μαζί μέλη της Polycomb ομάδας, εμφάνιζαν τον ίδιο ακριβώς φαινότυπο. Μετά από επιλογή των εντόμων μέχρι και έξι γενιές για το νέο χαρακτηριστικό, τους δόθηκε τροφή που περιείχε αναστολείς αποακετυλασών (HDAC). Παρατηρήθηκε ότι έντομα που προέκυψαν είτε από μετάλλαξη της HSP90 πρωτεΐνης, είτε από φαρμακευτική αναστολή της, είτε από μεταλλάξεις του *trithorax* γονιδίου κατάφεραν να αντιστρέψουν το φαινότυπο. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι η αλλαγή αυτή στην κατάσταση της χρωματίνης ήταν υπεύθυνη για επιγενετική κληρονομηση του φαινοτύπου του ματιού και ότι η HSP90 πρωτεΐνη συσχετίζεται με την κληρονομηση του χαρακτηριστικού αυτού. Πιο πρόσφατα, περαιτέρω ανάλυση του φαινομένου απέδειξε ότι προκειμένου να μπορεί να εκφραστεί το *trithorax* γονίδιο, απαιτείται η HSP90 για να διατηρεί την περιοχική της χρωματίνης ενεργή (Tariq et al., 2009). Μέσα από τις μελέτες αυτές φαίνεται πως η HSP90 πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει ένα σπουδαίο και υψηλά συντηρημένο εξελικτικά επιγενετικό δίκτυο που ελέγχει κυρίως αναπτυξιακά και κυτταρικά μονοπάτια ενός οργανισμού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκλίνουν με την έρευνα των Zhao et al. (2005) που πραγματοποίησαν στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* η οποία δείχνει ότι ανάμεσα στο πλήθος των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν είτε φυσικά είτε γενετικά με την HSP82 υπάρχουν και αρκετές πρωτεΐνες που ανήκουν στα INO80 και SWR-C σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν έντονα την πιθανότητα να υπάρχει λειτουργική σύνδεση μεταξύ των HSP90 πρωτεϊνών και των μηχανισμών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τουλάχιστον στη ζύμη. Από τη στιγμή βέβαια που οι HSP90 αποτελούν μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών μεταξύ όλων των οργανισμών, από τα κατώτερα αρχαιοβακτήρια έως τον άνθρωπο, είναι λογικό να υποθέσει κάποιος ότι και στους υπόλοιπους οργανισμούς θα υπάρχει ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλοεπιδράσεων (Wong και Houry, 2006).

Εκτός από αυτά, υπάρχουν παραδείγματα στη βιβλιογραφία που αποδεικνύουν τη συμμετοχή επιγενετικών στοιχείων στην κληρονομηση φαινοτύπων που επάγονται από τις HSP90. Έχει προταθεί ότι στοχευόμενη μεθυλίωση του DNA και τροποποιήσεις της χρωματίνης που μπορεί να συνδέονται λειτουργικά με τις HSP90 πρωτεΐνες, είναι επιγενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα πρότυπα ενεργοποίησης ή αποσιώπησης ενός γονιδίου κληρονομούνται χωρίς να υπάρχουν αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο CARM1, το οποίο συμμετέχει στη μεθυλίωση της αργινίνης 17 στην ιστόνη H3, συσχετίζεται με τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής (Beato και Klug, 2000). Ο ER ρυθμίζεται από τις HSP90 με τον εξής τρόπο: η παρουσία οιστρογόνων επάγει την απελευθέρωση του ER από τις HSP90 ο οποίος μπορεί να ενωθεί πλέον με τα οιστρογόνα και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων που εξαρτώνται από αυτόν. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η SMYD3 πρωτεΐνη στον άνθρωπο (μεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης 4 στην ιστόνη 3) που προκειμένου να δρα ικανοποιητικά απαιτεί την παρουσία των HSP90 πρωτεϊνών (Hamamoto et al., 2004). Επίσης, η μελέτη του πρωτεώματος της ζύμης (Zhao et al., 2005) αποκάλυψε ότι η HSP90 αλληλεπιδρά με τις Tah1p και Pih1p πρωτεΐνες, που συσχετίζονται με τον Rvb1p παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.

Προφανώς, λόγω της συντηρητικότητας της οικογένειας των HSP90 πρωτεϊνών να υπάρχει επίσης και συμμετοχή τους στη διατήρηση των προτύπων μεθυλίωσης στο *Arabidopsis*. Η επιγενετική σταθερότητα αποτελεί ουσιαστική παράμετρο της ορθής φυσιολογικής ανάπτυξης ενός οργανισμού και οι HSP90 πρωτεΐνες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας αυτής. Η δραματική μείωση των επιπέδων έκφρασης των *Hsp90* γονιδίων στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά φαίνεται να προκαλεί αποδιοργάνωση των

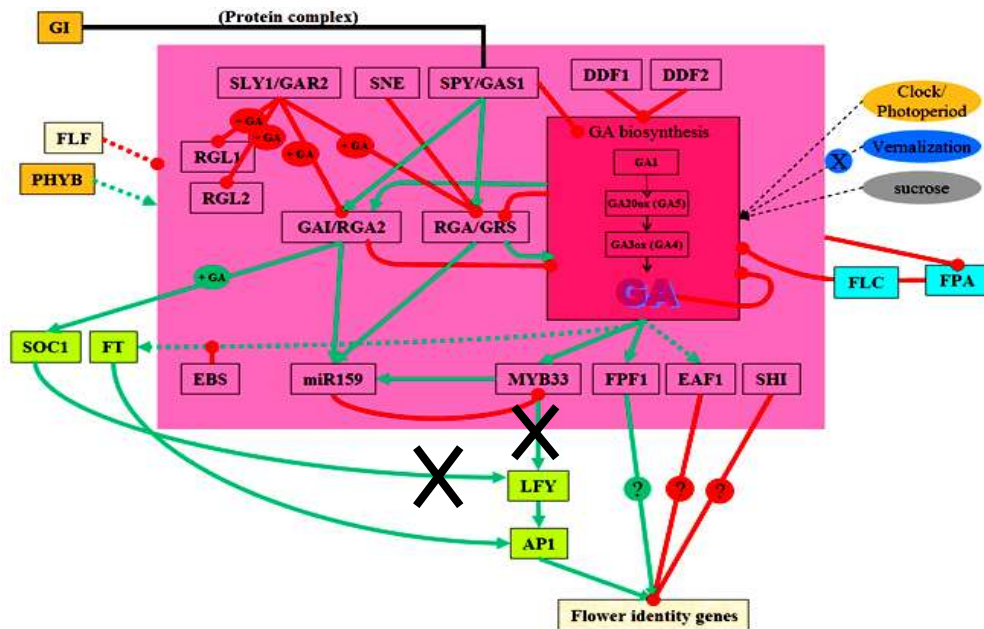
μηχανισμών που ελέγχουν την επιγενετική σταθερότητα των φυτών. Λόγω της αποδιοργάνωσης αυτής, πραγματοποιούνται αλλαγές στο μεθυλίωμα των μετασχηματισμένων φυτών με φαινοτυπικά αποτελέσματα που αντιπροσωπεύονται από την ικανότητα άνθησης των φυτών.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασε η ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από τις αναλύσεις των φυτών που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες μικρής ημέρας. Όταν τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά τοποθετηθούν σε θάλαμο ανάπτυξης με συνθήκες μικρής ημέρας, παρατηρείται δραματική μείωση της ικανότητας άνθησης. Ο παρατηρούμενος φαινότυπος αποτελείται από ενδιάμεση και ακραία κατάσταση. Από το σύνολο των φυτών που μελετήθηκαν, ορισμένα άνθισαν έσω και καθυστερημένα σε σχέση με τον άγριο τύπο, ενώ τα υπόλοιπα φυτά δεν άνθισαν καθόλου. Η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης των δύο αυτών ομάδων φυτών έδειξε ότι το πρότυπο μεθυλίωσης των φυτών που ανθίζουν είναι παρόμοιο με τον άγριο τύπο ενώ τα φυτά που δεν ανθίζουν παρουσιάζουν αντίθετο πρότυπο μεθυλίωσης. Δηλαδή παρατηρείται ότι φυτά που ενώ σε συνθήκες μεγάλης ημέρας παρουσιάζουν αντίθετο πρότυπο από τον άγριο τύπο, σε συνθήκες μικρής ημέρας μερικά παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο και ανθίζουν και μερικά παρουσιάζουν αντίθετο πρότυπο και δεν ανθίζουν.

Η διαφορά των προτύπων μεθυλίωσης στις συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας συσχετίζεται με την ιεράρχηση των μονοπατιών στις εκάστοτε συνθήκες. Η διαφορά στην ικανότητα άνθησης σε συνθήκες μικρής ημέρας έγκειται στο γεγονός ότι τα φυτά αντιλαμβάνονται διαφορετικά το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος, που είναι και το κυρίαρχο, ή έχουν ενεργοποιήσει σε διαφορετικό βαθμό εναλλακτικούς δρόμους προκειμένου να επιτευχθεί η άνθιση. Πιθανώς, τα διαφοροποιημένα πρότυπα μεθυλίωσης μεταξύ των δειγμάτων να σχετίζονται με την ικανότητα των δειγμάτων να κρατούν ενεργοποιημένο το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος ή την ικανότητα ενεργοποίησης των εναλλακτικών μονοπατιών για την ολοκλήρωση της άνθησης. Η διαφορά αυτή στο φαινότυπο της άνθησης πιθανώς να οφείλεται στα διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης των φυτών. Δηλαδή, η διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης των μετασχηματισμένων φυτών μεταξύ των συνθηκών μεγάλης και μικρής ημέρας επιτρέπει στα φυτά να ανθίζουν στις συνθήκες μεγάλης ημέρας και όχι στις μικρής ημέρας. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος είναι απενεργοποιημένο και η άνθιση στις συνθήκες μεγάλης ημέρας οφείλεται σε άλλο μονοπάτι. Βέβαια, στις συνθήκες μεγάλης ημέρας, η μελέτη αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται τόσο στη διαμεσολάβηση των μηνυμάτων της άνθησης όσο και στο χαρακτηρισμό της ταυτότητας του μεριστώματος έδειξε τρομερά μειωμένα με σχεδόν μη ανιχνεύσιμα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων αυτών, γεγονός που δηλώνει ότι η άνθιση οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς ή μονοπάτια που δεν αντιπροσωπεύονται από τα τέσσερα κυρίαρχα μονοπάτια που όμως συσχετίζονται με τις γιββερελλίνες. Στα φυτά αυτά φαίνεται το μονοπάτι των γιββερελλινών να είναι ανοικτό και να λειτουργεί σε κάποιο βαθμό. Τα φυτά αυτά παρουσιάζουν πρότυπο μεθυλίωσης όμοιο με τον άγριο τύπο.

Σύμφωνα με έρευνα των Jacobsen et al. (1999), σε υπομεθυλιωμένο γενετικό υπόβαθρο το *Arabidopsis* έχει την ικανότητα να μεθυλιώνει επιλεκτικά συγκεκριμένους γενετικούς τόπους. Συγκεκριμένα έδειξαν ότι σε μεταλλάγματα γονιδίων που οδηγούν σε υπομεθυλίωση του γενώματος των φυτών, συμβαίνει υπερμεθυλίωση περιοχής του προαγωγέα των *Sup* και *Ag* γονιδίων. Αφού και στα *LFY::HSP90RNAi* φυτά παρατηρείται μείωση στη μεθυλίωση του DNA, μελετήθηκαν ορισμένοι προαγωγείς γονιδίων-κλειδιών της άνθησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά εμφανίζουν μεθυλίωση στην περιοχή του προαγωγέα του *Lfy* γονιδίου και συγκεκριμένα στην περιοχή που βρίσκεται η νουκλεοτιδική περιοχή πρόσδεσης του *Myb33* γονιδίου. Το *Myb33* είναι ένα βασικό γονίδιο του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος μέσω του

οποίου το συγκεκριμένο μονοπάτι ενεργοποιεί το *Lfy* γονίδιο προκειμένου να επαχθεί η άνθιση. Φαίνεται ότι από τη στιγμή που τα *LFY::HSP90RNAi* φυτά δεν μπορούν πλέον να χρησιμοποιήσουν το *Lfy* γονίδιο για την επαγωγή της άνθισης, λόγω της ανικανότητας ενεργοποίησής του από το *Soc1* γονίδιο, απενεργοποιούν και το εναλλακτικό μονοπάτι που πηγάζει από το γιββερελλινικό οξύ.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των επιμέρους μονοπατιών που απαρτίζουν το μονοπάτι του γιββερελλινικού οξέος. Με μαύρο x έχουν επισημανθεί τα δυο μονοπάτια ενεργοποίησης του *Lfy* γονιδίου. Το πρώτο μονοπάτι ενεργοποίησης απορρέει από το *Soc1* γονίδιο, το οποίο είναι μη λειτουργικό λόγω της έλλειψης των HSP90 πρωτεϊνών. Το δεύτερο μονοπάτι απορρέει από το *Myb33* γονίδιο, το οποίο είναι μη λειτουργικό λόγω της αλλαγής της κατάστασης μεθυλίωσης που έχει υποστεί ο προαγωγέας του *Lfy* γονιδίου.

Ολοκληρώνοντας, είναι προφανής η ρύθμιση που ασκεί η *Hsp90* οικογένεια γονιδίων στην ανάπτυξη των φυτών. Η μελέτη και των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας έγινε δυνατή μέσω του RNAi μηχανισμού. Η αποσιώπηση στη φάση της ανθικής μετάβασης είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μετασχηματισμένων φυτών ανίκανων να ανθίσουν και να αναπαραχθούν. Στη συνέχεια, η εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στην άνθιση επιβεβαιώθηκε με τον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων των HSP90 με δυο κομβικές πρωτεΐνες της άνθισης, τη SOC1 και τη AGL24. Επίσης, η έλλειψη των HSP90 μείωσε την ικανότητα του φυτών για ρύθμιση των επιπέδων μεθυλίωσής τους, κατάσταση που επέτρεψε στα φυτά να δημιουργήσουν αλλαγές στο μεθυλίωμά τους και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της άνθισης. Τα δεδομένα αυτά επιδεικνύουν πόσο αξιοσημείωτη είναι η δυναμική των HSP90 πρωτεϊνών στον έλεγχο της ανάπτυξης στα φυτά.

5. Βιβλιογραφία

- **Abe** M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K and Araki T (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309:1052-1056.
- **Ali** MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C and Pearl LH (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440:1013-1017.
- **Albanese** V, Yam AY, Baughman J, Parnot C and Frydman J (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124:75-88.
- **Ancel** LW and Fontana W (2000). Plasticity, evolvability, and modularity in RNA. *J Exp Zool* 288:242-283.
- **Arndt** V, Rogon C and Hohfeld J (2007). To be or not to be – molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* 6:2525-2541.
- **Bachman** KE, Rountree MR, Baylin SB (2001). Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 276:32282-32287.
- **Bardwell** JCA and Craig EA (1988). Ancient heat shock protein is dispensable. *J Bacteriol* 172:6042-6047.
- **Beato** M and Klug J (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update* 6:225-236.
- **Bell** JT and Spector TD (2011). A twin approach to unraveling epigenetics. *Trends Genet* 27:116-125.
- **Bergelson** J, Kreitman M, Stahl EA and Tian D (2001). Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* 292:2281-2285.
- **Bernstein** BE, Meissner A and Lander ES (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128:669-681.
- **Birnby** DA, Link EM, Vowels JJ, Tian H, Colacurcio PL and Thomas JH (2000). A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11₁ and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155:85-104.
- **Blazquez** MA, Soowal L, Lee I and Weigel D (1997). Leafy expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* 124:3835-3844.
- **Blazquez** 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.
- **Blazquez** MA and Weigel D (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404:889-892.
- **Blazquez** MA, Ahn JH and Weigel D (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 33:168-171.
- **Blazquez** MA, Ferrandiz C, Madueno F and Parcy F (2006). How floral meristems are built. *Plant Molecular biology* 60:855-870.
- **Blomen** VA and Boonstra J (2011). Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol Life Sci* 68:27-44.
- **Boss** PK, Bastow RM, Mylne JS and Dean C (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16:Suppl, S18-31.
- **Calderwood** SK, Khaleg MA, Sawyer DB and Ciocca DR (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*,31:164-172.
- **Cao** D, Froehlich JE, Zhang H, Cheng CL (2003). The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant cr88 encodes a chloroplast-targeted HSP90. *Plant Journal* 33:107-118.
- **Cao** Y, Dai Y, Cui S and Ma L (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS C regulates flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2566-2602.

- **Carrello** A, Ingley E, Minchin RF, Tsai S and T Ratajczak (1999). The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90. *J Biol Chem* 274:2682–2689.
- **Cazzonelli** CI, Cuttriss AJ, Cossetto SB, Pye W, Crisp P, Whelan J, Finnegan EJ, Turnbull C and Pogson BJ (2009). Regulation of carotenoid composition and shoot branching in Arabidopsis by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell* 21: 39–53.
- **Cedar** H and Bergman Y (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Genetics* 10:295-304.
- **Chapman** EJ and Carrington JC (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* 8:884–896.
- **Chen** T, Ueda Y, Xie S and Li E (2002). A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *Journal Biol Chem* 277:38746-38754.
- **Cokus** SJ, Fenq S, Zhanq X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M and Jacobsen SE (2008). Shotgun bisulfite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452:215-219.
- **Colombo** L, Franken J, Koetje E, Vanwent J, Dons HJM, Angenent GC and Van Tunen AJ (1995). The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *The Plant Cell* 7:1859–1868.
- **Cowen** LE and Lindquist S (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309:2185-89.
- **Dangl** JL and Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833.
- **Dobson** CM (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426:884-890.
- **Dobson** CM (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* 15:3–16.
- **Eckhardt** F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koeing C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K and Beck S. DNA methylation profilin of human chromosomes 2, 20 and 22. *Nature Genetics* 38:1378-1385.
- **Ehrenreich** IM, Hanzawa Y, Chou L, Roe JL, Kover PX and Purugganan MD (2009). Candidate gene association mapping of Arabidopsis flowering time. *Genetics* 183:325-335.
- **Ellis** RJ (2006). Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci* 31:395–401.
- **Eshel** I and Matessi C (1998). Canalization, genetic assimilation and preadaptation. A quantitative genetic model. *Genetics* 149:2119–2133.
- **Esser** C, Alberti S and Hohfeld J (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1695:171-188.
- **Feng** S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C, Sadler KC, Pradhan S, Pellegrini M and Jacobsen SE (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8689–8694.
- **Ferrell** JEr (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs [see comments]. *Trends Biochem Sci* 21:460–466.
- **Fisher** RA (1930). The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon.
- **Fletcher** JC (2002). Shoot and floral meristem maintenance in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* 53:45–66.
- **Flor** H (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol* 9:275-296.
- **Gangaraju** VK, Yin H, Weiner MM, Wang J, Huang XA and Lin H (2011). Drosophila Piwi functions in Hsp90-mediated suppression of phenotypic variation. *Nature Genetics* 43:153-158.

- **Garcia-Gardena** G, Fan R, Shah V, Sorrentinos R, Cirino G, Papapetropoulos A and Sessa WC (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824.
- **Gehring** M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg RB and Fischer RL (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124:495-506.
- **Gehring** M and Henikoff S (2007). DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim Biophys Acta* 1769:276-286.
- **Gehring** M, Bubb KL and Henikoff S (2009). Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science* 324:1447-1451.
- **Genereux** DP (2005). A population-epigenetic model to infer site-specific methylation rates from doublestranded DNA methylation patterns. *Proc. Natl Acad Sci USA* 102:5802-5807.
- **Gerhart** J and Kirschner M (1997). *Cells, embryos, and evolution*. Malden, MA: Blackwell Science.
- **Gibson** G and Wagner G (2000). Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? *Bio Essays* 22:372-380.
- **Glickman** MH and Ciechanover A (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428.
- **Goethe** JWv (1790). *Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu Erklären*. C.W. Ettinger, Gotha, Germany.
- **Groth** A, Rocha W, Verreault A and Almouzni G (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128:721-733.
- **Hahn** JS (2009). The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB reports* 623-630.
- **Hamamoto**, R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R and Nakamura Y (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6:731-40.
- **Harris** RA, Wang T, Coarfa C, Nagarajan RP, Hong C, Downey SL, Johnson BE, Fouse SD, Delaney A, Zhao Y, Olshen A, Ballinger T, Zhou X, Forsberg KJ, Gu J, Echipare L, O'Green H, Lister R, Petizzola M, Xi Y, Epstein CB, Bernstein BE, Hawkins RD, Ren B, Chung WY et al (2010). Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nature Biotechnology* 28:1097-1105.
- **Hartl** FU and Hayer-Hartl M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852-1588.
- **Henderson** IA and Dean C (2004). Control of Arabidopsis flowering time: the chill before the bloom. *Development* 131:3829-3838.
- **Henderson** IR and Jacobsen SE (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447:418-424.
- **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 Journal* 21:4327-4337.
- **Holliday** R (1994). Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.*, 15:453-457.
- **Holt** SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE and White MA (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes & Dev* 13: 817-826.
- **Hsieh** TF, Ibarra CA, Silva P, Zemach A, Eshed-Williams L, Fischer RL and Zilberman D (2009). Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science* 324:1451-1454.
- **Huh** JH, Bauer MJ, Hsieh TF and Fischer RL (2008). Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell* 132:735-744.
- **Ishiguro** S, Watanabe Y, Ito N, Nonaka H, Takeda N, Sakai T, Kanaya H and Okada K (2002). SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *Embo Journal* 21:898-908.

- **Izawa** T, Takahashi Y and Yano M (2003). Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* 6:113-120.
- **Jascur** T, Brickner H, Salles-Passador I, Barbier V, El Khissiin A, Smith B, et al (2005). Regulation of p21(WAF1/CIP1) Stability by WISp39, a Hsp90 Binding TPR Protein. *Mol Cell* 17:237-49.
- **Jiang** J, Prasad K, Lafer EM and Sousa R (2005). Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* 20:513-524.
- **Jiang** D, Wang Y, Wang Y and He Y (2008). Repression of FLOWERING LOCUS C and FLOWERING LOCUS T by the Arabidopsis Polycomb repressive complex 2 components. *PLoS ONE* 3:e3404.
- **Johannes** F (2009). Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet* 5:e1000530.
- **Jurgens** G (2001). Apical-basal pattern formation in Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J* 20:3609-3616.
- **Kaufmann** K, Melzer R and Theissen G (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347:183-198.
- **Kim** DH, Doyle MR, Sung S and Amasino RM (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:277-299.
- **Kobayashi** Y and Weigel D (2007). Move on up, its time to change – mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes and Development* 21:2371-2384.
- **Koshland** DEJr, Goldbeter A and Stock JB (1982). Amplification and adaptation in regulatory and sensory systems. *Science* 217:220-225.
- **Kosmaoglou** M, Schwarz N, Bett JS and Cheetham ME (2008). Molecular chaperones and photoreceptor function. *Prog Eye Res* 27:434-449.
- **Kouzarides** T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- **Kriaucionis** S and Heintz N (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 15:929-930.
- **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. *Nature reviews* 6:688-698.
- **Lai** BT, Chin NW, Stanek AE, Keh W, and Lanks KW (1984). Quantitation and intracellular localization of the 85 K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol Cell Biol* 4:2802-2810.
- **Law** JA and Jacobsen SE (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature* 11:204-220.
- **Lawton-Rauh** AL, Buckler 4th ES and Purugganan MD (1999). Patterns of molecular evolution among paralogous floral homeotic genes. *Molecular Biology Evolution* 16:1037-1045.
- **Lee** YT, Jacob J, Michowski W, Nowotny M, Kuznicki J and Chazin WJ (2004). Human Sgt1 binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 domain and not the tetratricopeptide repeat domain. *J Biol Chem* 279:16511-7.
- **Lee** J, Oh M, Park H and Lee I (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. *The Plant Journal* 55:832-843.
- **Lee** J and Lee I (2010). Regulation and function of Soc1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* 61:2247-2254.
- **Liang** G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22:480-491.
- **Liljgren** SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS and Yanofsky MF (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell* 11:1007-1018.

- **Lister** R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Fillipini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B and Ecker JR (2009). Nature 462:315-322.
- **Liu** Y, Burch-Smith T, Schiff M, Feng S and Dinesh-Kumar SP (2004). Molecular chaperone Hsp90 associates with Resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and RAR1 to modulate an innate immune response in plants. The Journal of Biological Chemistry 16:2101-2108.
- **Liu** C, Chen H, Er HL, Soo HM, Kumar PP, Han JH, Liou YC and Yu H (2008). Direct interaction of Agl24 and Soc1 integrates flowering signals in Arabidopsis. Development 135:1481-1491.
- **Long** J and Barton MK (2000). Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis Dev Biol 218: 341–353.
- **Louvion** JF, Warth R and Picard D (1996). Two eukaryote-specific regions of Hsp82 are dispensable for its viability and signal transduction functions in yeast. PNAS USA 93:13937-13942.
- **Mandel** MA and Yanofsky MF (1995). A gene triggering flower formation in Arabidopsis. Nature 377:522-524.
- **Mayer** MP and Bukau B (1999). Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. Curr Biol 9: R322–R325.
- **Mc Adams** HH and Arkin A (1997). Stochastic mechanisms in gene expression. PNAS USA 94:814–819.
- **Meiklejohn** CD and Hartl DL (2002). A single mode of canalization. Trends Ecol Evol 17:468–473.
- **Melzer** S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A and Beeckman T (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana. Nature Genetics 40:1489–1492.
- **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, Ditta G, Gustafson-Brown C, Pelaz S, Yanofsky M and Amasino RM (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. Plant Journal 33:867-874.
- **Milton** CC, Huynh B, Batterham P, Rutherford SL, and Hoffmann AA (2003). Quantitative trait symmetry independent of Hsp90 buffering: distinct modes of genetic canalization and developmental stability. Proc Natl Acad Sci USA 100:13396–13401.
- **Milton** CC, Ulane CM and Rutherford S (2006). Control of canalization and evolvability by Hsp90. PLOS one 1:e75.
- **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 gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. Plant Journal 35:613-623.
- **Moon** J, Lee H, Kim M and Lee I (2005). Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 46:292-299.
- **Mosher** RA, Melnyk CW, Kelly KA, Dunn RM, Studholme DJ and Baulcombe DC (2009). Uniparental expression of PolIVdependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. Nature 460:283–286.
- **Nathan** DF, Vos MH and Lindquist S (1999). Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. Proc Natl Acad Sci USA 96, 1409–1414.
- **Nijhout** HF, Berg AM and Gibson WT (2003). A mechanistic study of evolvability using the mitogen-activated protein kinase cascade. Evol Dev 5: 281–294.
- **Nollen** EA and Morimoto RI (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. J Cell Sci 115:2809–2816.
- **Ogiso** H, Kagi N, Matsumoto E, Nishimoto M, Arai R, Shirouzu M, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y and Yokoyama S (2004). Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. Biochemistry 43:15510–15519.

- **Orphanides** G and Reinberg D (2000). RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407:471–475.
- **Panaretou** B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH and Prodromou C (2002). Activation of the ATPase activity of Hsp90 by the stress regulated cochaperone Aha1. *Molecular Cell* 10:1307-1318.
- **Parcy** F (2005). Flowering: a time for integration. *Int J Den Biol* 49:585-593.
- **Park** SJ, Suetsugu S and Takenawa T (2005). Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *Embo Journal* 24:1557-1570.
- **Pearl** LH (2005). Hsp90 and Cdc37- a chaperone cancer conspiracy. *Current Opinion in Genetics and Development* 15:55-61.
- **Pearl** LH and Prodormou C (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75: 271-294.
- **Pelaz** S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky and MF (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405:200–203.
- **Penterman** J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S and Fischer RL (2007). DNA methylation in the Arabidopsis genome. *PNAS* 104:6752-6757.
- **Pharis** RP and King RW (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu Rev Plant Physiol* 36:517–568.
- **Picard** D (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59:1640–1648.
- **Pineiro** R (1992). Selection for canalization at extra dorsocentral and scutellar bristles in *Drosophila melanogaster*. *J Hered* 83:445–448.
- **Poethig** RS (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250:923-930.
- **Pratt** WB and Toft DO (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 228: 111-133.
- **Pratt** WB, Galigiana MD, Morishima Y and Murphy PJ (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40:41-58.
- **Queitsch** C, Sangster TA and Lindquist S (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417:618-624.
- **Ramsahoye** BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP and Jaenisch R (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5237-5242.
- **Rapoport** TA (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450:663–669.
- **Reeves** PH and Coupland G (2001). Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiology* 126:1085-1091.
- **Reik** W (2007). Review article. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447:425-432.
- **Rendel** JM (1967). Canalisation and gene control. London: Logos Press.
- **Rice** JC and Allis CD (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13:263–273.
- **Richter** K and Buchner J (2001). Hsp90: Chaperoning signal transduction. *Journal of Cellular Physiology* 188: 281-290.
- **Richter** K, Hendershot LM and Freeman BC (2007). The cellular world according to Hsp90. *Nature structural and molecular biology* 14:90-94.
- **Ruden** DM and Lu X (2008). Hsp90 affecting chromatin remodeling might explain transgenerational epigenetic inheritance in *Drosophila*. *Current Genomics* 9:500-508.
- **Rutherford** SL (2000). From genotype to phenotype: buffering mechanisms and the storage of genetic information. *Bioessays* 22:1095–1105.
- **Rutherford** SL (2003). Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nature Genetics Reviews*, 263:4.

- **Rutherford** SL and Lindquist S (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 26:336–342.
- **Rye** HS, Roseman AM, Chen S, Furtak K, Fenton WA, Saibil HR and Horwich AL (1999). GroEL–GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell* 97:325–338.
- **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, Thanou A, Valmas C and Hatzopoulos P (2007). Hsp90 canalizes developmental perturbation. *Journal of Experimental Botany* 58:3513–3524.
- **Salathia** N and Queitsch C (2007). Molecular mechanisms of canalization: Hsp90 and beyond. *J Biosci* 32:457–463.
- **Sangster** TA, Lindquist S and Queitsch C (2004). Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. *BioEssays* 26:348–362.
- **Sangster** TA and Queitsch C (2005). The Hsp90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current Opinion in Plant Biology* 8:86–92.
- **Sangster** 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:e648.
- **Sato** K and Siomi H (2010). Is canalization more than just a beautiful idea? *Genome Biology* 11:109.
- **Schmahausen** II (1986). *Factors of evolution: the theory of stabilizing selection*. University of Chicago Press (1949) reprinted.
- **Schmitz** RJ and Amasino RM (2007). Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769:269–275.
- **Schulze-Lefert** P (2004). Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol* 14:R22–24.
- **Scroggins** BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N and Neckers L (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* 12: 151–159.
- **Simpson** P, Woehl R and Usui K (1999). The development and evolution of bristle patterns in Diptera. *Development* 126:1349–1364.
- **Simpson** GG and Dean C (2002). *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science* 296:285–289.
- **Slotkin** RK and Martienssen R (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8:272–285.
- **Sollars V**, Lu X, Wang X, Garfinkel MD and Ruden DM (2003). Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor of morphological evolution. *Nature Genetics* 33:70–74.
- **Soltis** DE, Chanderbali AS, Kim S, Buzgo M and Soltis PS (2007). The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Annals of Botany* 100:155–163.
- **Specchia** V, Piacentini L, Tritti 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 letters* 463:662–665.
- **Steeves** TA and Sussex IM (1989). *Patterns in Plant Development*. Cambridge Univ. Press, New York.
- **Stoutjesdijk** PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA and Green AG (2002). hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol* 129: 1723–1731.
- **Strathdee** G and Brown R (2002). Proposed mechanism by which DNA methylation leads to transcriptional repression. *Expert Reviews in Molecular Medicine* (02)00424–6a.
- **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.

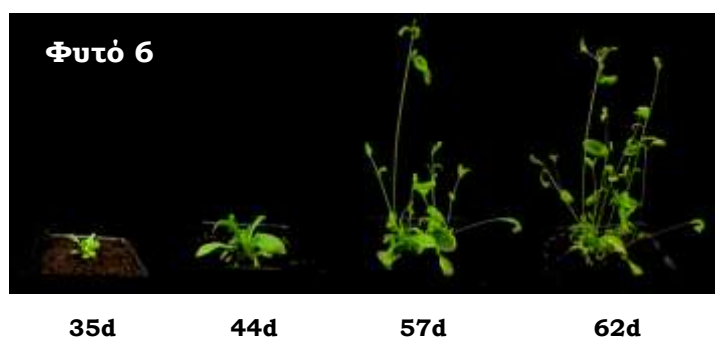
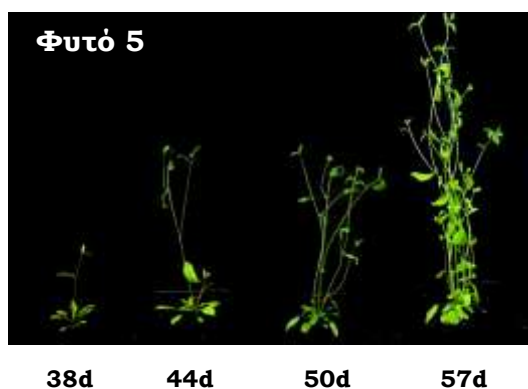
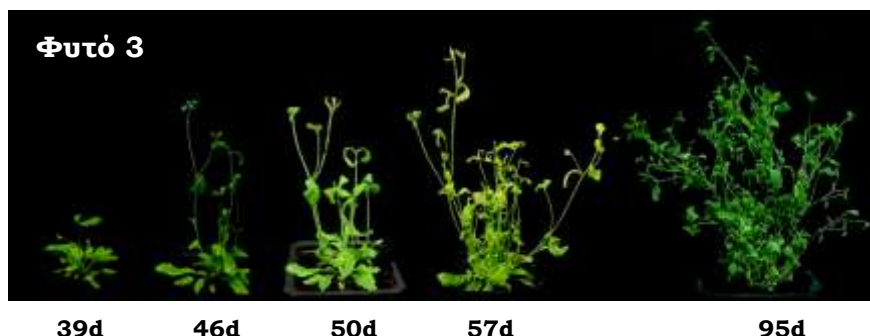
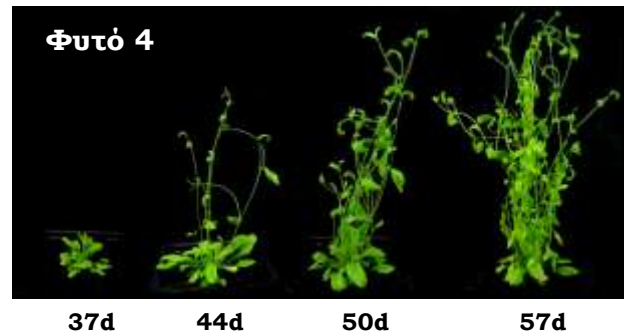
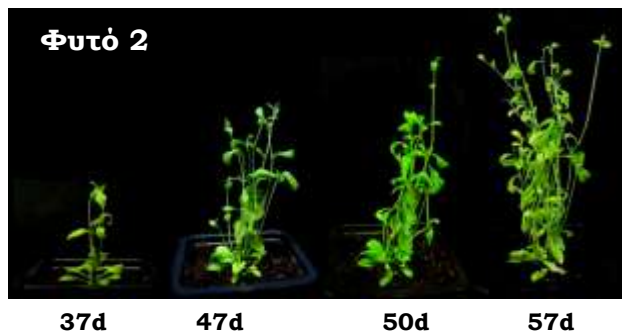
- **Suzuki** MM and Bird A (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9:465-476.
- **Takada** S and Goto K (2003). TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by *CONSTANS* in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* 15:2856-2865.
- **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.
- **Tanaka** N and Nakamoto H (1999). HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett* 458:117-123.
- **Theissen** G (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4:75-85.
- **Tomala** K and Corona R (2008). Molecular chaperones and selection against mutations. *Biology Direct* 3:5.
- **Turner** BM (2009). Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:3403-3418.
- **Twyman** RM (2003). Flowering and reproduction. University of York, York, UK Elsevier Ltd.
- **Valverde** F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A and Coupland G (2004). Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science* 303:1003-1006.
- **Yu** H, Ito T, Wellmer F and Meyerowitz EM (2004). Repression of *AGAMOUS-LIKE 24* is a crucial step in promoting flower development. *Nature Genetics* 36:157-161.
- **Waddington** CH (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150:563-565.
- **Waddington** CH (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7:118-126.
- **Waddington** CH (1956). Genetic assimilation of bithorax phenotype. *Evolution* 10:1-13.
- **Wagner** GP, Booth G and Bagheri-Chaichian H (1997). A population genetic theory of canalization. *Evolution* 51:329-347.
- **Wagner** D, Sablowski RWM and Meyerowitz, EM (1999). Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science* 285:582-584.
- **Wandinger** SK, Suhre MH, Wegele H and Buchner J (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* 25:367-376.
- **Weber** M, Hellmann I, Stabler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M and Schubeler D. Distribution silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics* 39: 457-466.
- **Weigel** D, Alvarez J, SmythDR, Yanofsky MF and Meyerowitz EM (1992). Leafy controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 29:843-859.
- **Weigel** D and Meyerowitz EM (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78:203-209.
- **Weigel** D (1995). The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis. *Annu Rev Genet* 29:19-39.
- **Weigel** D and Nilsson O (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377:495-500.
- **Wickner** S, Maurizi MR and Gottesman S (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286:1888-1893.
- **Wigge** PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU and Weigel D (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309:1056-1059.
- **Wilkins** AS (1986). Genetic analysis of animal development. New York: John Wiley and Sons.
- **Wilson** RN, Heckman JW and Somerville CR (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* 100: 403-408.

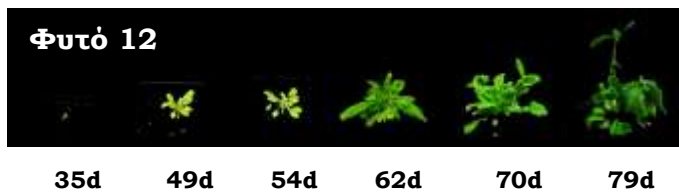
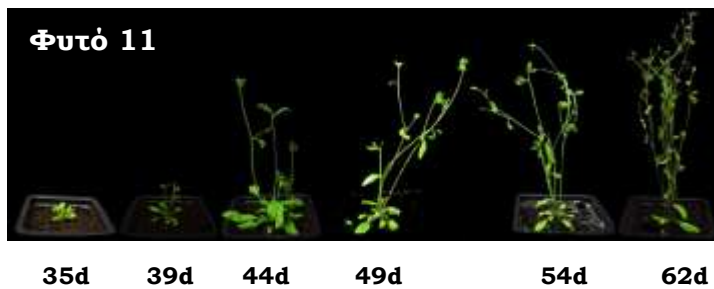
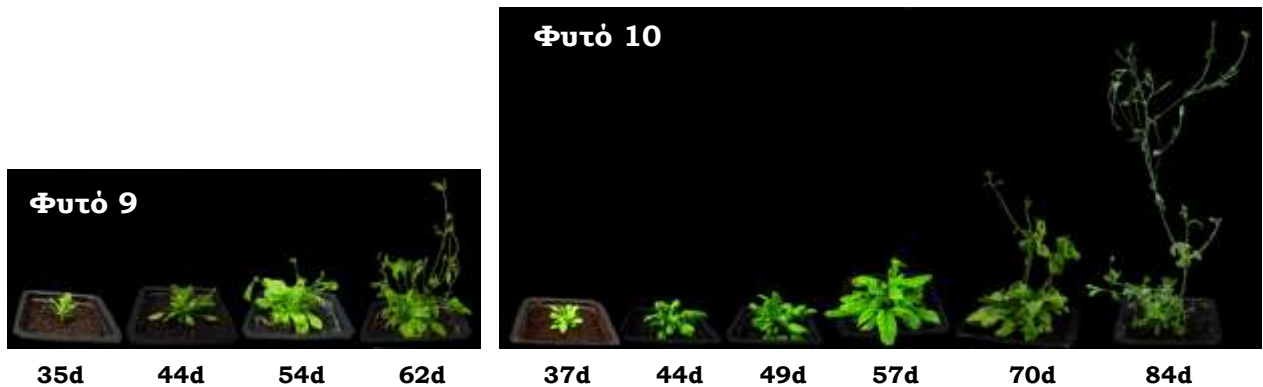
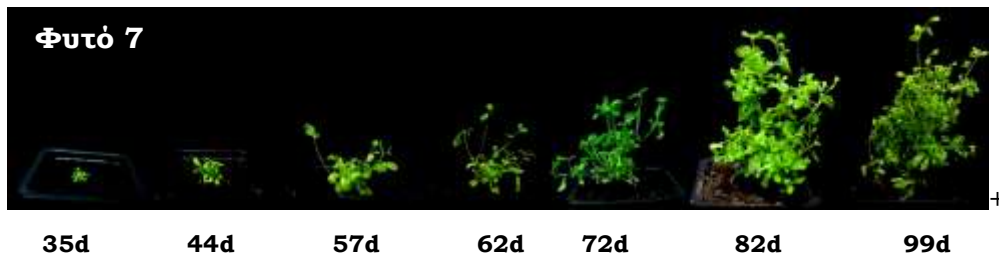
- **Wong** KS and Houry WA (2006). Hsp90 at the crossroads of genetics and epigenetics. *Cell Res* 16:742-9.
- **Wu** X, Dinneny JR, Crawford KM, Rhee Y, Citovsky V, Zambryski PC and Weigel D (2003). Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex. *Development* 130:3735–3745.
- **Xu** M, Long C, Chen X, Huang C, Chen S and Zhu B (2010). Partitioning of histone H3–H4 tetramers during DNA replication-dependent chromatin assembly. *Science* 328:94–98.
- **Yamada** K, Fukao Y, Hayashi M, Fukazawa M, Suzuki I and Nishimura M (2007). Cytosolic Hsp90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in Arabidopsis thaliana. *The Journal of Biological Chemistry* 282:37794-37804.
- **Yarchuk** O, Jacques N, Guillerez J and Dreyfus M (1992). Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *J Mol Biol* 226: 581-596.
- **Young** JC, Hoogenraad NJ and Hartl FU (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112:41-50.
- **Yue** L, Karr TL, Nathan DF, Swift H, Srinivasan S and Lindquist S (1999). Genetic analysis of viable hsp90 alleles reveals a critical role in Drosophila spermatogenesis. *Genetics* 151:1065--1079.
- **Zhao** R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek A, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, Boone C, Emili A and Houry WA (2005). Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone. *Cell* 120:715-727.
- **Zhang** M, Boter M, Li K, Kadota Y, Panaretou B, Prodromou C, Shirasu K and Pearl LH (2008). Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. *The EMBO journal* 27: 2789-2798.
- **Zilberman** D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T and Henikoff S (2007). Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* 39:61-69.

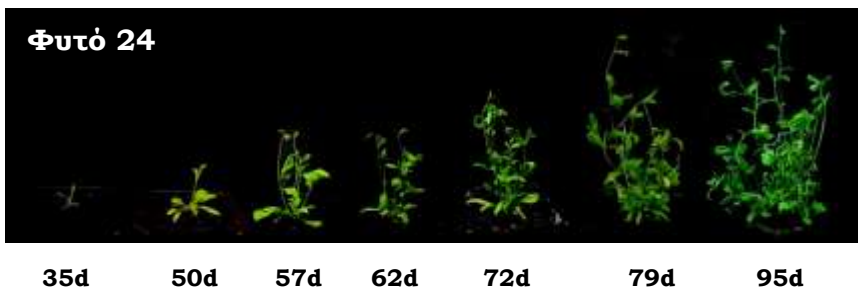
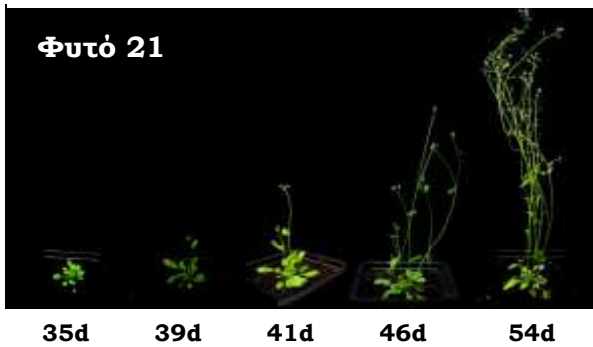
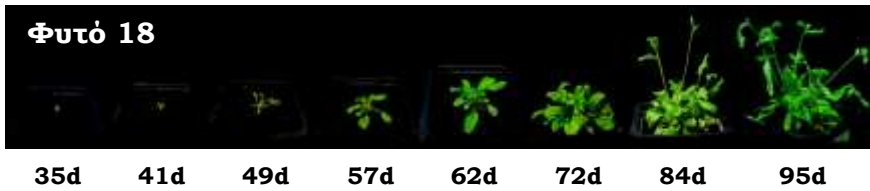
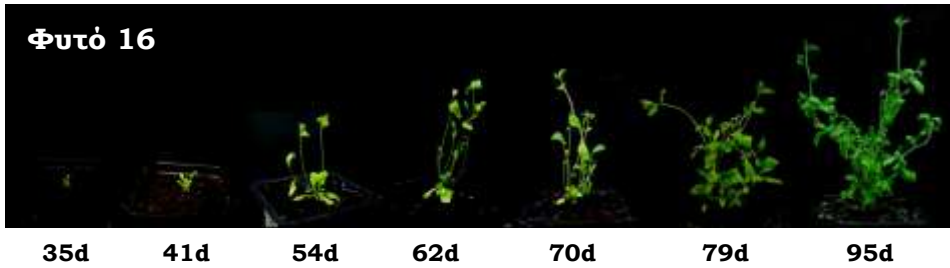
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αναπτυξιακά στάδια φυτών T1 γενιάς

Ενδεικτικές φωτογραφίες κατά την πορεία της ανάπτυξης φυτών αγρίου τύπου και *LFY::HSP90RNAi* μετασχηματισμένων φυτών T1 γενιάς. Κάτω από κάθε φωτογραφία επισημαίνεται η ηλικία του φυτού σε ημέρες (d).







Αναπτυξιακά στάδια φυτών της T2 γενιάς

Ενδεικτικές φωτογραφίες κατά την πορεία της ανάπτυξης φυτών αγρίου τύπου και *LFY::HSP90RNAi* μετασχηματισμένων φυτών T2 γενιάς. Κάτω από κάθε φωτογραφία επισημαίνεται η ηλικία του φυτού σε ημέρες (d).



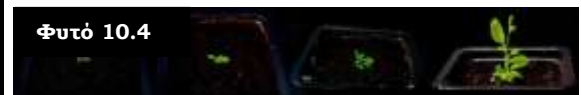
20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



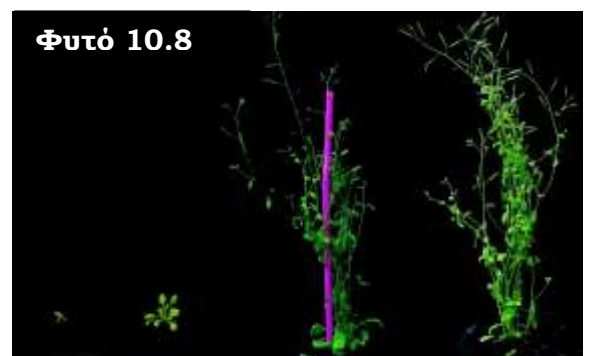
20d 30d 50d 60d



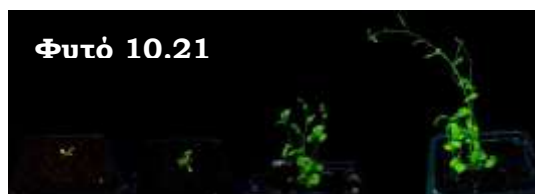
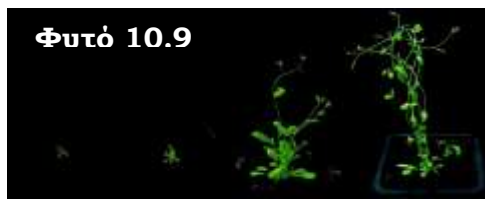
20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d

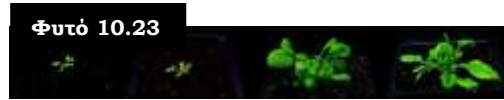


20d 30d 50d 60d





20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



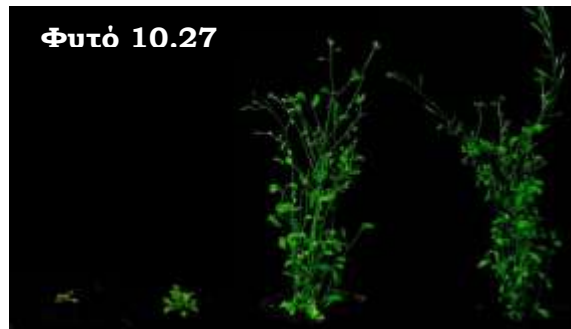
20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



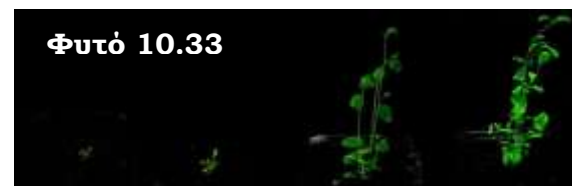
20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



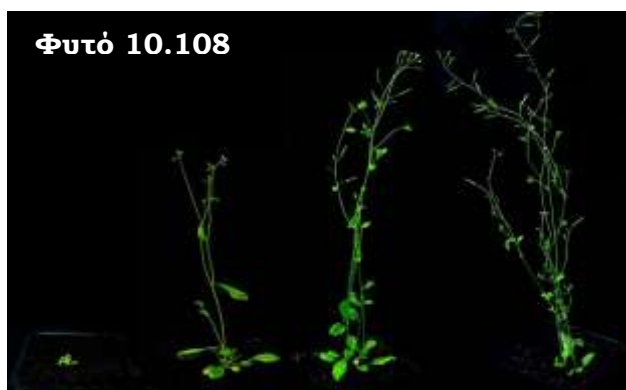
20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



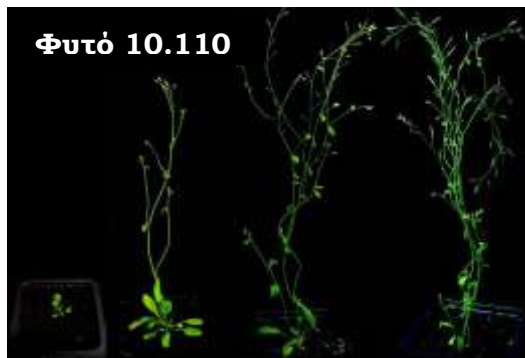
20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



20d 30d 50d 60d



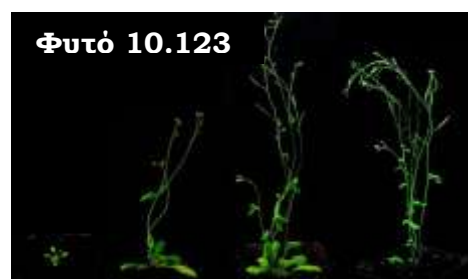
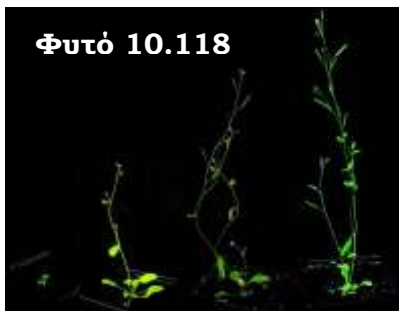
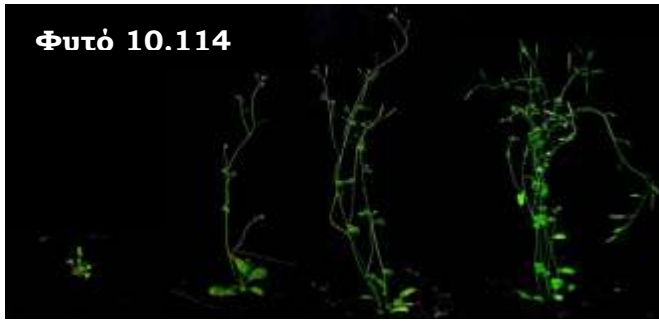
20d 30d 50d 60d

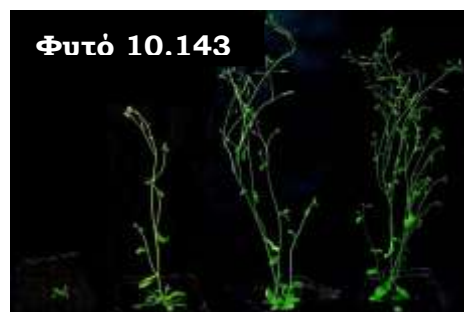
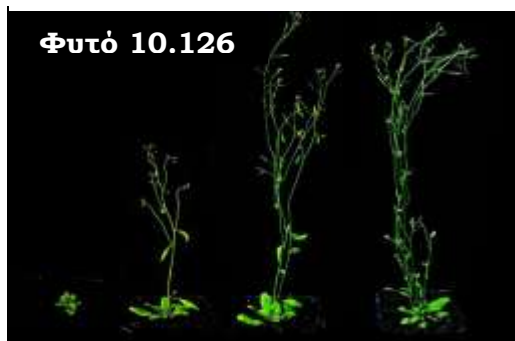


20d 30d 50d 60d



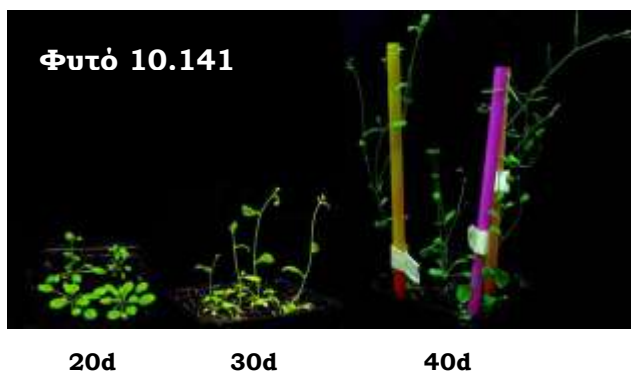
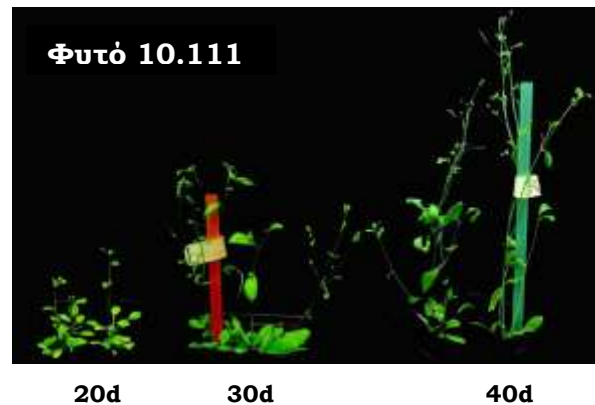
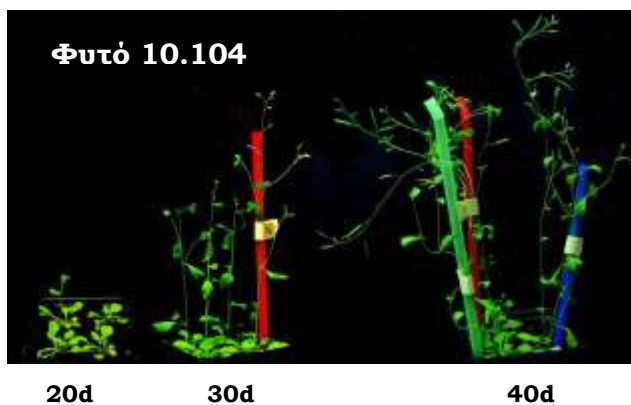
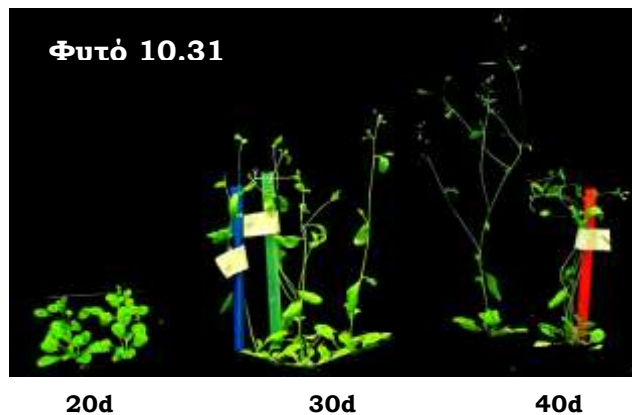
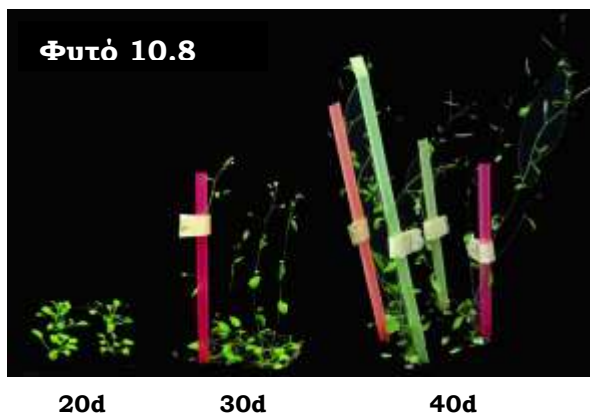
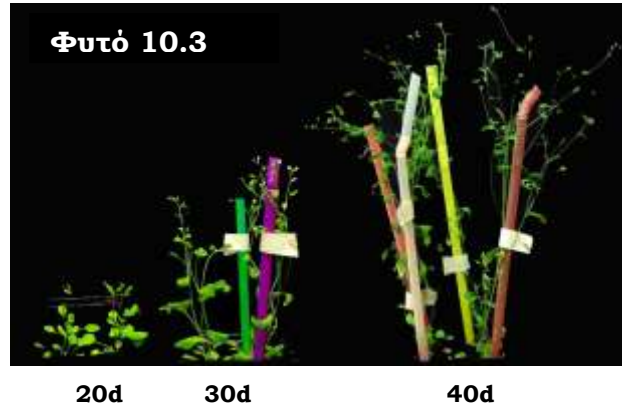
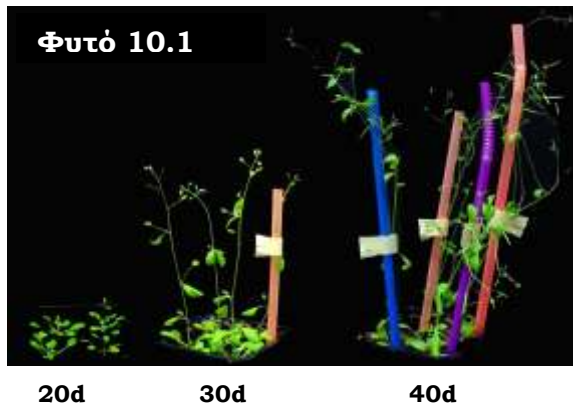
20d 30d 50d 60d





Αναπτυξιακά στάδια φυτών της T3 γενιάς

Ενδεικτικές φωτογραφίες κατά την πορεία της ανάπτυξης φυτών αγρίου τύπου και *LFY::HSP90RNAi* μετασχηματισμένων φυτών T3 γενιάς. Κάτω από κάθε φωτογραφία επισημαίνεται η ηλικία του φυτού σε ημέρες (d).



Bisulfite sequencing

Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος Col-O long για την περιοχή του *Lfy* προαγωγέα

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
1fy	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
1	GAAATGTCATGAAGGAAAGTTGACTTGTAAAGTCCACACCTGTCATTTCCACAGCAGCAGCATATCTCTTTACATCACATTAATGCTTTATTTGCAAAATATGCGATATAAA													
3	TGAAATGTCATGAAGGAAAGTTGACTTGTAAAGTTTAAATGTTAAATTTTAGTAAAGATATATTTCTTACATATATATATATATATATATAAATGTTTTATTTGTAATAATATGCGATATAAA													
5	TGAAATGTCATGAAGGAAAGTTGACTTGTAAAGTAAATGTTAAATTTTAGTAAAGTAAATATATTTTAAATATATATATATATATATATAAATGTTTTATTTGTAATAATATGCGATATAAA													
7	TGAAATGTCATGAAGGAAAGTTGACTTGTAAAGTAAATGTTAAATTTTAGTAAAGTAAATATATTTTAAATATATATATATATATATAAATGTTTTATTTGTAATAATATGCGATATAAA													
Consensus	TGAAATGTCATGAAGGAAAGTTGACTTGTAAAGTAAATGTTAAATTTTAGTAAAGTAAATATATTTTAAATATATATATATATATAAATGTTTTATTTGTAATAATATGCGATATAAA													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
1fy	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
1	AAAGGAATATACAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATTCCTTACCTGTTGATATATAGAGTTCGTCGAGTGGTCAATTTTACATATAGCAGTCTGCTCAAAAGGAGTAAGGAAAGGAGGAAAGAGGGA													
3	AAAGGAATATACAAACCCTAGTATTTATTTTAGATTTTTANTGTTGATATATAGAGTTCGAGTGGTCAATTTTAAATATAGTAAATTTGTTAAAGGAGTAAGGAAAGGAGGAAAGAGGGA													
5	AAAGGAATATACAAACCCTAGTATTTATTTTAGATTTTTANTGTTGATATATAGAGTTCGAGTGGTCAATTTTAAATATAGTAAATTTGTTAAAGGAGTAAGGAAAGGAGGAAAGAGGGA													
7	AAAGGAATATACAAACCCTAGTATTTATTTTAGATTTTTANTGTTGATATATAGAGTTCGAGTGGTCAATTTTAAATATAGTAAATTTGTTAAAGGAGTAAGGAAAGGAGGAAAGAGGGA													
Consensus	AAAGGAATATACAAACCCTAGTATTTATTTTAGATTTTTANTGTTGATATATAGAGTTCGAGTGGTCAATTTTAAATATAGTAAATTTGTTAAAGGAGTAAGGAAAGGAGGAAAGAGGGA													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	385
1fy	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
1	GTGATAGGAGAGGAGGAAATAGATTATGGATCCTGAGGGTTCCAGAGTGGCTTATCCGGTGGACCCCAACGAGAGCATTGGTTCAGG													
3	AGGAAATAAGAGAGGAGGAGGAGG--ANTTTATGGGTTTGARGGTGGTAAATGGAGGATTCNMGGGATCCCMNTTCTCTCATCACCANTCMCTCCCAGCGMCTCCCAGCCGCCGCCG													
5	GTGATAGGAGAGGAGGAGGAAATAGATTATGGATTTGARGGTTNTANGAGTGGTTACTTTGCTGGACTTMACATAGCATTTGGTTCATGCCAA--ATCACTANTGATTCGGGCC													
7	GTGATAGGAGAGGAGGAGGAAATAGATTATGGATTTGARGGTTNTANGAGTGGTTACTTTGCTGGACTTMACATAGCATTTGGTTCATGCCAA--ATCACTANTGATTCGGGCC													
Consensus	GTGATAGGAGAGGAGGAGGAAATAGATTATGGATTTGARGGTTNTANGAGTGGTTACTTTGCTGGACTTMACATAGCATTTGGTTCATGCCAA--ATCACTANTGATTCGGGCC													

Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος 10.1 long για την περιοχή του *Lfy* προαγωγέα

1	GAATGTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	130
18	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	120
4	TARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	110
3	TARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	100
16	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	90
14	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	80
19	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	70
8	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	60
15	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	50
7	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	40
20	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	30
2	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	20
13	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	10
17	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	1
5	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	
11	TGARNGTTCGATGAAAGAAAAGTTGACCTTGAAGTCCCAACGACACATATCTTTACATCACATTACATACACATAAATGCTTTTATTCGAAAAATAGCCGATATAAA	
Consensus	tgaaatgttgaagaaaagttgaccttgaagtcaccaacgacacatattctttacatcacattacatcacataaatgcttttatttcgaaaaatagccgatataaa	
131	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	260
18	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	250
4	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	240
3	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	230
16	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	220
14	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	210
8	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	200
19	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	190
12	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	180
15	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	170
7	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	160
20	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	150
13	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	140
2	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	130
17	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	120
5	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	110
11	AAAAGAAATATACAAAACCCTAGTATTTATTTCTAGATCTTTACCTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACATTAAGCCATCTGCTCAAAAGAGTAAAGCAAGAGCAAGAAAAGAGGA	100
Consensus	tgaaatgttgaagaaaagttgaccttgaagtcaccaacgacacatattctttacatcacattacatcacataaatgcttttatttcgaaaaatagccgatataaa	
261	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAACCCACGAGAGGCAT-TGGTTCAGC	358
18	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	350
4	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	340
3	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	330
16	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	320
14	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	310
8	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	300
19	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	290
12	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	280
15	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	270
7	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	260
20	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	250
13	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	240
2	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	230
17	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	220
5	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	210
11	GTGATAGAGAGAGAGAGAGAAATAGATTTAGATCCCGAGGTTTCACGAGTGGCTTATCCCG---TGGAAATTCACGAGAGCAT-TGGTTCAGC	200
Consensus	gtgataagagagagagagaaatagatttagatcccgaggtttcacgagtggttattcccg---tggaaacccacgagagccat-tgggttcagc	

Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος Col short για την περιοχή του *Lfy* προαγωγέα

```

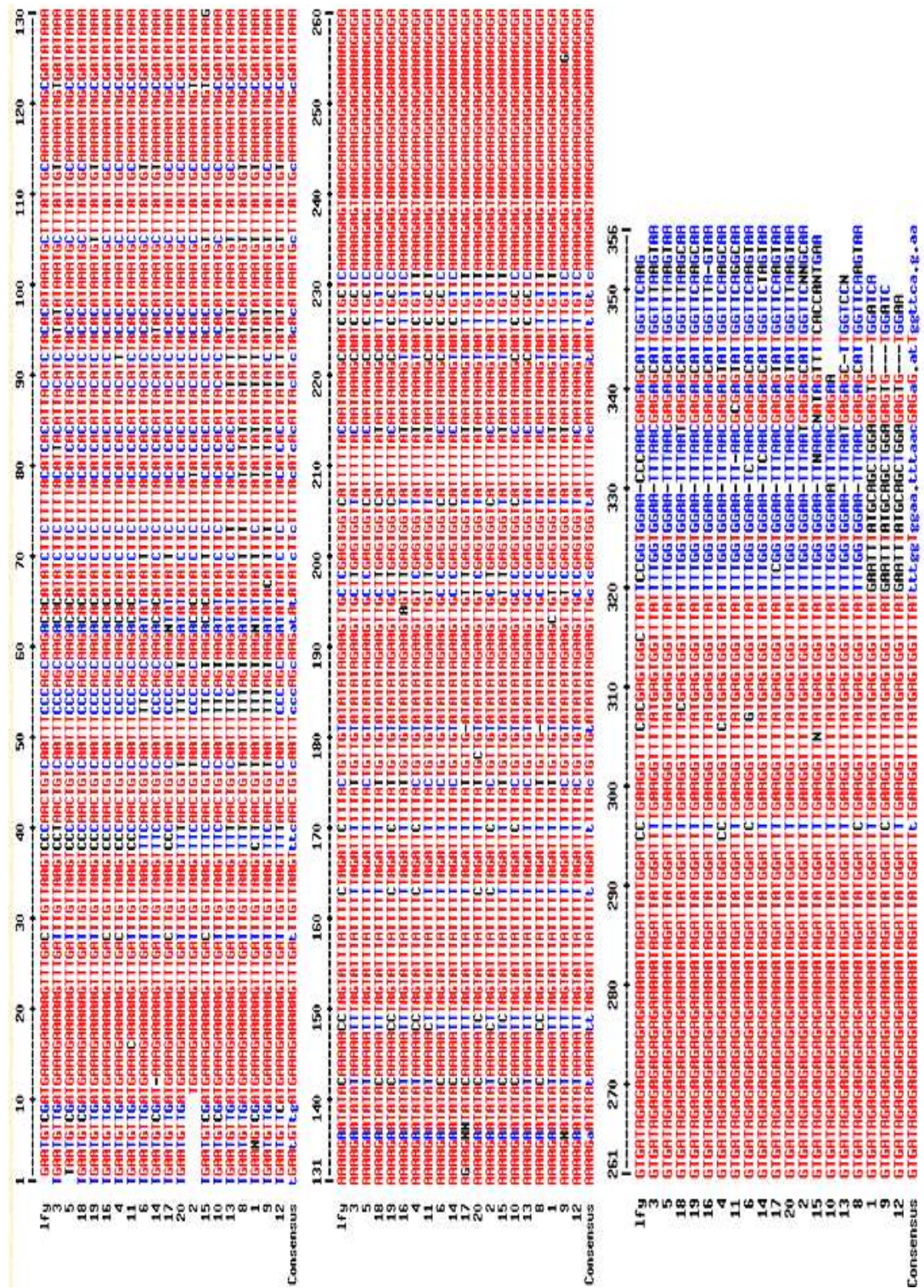
1 130 |-----|
Ify 1  GAA TGTCCGATGAAAGAAAGTTGAC TTGTTAAGTCCCACCTGTCACATTCCTTTACATCCATTACATCTACACATAAATGCTTTATTGCAAAAATAGCCGATATAAA
5  TGAATGTCCTAT-AAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGNGATATAAA
8  TGAATGTCGATGAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGTGCATATAAA
7  TGAATGTCGATGAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGTGCATATAAA
3  TGAAMGTTGATGAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGTGCATATAAA
4  TGAATGTCGATGAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGTGCATATAAA
2  TGAATGTCGATGAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGTGCATATAAA
Consensus  TGAATGTCGATGAAAGAAAAGTTGATTTGTTAAGTTTAA TGTAAATTTTAAAGTAATAATTTTTTAAATTAATAAATGTTTTATTGTA AAAAATAGTGCATATAAA

131 260 |-----|
Ify 1  AAAAGAAATATACAAAACC TAGTATTTATTTCTAGATTTCTACGTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACAAATAAAGCAATCTGCTCAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
5  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGTTGAGTGGTATTTTTATAATAAGTAATTTGTTAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
8  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGTTGAGTGGTATTTTTATAATAAGTAATTTGTTAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
7  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGTTGAGTGGTATTTTTATAATAAGTAATTTGTTAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
3  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGTTGAGTGGTATTTTTATAATAAGTAATTTGTTAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
4  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGTTGAGTGGTATTTTTATAATAAGTAATTTGTTAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
2  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGTTGAGTGGTATTTTTATAATAAGTAATTTGTTAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA
Consensus  AAAAGAAATATATAAAATTTAGTATTTATTTTAGATTTTATGTTGTTGATATATAGAAAGTTGCTCGAGTGGTCAATTTTACAAATAAAGCAATCTGCTCAAAGAGCTAAAGGAAAGAGGAAAAAAGAGA

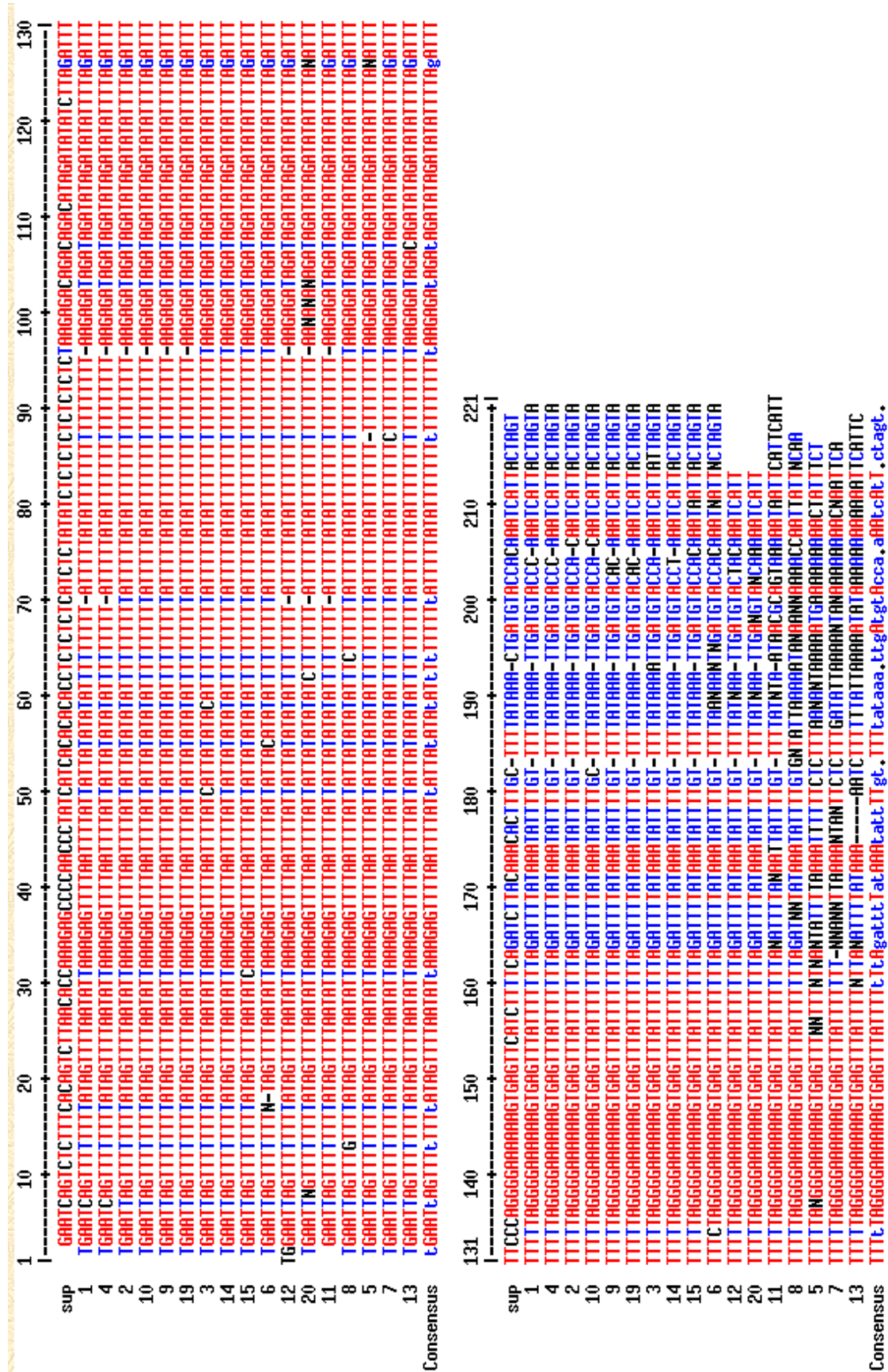
261 356 |-----|
Ify 1  GTGATAGAGGAGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATCCGAGGTTCCACGAGTGGCTTATTTCCGGTGGAAACCCACAGCAGAGGCA-ITGGTTCAGG
5  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTATTTGGTGGAAATTAACGAGAGGCCNTTGGTTCAGGCAA
8  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTATTTGGTGGAAATTAACGAGAGGCA-ITGGTTCAGGTA
7  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTATTTGGTGGAAATTAACGAGAGGCA-ITGGTTCAGGCAA
3  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTATTTGGTGGAAATTAACAGAGGCA-ITGGTTCAGGTA
4  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTATTTGGTGGAAATTAACAGAGGCA-ITGGTTCAGGTA
2  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTATTTGGTGGAAATTTTTCCTTTTATGACTTCA
Consensus  GTGATAGAGGAGGAGGAGGAAAATAATAGATTATGGATTTGAAAGGTTTATGAGTGGTTTATGAGTGGTTTATGGTGGAAATTAACAGAGGCA-ITGGTTCAGGAA

```

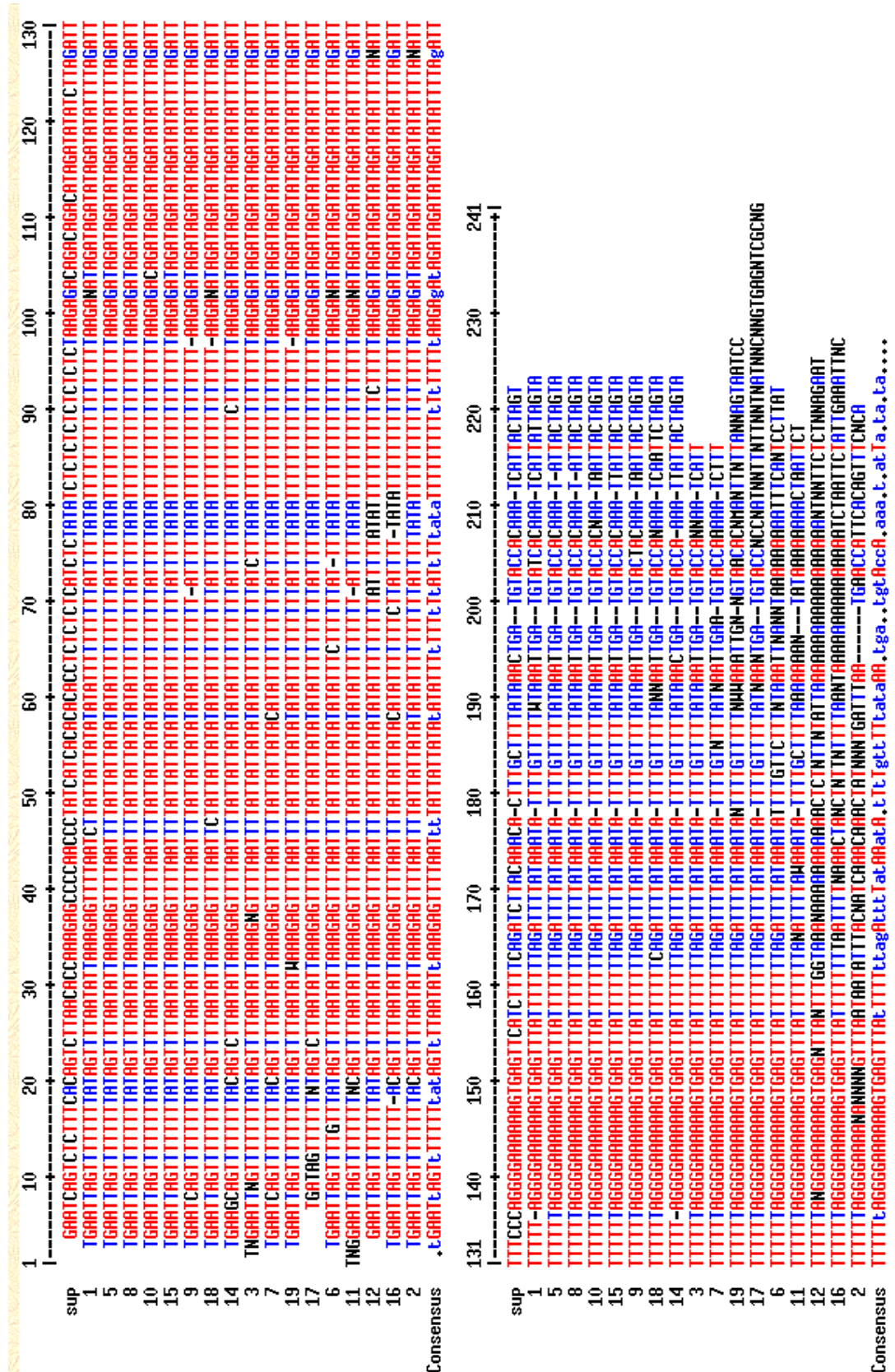
Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος 10.1 short για την περιοχή του *Lfy* προαγωγέα



Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος 10.1 long για την περιοχή του *sup* προαγωγέα



Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος 10.1 short για την περιοχή του sup προαγωγέα



Αποτελέσματα αλληλούχισης του δείγματος 10.141 short για την περιοχή του *sup* προαγωγέα

