

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της 20<sup>ης</sup> Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (5-7-2011), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

**Συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή :**

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

## Ευχαριστίες

*Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση και τη συγγραφή της.*

*Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επικ. Καθηγήτρια Μηλιώνη Δήμητρα για την καλή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα και για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου παρείχε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Χατζόπουλο Πολυδεύκη για την δυνατότητα αλλά και την ελευθερία που μου έδωσε να δράσω μέσα στο χώρο αυτό. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το καλό κλίμα συνεργασίας και για την βοήθεια τους, μικρή ή μεγάλη, και ιδιαίτερα την Δρ. Δέσποινα Σαμακοβλή για την αμέριστη υποστήριξη που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης.*

*Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, που χωρίς την «πολύπλευρη» υποστήριξή της δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.*

*Στην οικογένεια μου*

Οι HSP90 αποτελούν υψηλά συντηρημένο, μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, μοριακό τσαπερόνιο, το οποίο διευκολύνει την ωρίμανση διαφόρων ασταθών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, που αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές βιολογικών συστημάτων. Επιπλέον ρυθμίζουν την φαινοτυπική ποικιλομορφία καταστέλλοντας τις συνέπειες των υφιστάμενων γενετικών πολυμορφισμών.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του ενδεχόμενου ρόλου των κυτταροπλασματικών HSP90 πρωτεϊνών στη δημιουργία του αγωγού ιστού του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ο μηχανισμός της RNA γονιδιακής αποσιώπησης (RNAi). Αναλύθηκαν RNAi σειρές *Arabidopsis thaliana* που περιείχαν κατασκευή αποσιώπησης για τις κυτταροπλασματικές HSP90 υπό τον έλεγχο του ιστοειδικού προαγωγέα *Rac2/ROP7*. Το γονίδιο *Rac2/ROP7* εκφράζεται στο πρωτογενές ξύλωμα των ριζών, υποκοτυλίου, κοτυληδόνων, βλαστών και φύλλων και έχει σχετιστεί με το σχηματισμό δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος.

Οι *Rac2::HSP90RNAi* σειρές παρουσίασαν πλειοτροπικό φαινότυπο. Μεταξύ άλλων εμφάνισαν διατάραξη του αγγειακού προτύπου σε βλαστό και υποκοτύλιο, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από εγκάρσιες τομές που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Μέσω της τεχνικής προσέγγισης της συμπληρωματικότητας του διμοριακού φθορισμού (BiFC) δείχθηκε *in planta* ότι οι HSP90 αλληλεπιδρούν με ρυθμιστές του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των γιββερελλινών, το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση της ξυλογένεσης. Επιπλέον στις διαγονιδιακές μελετώμενες σειρές παρατηρήθηκαν αλλαγές, του προτύπου έκφρασης τόσο βιοσυνθετικών γονιδίων καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται άμεσα στην απόκριση σε γιββεριλλίνες. Τα μέχρι τώρα πειραματικά ευρήματα συνηγορούν υπέρ της εμπλοκής των HSP90 σε μονοπάτια που ρυθμίζουν την εγκαθίδρυση και διαφοροποίηση του ξύλου στον φυτικό οργανισμό.

Heat shock protein90 (HSP90) is an abundant, evolutionary conserved molecular chaperon with key roles in many cellular pathways such as signal transduction, cellular homeostasis and cell cycle control. Other facets of HSP90 function in plants include its involvement in phenotypic plasticity, developmental stability, and buffering of genetic variation.

To investigate the function of cytoplasmic HSP90 proteins during vascular development, an RNAi gene silencing approach was employed in *Arabidopsis thaliana*. The Rac2::HSP90RNAi lines displayed a pleiotropic phenotype. Transverse sections of inflorescence stems and hypocotyls were obtained, to image the HSP90RNAi Arabidopsis vascular network. Altered vascular pattern was exhibited in both tissues suggesting that Hsp90 silencing compromise the regulatory network that controls vascular development. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) approach demonstrated that HSP90s interact with regulators of the GA signalling pathway, such as GAI. Furthermore, the accumulation pattern of GA-dependent genes was monitored, suggesting that GA biosynthesis and signaling were compromised in HSP90RNAi plants.

Taken together, our data suggest that deficiency in the HSP90 chaperone machinery affects vascular development and wood formation in *Arabidopsis thaliana*

# Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	Το φυτό μοντέλο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	2
1.2.1	Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες.....	4
1.2.2	Κατάταξη θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.....	5
1.3	Μοριακοί συνοδοί .....	6
1.4	Κατηγορίες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών .....	8
1.4.1	Η οικογένεια των HSP15-30 πρωτεϊνών (smHSPs) .....	8
1.4.2	Η οικογένεια των HSP60 πρωτεϊνών .....	9
1.4.3	Οικογένεια των HSP70 πρωτεϊνών (DnaK) .....	10
1.4.4	Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών .....	11
1.4.5	Η οικογένεια των HSP100 πρωτεϊνών (CLP).....	18
1.5	Παράγοντες θερμικής καταπόνησης .....	19
1.6	Μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης.....	20
1.7	Ο αγγειακός ιστός .....	22
1.8	Γιββερελλίνες.....	24
1.8.1	Βιοσύνθεση και καταβολισμός των γιββερελλινών.....	24
1.8.2	Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος GA-GID1-DELLA .....	26
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1	Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού.....	30
2.1.1	Ιστοκαλλιέργεια.....	30
2.1.2	Τύποι φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	31
2.2	Βακτηριακά στελέχη .....	31
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	31
2.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
2.2.3	Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα.....	35

2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA .....	35
2.3.1 Αλκαλική λύση .....	35
2.4 Πέψη Νουκλεϊνικών Οξέων με Ενδονουκλεάσες Περιορισμού .....	36
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	37
2.6 Απομόνωση και Καθαρισμός Κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης .....	38
2.7 Ενωποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα .....	38
2.7.1 Διαδικασία A-tailing.....	38
2.7.2 Αντίδραση Ενωποίησης .....	39
2.8 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC).....	40
2.9 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	41
2.10 Καθαρισμός και ποσοτικοποίηση RNA.....	42
2.10α Καθαρισμός RNA από υπολείμματα DNA με το ένζυμο RQ1 DNase .....	42
2.10β Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων.....	42
2.11α Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	43
2.11.β RT-PCR.....	45
2.12 Μικροσκοπική παρατήρηση βλαστού και υποκοτυλίου σε φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	47
2.12.1 Συλλογή ιστού.....	47
2.12.2 Προετοιμασία του παρασκευάσματος προς παρατήρηση .....	47
2.13 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ .....	48
2.14 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	51
2.14.1 pGEM-T Easy vector .....	51
2.14.2 SPYNE – SPYCE vectors.....	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
3.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αποσιωπημένων σειρών Rac2::Hsp90RNAi .....	55
3.2 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών <i>in planta</i> .....	66
3.3 Μοριακή ανάλυση των Rac2::Hsp90RNAi φυτών.....	69
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	72

4.1 Οι HSP90 επηρεάζουν τον φαινότυπο του αγωγού ιστού στο <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	74
4.2 Οι HSP90 και το μονοπάτι των γιββερελλινών .....	77
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80



# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### 1.1 Το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό σε μέγεθος (20-25cm) δικότυλο φυτό, ανήκει στην οικογένεια των σταυρανθών (Brassicaceae) και είναι αυτοφυές στην Ευρώπη, την Ασία και την βορειοδυτική Αφρική. Αποτελείται από έναν κεντρικό βλαστό, ο οποίος φέρει μασχαλιαίους, και από πλάγιους. Στη βάση του φυτού υπάρχουν φύλλα που σχηματίζουν ροζέτα. Τα άνθη του έχουν μήκος 3 mm και αποτελούνται από 4 σέπαλα, 4 πέταλα και 6 στήμονες. Οι καρποί έχουν μήκος 5-20 mm και περιέχουν 20-30 σπέρματα. Αν και συγγενεύει με σημαντικά, από αγρονομικής άποψης, καλλιεργούμενα φυτά όπως το λάχανο και το μπρόκολο το ίδιο δεν έχει καμία εμπορική αξία και στην πραγματικότητα θεωρείται ζιζάνιο. Παρόλα αυτά έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς από την γενετική, την βιοχημεία και την φυσιολογία ως οργανισμός μοντέλο, λόγω των πολυάριθμων χαρακτηριστικών που το καθιστούν ιδανικό για εργαστηριακή έρευνα.

Ο Johannes Thal περιέγραψε πρώτος το *Arabidopsis* τον 16ο αιώνα στα γερμανικά βουνά Harz και το ονόμασε τότε *Pilosella siliquosa*. Το όνομα του φυτού άλλαξε πολλές φορές μέχρι που το όνομα *Arabidopsis thaliana* επικράτησε το 1842. Η πρώτη αναφορά σε μετάλλαγμα *Arabidopsis* έγινε το 1873 από τον Alexander Braun, ο οποίος περιέγραψε έναν φαινότυπο με διπλό άνθος. Ωστόσο, δεν ήταν ότι μέχρι το 1943 όπου ο Friedrich Laibach (ο οποίος είχε δημοσιεύσει τον αριθμό χρωμοσωμάτων του φυτού το 1907) πρότεινε το *Arabidopsis* ως πρότυπο οργανισμό.

Τα χαρακτηριστικά που καθιστούν το *Arabidopsis thaliana* ως οργανισμό μοντέλο είναι τα εξής:

- Μικρής διάρκειας βιολογικός κύκλος (περίπου έξι εβδομάδες από την ημέρα της βλάστησης των σπερμάτων μέχρι την ηλικία του ώριμου φυτού).
- Μικρό μέγεθος ώριμου φυτού.
- Εύκολη καλλιέργεια στο εργαστήριο σε περιορισμένο χώρο.
- Παραγωγή μεγάλου αριθμού σπερμάτων ανά φυτό(περίπου 10,000)
- Πλήρης αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του. Το γονιδίωμα του *Arabidopsis* περιλαμβάνει περίπου 27,000 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για 35,000 πρωτεΐνες.

- Μικρό μέγεθος γονιδιώματος: 157,000,000 ζεύγη βάσεων DNA καταναμεημένα σε πέντε (5) χρωμοσώματα.
- Ύπαρξη γενετικών χαρτών και για τα πέντε χρωμοσώματα.
- Δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών με τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*.
- Δυνατότητα μεταλλαξιγένεσης σε πληθυσμούς σπερμάτων είτε με τη χρήση ακτίνων Χ είτε χημικών μεταλλαξιγόνων.



**Εικόνα 1.:** *Arabidopsis thaliana*

### 1.2.1 Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες

Όλοι οι οργανισμοί υπόκεινται στην επίδραση ενός διαρκώς μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος. Η μεγάλη ποικιλότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών δημιουργεί συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης προκαλώντας μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις που συντελούν στην προσαρμογή και την επιβίωση των οργανισμών. Ιδιαίτερα οι φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν την δυνατότητα της μετακίνησης είναι υποχρεωμένοι να μεταβάλλουν τη φυσιολογία των κυττάρων τους για να αντισταθμίσουν τις μεταβολές που προκύπτουν από την περιβαλλοντική καταπόνηση (έλλειψη ή περίσσεια νερού, οξειδωτική καταπόνηση, αλατότητα, ακραίες θερμοκρασίες, έλλειψη αζώτου, παρουσία βαρέων μετάλλων, τοξίνες, παθογόνα, μεταλλάξεις) .

Ένας από τους καλύτερα μελετημένους μηχανισμούς αντίδρασης είναι αυτός που επάγεται ως απόκριση στην έκθεση των οργανισμών σε υψηλές θερμοκρασίες (θερμικό σοκ). Η απόκριση στο θερμικό στρες είναι μία γενική και υψηλά συντηρημένη κυτταρική διαδικασία μεταξύ των οργανισμών, χαρακτηριστικό της οποίας είναι η επαγωγή της έκφρασης μιας ομάδας πρωτεϊνών που είτε απουσιάζουν, είτε είναι παρούσες σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικές θερμοκρασίες. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSP) και δεν εκφράζονται μόνο υπό την επίδραση θερμικού σοκ αλλά και σε κύτταρα τα οποία δεν βρίσκονται υπό την επίδραση κάποιας περιβαλλοντικής πίεσεως. (Hendrick and Hartl, 1993). Η επαγωγή των HSP υπό συνθήκες στρες οδηγεί τους οργανισμούς σε υψηλά επίπεδα θερμοανθεκτικότητας, συμβάλει στην προστασία των οργανισμών από σοβαρές βλάβες και επιτρέπει την επανάκτηση των κυτταρικών και φυσιολογικών δραστηριοτήτων (Schoeffl et al., 1998)

Εκτός από τη θερμοανθεκτικότητα, οι HSP πρωτεΐνες προσδίδουν ανθεκτικότητα και σε άλλες μορφές στρες, όπως είναι η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης, η παρουσία αρσενικού, η υψηλή συγκέντρωση άλατος, η έλλειψη νερού κ.α.

Επίσης οι HSP πρωτεΐνες διαδραματίζουν το ρόλο του μοριακού συνοδού συμμετέχοντας σε διάφορα στάδια ωρίμανσης πολλών πρωτεϊνών. Οι μοριακοί συνοδοί συνδέονται προσωρινά με νεοσυντιθέμενες ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Στην περίπτωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών παρεμποδίζουν τη μη λειτουργική μεταξύ τους αλληλεπίδραση και προάγουν την ορθή αναδίπλωση ενώ στην περίπτωση των μετουσιωμένων συμβάλλουν στην αποικοδόμηση ή την επανενεργοποίησή τους (μετά από

καταπόνηση). Συνεπώς είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε υπό την επίδραση κάποιας μορφής καταπόνησης οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες συμβάλλουν στην διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου.

### 1.2.2 Κατάταξη θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ κατατάσσονται με βάση το μοριακό τους βάρος, το μέγεθος, τη δομή και τη λειτουργία τους σε πέντε κατηγορίες:

1. HSP 100 (CLP)
2. HSP 90
3. HSP 70
4. HSP 60
5. smHSPs 15 – 30 (small heat shock proteins, smHSPs).

Οικογένεια	Προκαρυωτικές πρωτεΐνες	Ευκαρυωτικές πρωτεΐνες	Κυταρική τοποθέτηση	Λειτουργίες
<b>HSP 100 (100kDa)</b>	ClpB, ClpA, ClpX	HSP104, HSP110	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο και	Αντοχή στις ακραίες θερμοκρασίες
<b>HSP 90 (90kDa)</b>	HtpG, C62.5	HSPC ομάδα, Grp94	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό	Διευκολύνει την ωρίμανση μορίων σιναλών
<b>HSP 70 (70kDa)</b>	DnaK	HSPA ομάδα, HSP71, Hsc70, HSP72, Grp78 (BiP)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και	Συμμετοχή στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, αντοχή στις ακραίες θερμοκρασίες,
<b>HSP 60 (60kDa)</b>	GroEL, 60kDa antigen	HSP60	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο και	Συμμετοχή στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών
<b>sm HSPs (15 – 30kDa)</b>	GroES GrpE	HSP10, HSPB ομάδα	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό	Αποτρέπει την συσσώρευση και σταθεροποιεί τις μετουσιωμένες

*Πίνακας 1.1: Ομάδες HSP πρωτεϊνών και οι κύριες λειτουργίες τους*

### 1.3 Μοριακοί συνοδοί

Ορισμένες πρωτεΐνες είναι ικανές να αποκτήσουν αυθόρμητα την ώριμη διαμόρφωσή τους δηλαδή μπορούν και αυτο-συναρμολογούνται. Όταν η αναδίπλωση δεν γίνει σωστά μια πρωτεΐνη μπορεί να παγιδευτεί σε μια στερεοδιαμόρφωση η οποία δεν αντιστοιχεί στη σωστή τελική μορφή. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία χρειάζονται τη βοήθεια ενός μοριακού συνοδού (chaperone) για να αποκτήσουν σωστή τριτοταγή δομή.

Οι μοριακοί συνοδοί είναι πρωτεΐνες που μεσολαβούν για τη σωστή αναδίπλωση, αναγκάζοντας την πρωτεΐνη στόχο να λάβει μια συγκεκριμένη στερεοδιαμόρφωση. Αυτό επιτυγχάνεται με το να προσδέονται στις ενεργές επιφάνειες της πρωτεΐνης-στόχου, οι οποίες είναι εκτεθειμένες κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης, και να εμποδίζουν τις αλληλεπιδράσεις με άλλες περιοχές της πρωτεΐνης που οδηγούν σε λανθασμένες στερεοδιαμορφώσεις.

Μια λανθασμένη μορφή μπορεί να σχηματιστεί είτε από κακή αναδίπλωση μιας μόνο πρωτεΐνης είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με κάποια άλλη πρωτεΐνη. Η υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών στο κυτταροδιάλυμα προκαλεί συνθήκες “μακρομοριακού συνωστισμού”. Ο συνωστισμός μπορεί να προκαλέσει τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που βρίσκονται στη διαδικασία της αναδίπλωσης, φαινόμενο που μπορεί να αποτραπεί από τη δράση των μοριακών συνοδών.

Η ικανότητα των μοριακών συνοδών να αναγνωρίζουν τις λανθασμένες πρωτεϊνικές στερεοδιαμορφώσεις τους επιτρέπει να έχουν δύο συσχετιζόμενους ρόλους που αφορούν την πρωτεϊνική δομή. Αρχικά επηρεάζουν τη διαδικασία της αναδίπλωσης ελέγχοντας την προσβασιμότητα των ενεργών επιφανειών. Κατά δεύτερον αναγνωρίζουν μια πρωτεΐνη που έχει μετουσιωθεί και είτε βοηθούν στην αναδιάταξη είτε στην απομάκρυνση της πρωτεΐνης με αποικοδόμηση.

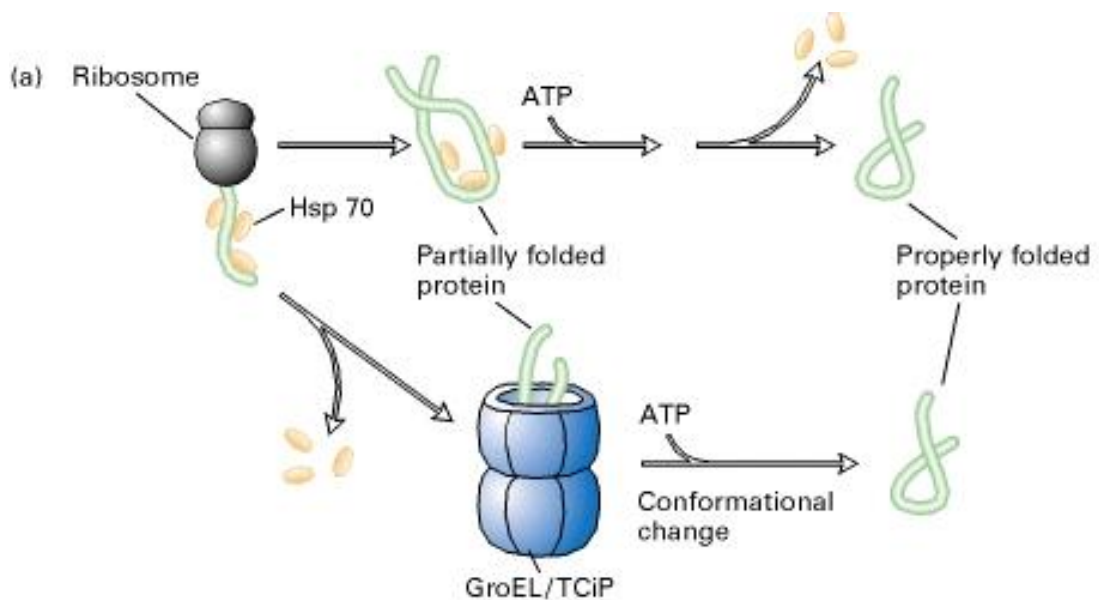
Οι μοριακοί συνοδοί χρειάζονται επίσης για το σχηματισμό ολιγομερών δομών και για τη μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου μεμβρανών. Ένα σημαντικό γνώρισμα του μηχανισμού διέλευσης μέσω μια μεμβράνης είναι ο έλεγχος (ή η καθυστέρηση) της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Για παράδειγμα μια πρωτεΐνη προκειμένου να περάσει μέσα από τον διαθέσιμο διάυλο της μεμβράνης ενδεχομένως να χρειάζεται να διατηρηθεί σε αποδιαταγμένη κατάσταση εξαιτίας των διαστάσεων της διόδου. Οι μοριακοί συνοδοί είναι

σε θέση να εμποδίσουν την πρωτεΐνη να λάβει μια διαμόρφωση που θα απέκλειε τη διέλευσή της μέσω της μεμβράνης.

Οι δύο κύριοι τύποι μοριακών συνοδών που έχουν μελετηθεί με λεπτομέρεια επηρεάζουν την αναδίπλωση με δύο μηχανισμούς:

- Το σύστημα HSP70 αποτελείται από ανεξάρτητες πρωτεΐνες που προσδέονται και επιδρούν σε υποστρώματα των οποίων η αναδίπλωση πρόκειται να ελεγχθεί. Αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες καθώς συντίθενται ή αναδύονται από μεμβράνες αλλά και όταν μετουσιώνονται λόγω στρες. Κατά κύριο λόγο ελέγχει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εκτεθειμένων ενεργών περιοχών της πρωτεΐνης, διευκολύνοντας την αναδίπλωσή της στη σωστή στερεοδιαμόρφωση. Τα συστατικά του συστήματος είναι οι πρωτεΐνες HSP70, HSP40 και GrpE. Οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP40 συνδέονται ανεξάρτητα στις πρωτεΐνες- υποστρώματα. Χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP ως πηγή ενέργειας για να αλλάξουν τη δομή του πρωτεϊνικού υποστρώματος και λειτουργούν σε συνεργασία με έναν παράγοντα ανταλλαγής ο οποίος ανταλλάσει το ADP με ATP ώστε να μπορεί να αρχίσει ένας νέος κύκλος αντίδρασης.
- Το σύστημα τσαπερονίνης (chaperonin) αποτελείται από ένα μεγάλο ολιγομερές. Αυτό το συγκρότημα σχηματίζει μια δομή μέσα στην οποία εισέρχονται οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Το προστατευτικό περιβάλλον διευκολύνει την αναδίπλωσή τους. Υπάρχουν δύο τύποι συστημάτων τσαπερονίνης. Το GroEl/GroEs απαντάται σε όλους τους οργανισμούς ενώ το TRiC μόνο στο κυτταροδιάλυμα των ευκαρυωτών

Ένα άλλο σύστημα αποτελεί η πρωτεΐνη HSP90 η οποία λειτουργεί σε συνεργασία με την HSP70 αλλά οι στόχοι της είναι ειδικές κατηγορίες πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Η βασική της λειτουργία είναι να διατηρεί τους στόχους της στην κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση, έως ότου σταθεροποιηθούν μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα στοιχεία του μονοπατιού.



**Εικόνα 1.2** Αλληλεπίδραση συστημάτων HSP70 και HSP60 για την επίτευξη της σωστής αναδίπλωσης νεοσυντιθέμενων και κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

## 1.4 Κατηγορίες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών

### 1.4.1 Η οικογένεια των HSP15-30 πρωτεϊνών (smHSPs)

Αποτελεί την λιγότερο συντηρημένη και πιο ασαφή λειτουργικά οικογένεια θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Vierling, 1991). Οι smHSPs απαντώνται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς ως απόκριση σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις αλλά εκφράζονται και υπό φυσιολογικές συνθήκες σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Waters et al., 1996). Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 12 έως 40 kDa. Χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό ομολογίας που κυμαίνεται μεταξύ του 20% -30% σε αμινοξικό επίπεδο. Η αμινοτελική περιοχή διαφέρει πολύ, όσον αφορά την αμινοξική ακολουθία. Μόνο στο καρβόξυ-τελικό άκρο υπάρχει μια συντηρημένη περιοχή 90 αμινοξέων που ονομάζεται περιοχή της  $\alpha$ -κρυσταλλίνης, εξαιτίας της ομολογίας που παρουσιάζει με την πρωτεΐνη των φακών του ματιού  $\alpha$ -κρυσταλλίνη. .

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες της συγκεκριμένης οικογένειας δεν είναι ικανές να επάγουν τη σωστή αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Ehrnsperger M.S et al., 1997). Λειτουργώντας σαν συν-σαπερόνια συνδέονται με μετουσιωμένες πρωτεΐνες, μέσω αλληλεπίδρασης των υδρόφοβων περιοχών, παρεμποδίζοντας τη συσσώρευσή τους, ενώ



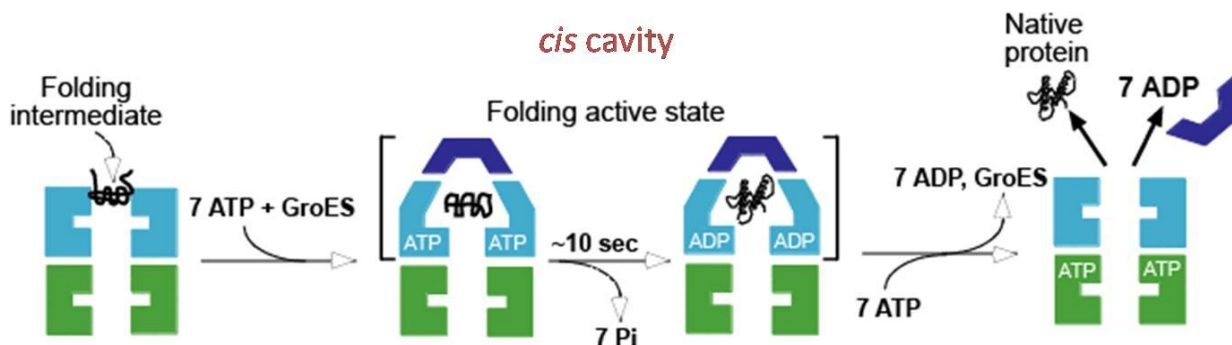
παράλληλα διευκολύνουν τη σωστή αναδίπλωσή τους με βοήθεια κάποιου ATP-εξαρτώμενου συστήματος τσαπερονίων, όπως το DnaK (HSP70) σύστημα.

Στα ανώτερα φυτά έχουν περιγραφεί έξι πολυγονιδιακές οικογένειες που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αυτές.

#### **1.4.2 Η οικογένεια των HSP60 πρωτεϊνών**

Η οικογένεια των HSP60 πρωτεϊνών με μοριακό βάρος γύρω στα 60 kDa αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά συστήματα μοριακών συνοδών. Οι πρωτεΐνες αυτές απαντώνται α) στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στη μήτρα των μιτοχονδρίων (μιτοχονδριακή Cnp60) και στο στρώμα των χλωροπλαστών (πλαστιδιακή Cnp60) και β) στο κυτταρόπλασμα του *E.coli* (GroEL). Ανιχνεύονται σε φυσιολογικές και μη συνθήκες ανάπτυξης όπου βοηθούν νεοσυντιθέμενες ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες να αποκτήσουν την σωστή διαμόρφωση.

Οι λειτουργίες των HSP60 εξαρτώνται άμεσα από την θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη HSP10 (GroEs) με μοριακό βάρος 10 kDa και την παρουσία ATP. Η HSP60 αποτελείται από 14 υπομονάδες οι οποίες σχηματίζουν δύο ανεστραμμένους επταμερείς δακτυλίους. Ο κάθε δακτύλιος αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα: το ακραίο, το ενδιάμεσο και το ισημερινό. Η HSP60 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά απευθείας με τα μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια (υπόστρωμα). Πιο συγκεκριμένα υπόστρωμα και ATP συνδέονται σε έναν από τους δύο δακτυλίους της HSP60. Στη συνέχεια η HSP10 προσδένεται στο πάνω μέρος του ίδιου δακτυλίου - ο οποίος τώρα ονομάζεται *cis*-δακτύλιος- σχηματίζοντας μία κοιλότητα στο εσωτερικό. Με την πρόσδεση της HSP10 παρατηρείται αλλαγή του περιβάλλοντος του δακτυλίου με συνέπεια αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του υποστρώματος. Ακολουθεί υδρόλυση του ATP και δέσμευση στον *trans*-δακτύλιο νέου υποστρώματος, ATP και πρωτεΐνης HSP10. Το γεγονός αυτό μετατρέπει τον μέχρι πρότινος *trans*-δακτύλιο σε *cis* και πυροδοτεί την αποδέσμευση ADP, HSP10 και του αναδιπλωμένου πλέον πεπτιδίου από τον "παλαιότερο" *cis*-δακτύλιο.



**Εικόνα 1.3 Δράση του HSP60 τσαπερονίου.** Καθεμιά από τις δύο υπομονάδες(GroEL) με την παρουσία/υδρόλυση του ATP αλλά και την αναγκαία παρουσία του GroES βοηθούν στην αναδίπλωση πρωτεϊνών ώστε αυτές να αποκτήσουν λειτουργική διαμόρφωση.

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

Η οικογένεια αυτή ανήκει στις πιο συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών και το μέγεθός τους κυμαίνεται από από 68 έως 110kDa (Vierling, 1991: Boston et al., 1996: Miernyk, 1997). Το ποσοστό ομολογίας μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μελών είναι της τάξης του 50% ενώ μεταξύ των ευκαρυωτικών μελών κυμαίνεται από 50 έως 98%. Οι HSP70 εντοπίζονται σε διάφορα υποκυτταρικά οργάνδια και συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (πρωτεΐνη BiP).

Μια τυπική HSP70 πρωτεΐνη έχει δύο χαρακτηριστικές περιοχές: την υψηλά συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή μεγέθους 44kDa με δράση ATPάσης και την καρβόξυ-τελική περιοχή μεγέθους 25kDa. Η τελευταία υποδιαιρείται επιπλέον σε μία περισσότερο συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος (15 kDa) και μία λιγότερο συντηρημένη (10kDa). Ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην δέσμευση και την αποδέσμευση του ATP. Όταν η HSP70 δεσμεύει ATP προσδένεται και αποδεσμεύεται από τα υποστρώματα με μεγάλη ταχύτητα. Αντίθετα όταν στη θέση του ATP είναι δεσμευμένο το ADP οι αντιδράσεις είναι πολύ αργές. Η ανακύκλωση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων ρυθμίζεται και από δύο άλλες πρωτεΐνες τις HSP40 (DnaJ) και GrpE.

Ορισμένα μέλη της οικογένειας αυτής εκφράζονται συνεχώς υπό φυσιολογικές συνθήκες (HSC70) ενώ η έκφραση άλλων μελών επάγεται από συνθήκες καταπόνησης όπως ακραίες θερμοκρασίες, ανοξία, βαρέα μέταλλα, ξηρασία. Ο ρόλος τους -ως μοριακοί

συνοδοί- είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε φυσιολογικές συνθήκες και μη. Υπό συνθήκες καταπόνησης βοηθούν στην παρεμπόδιση της συσσώρευσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών καθώς και στην ορθή αναδίπλωση κακώς αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες συμβάλλουν στην ορθή αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, στην μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου των μεμβρανών, στην αποσυγκρότηση ολιγομερών πρωτεϊνικών δομών, στην αποικοδόμηση μετουσιωμένων πρωτεϊνών και σε μερικές περιπτώσεις στον έλεγχο της βιολογικής δραστηριότητας ρυθμιστικών πρωτεϊνών όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες (Bukau and Horwich, 1998).

#### **1.4.4 Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών**

Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών είναι υψηλά συντηρημένη, αποτελείται από μέλη το μοριακό βάρος των οποίων κυμαίνεται από 82 έως 96 kDa και απαντάται από το *E. Coli* έως τον άνθρωπο. Κάποια μέλη εκφράζονται συνεχώς ενώ κάποια άλλα ανιχνεύονται υπό συνθήκες στρες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης αντιστοιχούν περίπου στο 1-2% της συνολικής πρωτεΐνης των κυττάρων (Buchner, 1999; Frydman, 2001). Η έκφρασή τους σχετίζεται επίσης με διαφόρων ειδών καρκινικούς όγκους όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παγκρέατος κα. (Csermely P., 1998).

Οι HSP90 απαντώνται στο κυτταρόπλασμα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Ομόλογα εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στους χλωροπλάστες (Buchner, J, 1999). Αξίζει να παρατηρηθεί ότι δεν εντοπίζονται ομόλογα μέλη στην κλάση των Αρχαίων (Gurta RS 1995). Στα βακτήρια εντοπίζεται ένα μόνο ομόλογο των HSP90 που είναι γνωστό ως HTPG (high temperature protein G) και παρουσιάζει 42% αμινοξική ομοιότητα με το ανθρώπινο ομόλογο. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν χαρακτηριστεί δύο κυτταροπλασματικά ομόλογα των HSP90, τα HSP90-α (επαγόμενη πρωτεΐνη) και HSP90-β (συστατική πρωτεΐνη) τα οποία παρουσιάζουν 76%ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο (Krishna and Gloor, 2001) και αποτελούν αποτέλεσμα γονιδιακού διπλασιασμού.

*HSP90* γονίδια έχουν απομονωθεί από διάφορους φυτικούς οργανισμούς όπως η τομάτα, το καλαμπόκι, η ελαιοκράμβη, η σίκαλη, το *Catharanthus* και η *Arabidopsis*. Σύγκριση αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ φυτικών και ζωικών ομολόγων έδειξε ομοιότητα που κυμαίνεται από 63 -71% ενώ μεταξύ ομολόγων διαφόρων φυτικών ειδών 88 -93%. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά μέλη. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη (*HSP90.1*, *HSP90.2*, *HSP90.3*

και *HSP90.4*), ένα χλωροπλαστικό (*HSP90.5*), ένα μιτοχονδριακό (*HSP90.6*) και ένα που απαντάται ενδοπλασματικό δίκτυο (*HSP90.7*). Έχει δειχθεί ότι τα κυτταροπλασματικά μέλη παρουσιάζουν σε επίπεδο αμινοξέων ποσοστά ομολογίας που κυμαίνονται από 86-99% ενώ τα οργανιδιακά μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας της τάξης του 45%. Κάποια από αυτά τα γονίδια εκφράζονται συνεχώς, κάποια άλλα υπό την επίδραση στρες (θερμική καταπόνηση, επίδραση αρσενικού κλπ) (Milionis and Hatzopoulos, 1997) ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η έκφραση των γονιδίων ρυθμίζεται αναπτυξιακά (Krishna and Gloor, 2001). Έκφραση των *HSP90* γονιδίων μπορεί να ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Marrs et al., 1993), κατά τη φύτευση σπόρου (Reddy et al., 1998), στις μεριστωματικές ζώνες βλαστού και ρίζας (Koning et al., 1992), στα άνθη (Krishna et al., 1995) και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της γύρης (Haralampidis et al, 2002).

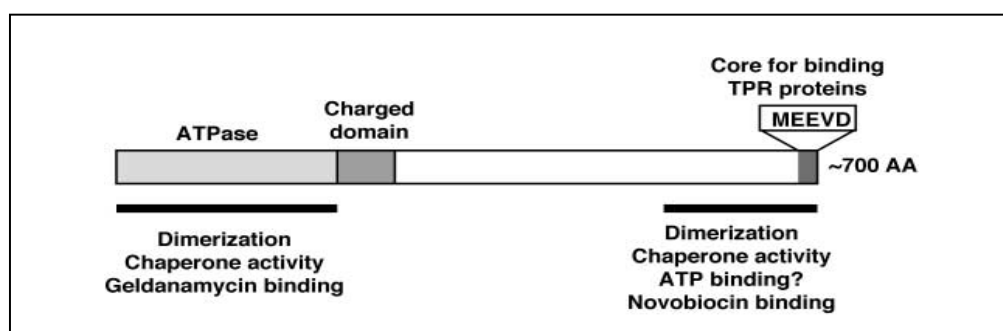
	AtHSP90-1	AtHSP90-2	AtHSP90-3	AtHSP90-4	AtHSP90-5	AtHSP90-6	AtHSP90-7
AtHSP90-1	100	88	85	87	49	48	53
AtHSP90-2		100	96	97	48	46	52
AtHSP90-3			100	44	47	45	51
AtHSP90-4				100	48	46	52
AtHSP90-5					100	68	48
AtHSP90-6						100	49
AtHSP90-7							100

**Πίνακας 1.2** Ποσοστό % ομολογίας σε αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των μελών της οικογένειας των *HSP90* γονιδίων.

#### 1.4.4.α Δομή των HSP90

Οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούνται από τέσσερις δομικές περιοχές:

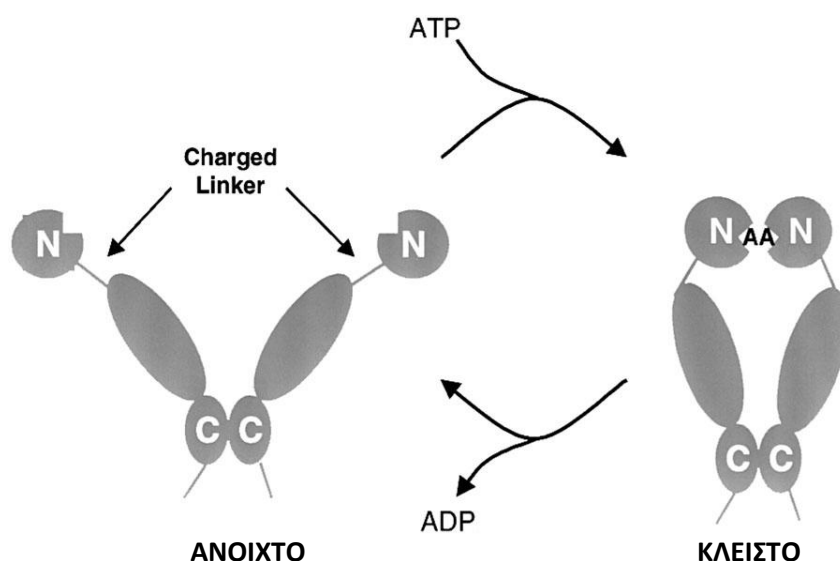
- την πολύ καλά συντηρημένη αμινοτελική περιοχή μεγέθους ~ 25 kDa
- μια φορτισμένη περιοχή σύνδεσης με μεταβλητό μέγεθος που ενώνει την αμινοτελική με την κεντρική περιοχή
- την κεντρική περιοχή μεγέθους ~40 kDa και
- την πολύ καλά συντηρημένη καρβόξυ-τελική περιοχή μεγέθους ~12 kDa



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση της δομής των HSP90.

Η αμινο-τελική περιοχή περιέχει την περιοχή πρόσδεσης για την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) καθώς και αυτή του αναστολέα τζελνταναμικίνη. Αποτελείται από 8 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και 9 α-έλικες που μαζί συνιστούν την α/β δομή. Η σύνδεση του ATP γίνεται στην περιοχή 15Å, που στην πραγματικότητα είναι μια θήκη που σχηματίζεται από την διαμόρφωση των β-πτυχωτών περιοχών με τις α-έλικες (Buchner J., 1999). Η κεντρική περιοχή αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος πρόσδεσης με τη πρωτεΐνη – πελάτη. Τέλος η καρβόξυ-τελική περιοχή αποτελεί περιοχή διμερισμού. Στο καρβόξυ-τελικό άκρο των κυτταροπλασματικών μελών παρατηρείται η παρουσία του πενταπεπτιδίου MEEVD.

Η HSP90 πρωτεΐνη αποτελεί ένα εύκαμπτο επιμηκυσμένο διμερές. Η περιοχή σύνδεσης βρίσκεται στην καρβόξυ-τελική περιοχή και τα αμινοτελικά άκρα έχουν αντίθετες κατευθύνσεις. Σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης παρατηρούνται δομικές αλλαγές στο μόριο της πρωτεΐνης οι οποίες φέρνουν τις αμινοτελικές περιοχές κοντά (Buchner J., 1999).



**Εικόνα 1.5 ATPase κύκλος της HSP90.** Η HSP90 χωρίς δεσμευμένη ATP βρίσκεται σε μία ανοιχτή κατάσταση με τα καρβοξυ-τελικά άκρα της συνεχώς σε διμερή μορφή. Μετά τη πρόσδεση ATP στην αμινο-τελική περιοχή επάγονται αλλαγές της διαμόρφωσης που οδηγούν στην ενοποίηση των N-τελικών περιοχών.

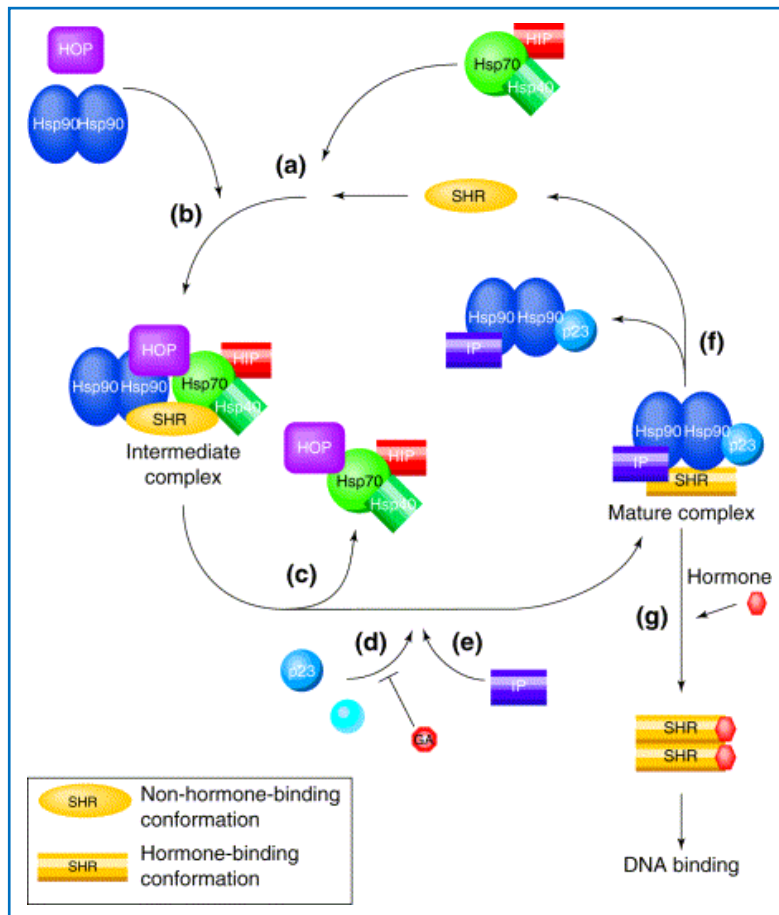
#### 1.4.4.β Οι HSP90 ως μοριακοί συνοδοί

Η δράση των HSP90 πρωτεϊνών ως μοριακοί συνοδοί είναι γνωστή. Βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, στη μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου μεμβρανών, συμβάλλουν στην παρεμπόδιση συσσώρευσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών καθώς και στην ορθή αναδίπλωση κακώς αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων. Τέλος εμπλέκονται σε συστήματα μεταγωγής σήματος, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών (Wang et al., 2004).

Οι HSP90 πρωτεΐνες μπορούν να δράσουν είτε ανεξάρτητα σαν τσαπερόνιο είτε ως μέλος ενός πολύπλοκου πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο ονομάζεται CCH (Cytoplasmic Chaperone Heterocomplex). Το CCH έχει μελετηθεί περισσότερο στα θηλαστικά, όπου παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς στεροειδών ορμονών και πρωτεϊνικές κινάσες. (Buchner J., 1999). Η HSP90 μαζί με τουλάχιστον έξι πρωτεΐνες-συνέταιρους συνδέονται στον υποδοχέα ορμονών. Η δημιουργία αυτού του συμπλέγματος είναι απαραίτητη για την μετέπειτα σύνδεση της ορμόνης στον υποδοχέα. Μετά την σύνδεση του υποκαταστάτη και την διάσπαση του CCH, το ενεργοποιημένο πλέον σύστημα ορμόνης-υποδοχέα λειτουργεί ως μεταγραφικός

παράγοντας. Σε περίπτωση απουσίας του υποκαταστάτη, οι υποδοχείς συνδέονται με την HSP70 και ξεκινούν έναν καινούριο κύκλο. Δυο σημαντικοί παράγοντες οδήγησαν στον χαρακτηρισμό της λειτουργίας του συστήματος CCH: α) το σύστημα μπορεί να συγκροτηθεί *in vitro* μετά από απομόνωση των συστατικών και β) αυτή η κατασκευή μπορεί να παρεμποδισθεί από την τζελνταναμυκίνη, αναστολέα της δράσης της HSP90 (Buchner J., 1999).

Οι βοηθοί-τσαπερόνια ή αλλιώς πρωτεΐνες-συνέταιροι (HSP90 partner proteins) που συμμετέχουν στο σύστημα CCH είναι οι εξής: Hip (HSP70 πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης), Hop (HSP70/HSP90 πρωτεΐνη οργάνωσης), p23, PPI, HSP40 (ομόλογο της DnaJ), και η p50 (Cdc37) η οποία έχει ανιχνευθεί μόνο σε συστήματα με υπόστρωμα κινάσες. (Miernyk A. J., 1999; Zhang Z. et al., 2003). Τα μέλη της οικογένειας των HSP90 συνδέονται με μια πληθώρα πρωτεϊνικών υποστρωμάτων όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Steroid Hormone Receptors, SHRs) περιλαμβάνονται οι υποδοχείς προγεστερόνης, γλυκοκορτικοειδών, οιστρογόνων, ανδρογόνων, μεταλλοκορτικοειδών και η θέση σύνδεσης ορμονών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Παραδείγματα πρωτεϊνικών κινάσων αποτελούν η v-SRC, η Weel, η EIF-2a kinase, η Ste11, η Raf-1 και η Gcn2. Αλλά μόρια - υποστρώματα είναι η συνθετάση του οξειδίου του αζώτου, η p53, η ανάστροφη μεταγραφάση (RT), ο TNF (Tumor Necrosis Factor), η τουμπουλίνη και η τελομεράση. Τέλος υπάρχουν και *in vitro* υποστρώματα όπως η λουσιφεράση, η β-γαλακτοσιδάση και η ινσουλίνη. Το καλύτερα μελετημένο *in vivo* υπόστρωμα αποτελούν οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Steroid Hormone Receptors, SHRs). Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες υποδοχείς, οι SHRs είναι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που κινούνται παλινδρομικά μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Οι HSP90 συνδέονται εξειδικευμένα με τα SHRs απουσία στεροειδών ορμονών. Η παρουσία ορμόνης προκαλεί διάσπαση του συμπλέγματος HSP90-SHR και διμερισμό του υποδοχέα, γεγονός που επιτρέπει την σύνδεση του τελευταίου με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA αλλά και την ρύθμιση της μεταγραφής. Η παρουσία των HSP90 καθιστά τους υποδοχείς ανενεργούς (δεν είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή) γι' αυτό το λόγο πιστεύεται ότι λειτουργούν ως καταστολείς. (Buchner J., 1999).



**Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση ετεροσυμπλόκου μεταξύ στεροειδών υποδοχέων: HSP90**  
**(a)** Στις αρχικές αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν μόνο οι HSP70 και οι πρωτεΐνες-συνέταιροι. **(b)** Η πρωτεΐνη HOP (HSP organized protein), προσδένεται σε ειδικές περιοχές των HSP90 και HSP70 οδηγώντας στην μεταξύ τους σύνδεση. **(c-e)** Απομακρύνονται από το σύμπλοκο οι HSP70. Ακολουθεί πρόσδεση p23 και ανοσοφιλλίνης (IP). Η πρωτεΐνη p23 συμβάλλει στη σταθεροποίηση του συμπλόκου HSP90 – στεροειδούς υποδοχέα που δημιουργείται μετά την πρόσδεση του ATP. Οι ανοσοφιλλίνες, προσδένονται στις HSP90, συνήθως στη θέση των HOP και συμμετέχουν στην σωστή καθοδήγηση και μεταφορά των στεροειδών ορμονών στο κατάλληλο οργανίδιο, π.χ πυρήνα. **(f)** Ο υποδοχέας πρόσδεσης στεροειδών ορμονών απελευθερώνεται από το σύμπλοκο. **(g)** Ο SHR συνδέεται με την ορμόνη, διμερίζεται και συνδέεται στο DNA του οποίου ρυθμίζει την μεταγραφή



#### 1.4.4.γ HSP90 και φαινοτυπική ποικιλομορφία

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, ο ανασχεδιασμός της μορφολογίας και των λειτουργιών εκφράζεται σε γενετικές διαφορές μεταξύ ατόμων και πληθυσμών (Queitsch et al., 2002). Γενικότερα οι φαινότυποι αγρίου τύπου είναι ιδιαίτερα σταθεροί σε διαταραχές που προκύπτουν από γενετικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές. Σύμφωνα με τον Waddington, η σταθερότητα του αγρίου τύπου πρέπει να ληφθεί ως απόδειξη για τη ρύθμιση του γενοτύπου έναντι μικρών διακυμάνσεων όχι μόνο στο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται τα ζώα αλλά και της γενετικής τους φύσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται καναλοποίηση. Ωστόσο η ρυθμιστική αυτή ικανότητα των οργανισμών μπορεί να εκλείψει εξαιτίας κάποιας διαταραχής (γενετικής, επιγενετικής, περιβαλλοντικής) δημιουργώντας ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων (Waddington, 1953, 1956; McLaren, 1999). Οι φαινότυποι αυτοί μπορούν να διατηρηθούν μέσω της φυσικής επιλογής και να κληρονομηθούν με αποτέλεσμα να μην επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και να γίνονται μόνιμα χαρακτηριστικά των οργανισμών. Το συγκεκριμένο φαινόμενο ονομάζεται “γενετική αφομοίωση”(Waddington, 1953, 1956) .

Οι HSP90 είναι πιθανό να εμπλέκονται στο μοριακό μηχανισμό της «καναλοποίησης» και της γενετικής αφομοίωσης, καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως μπορούν και ρυθμίζουν περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές (Rutherford and Lindquist, 1998). Παρέμβαση στη λειτουργία των HSP90 είτε μέσω μετάλλαξης είτε μέσω φαρμακευτικής παρεμπόδισης επηρέασε καθολικά την καναλοποίηση σε μύγες και φυτά καθώς προέκυψε πληθώρα φαινοτύπων. Αυτό συμβαίνει διότι οι HSP90 πρωτεΐνες συμμετέχουν στην ωρίμανση και την σταθεροποίηση πολλών ασταθών πρωτεϊνών-στόχων, όπως κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες, υποδοχείς στεροειδών ορμονών, πολλές από τις οποίες αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές διαφόρων βιολογικών μονοπατιών.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των HSP90 στην φαινοτυπική πλαστικότητα κατά την οποία ένας δεδομένος γονότυπος μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινοτύπους επηρεαζόμενος από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η φαινοτυπική πλαστικότητα μπορεί να είναι εξαιρετικά ρυθμιζόμενη και ευπροσάρμοστη ή να επάγεται ως αμυντικός μηχανισμός. Η εμπλοκή του HSP90 τσαπερονίου στους μηχανισμούς άμυνας των φυτικών οργανισμών σχετίζεται με τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών R (resistance). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιτρέπουν την αναγνώριση ειδικών μορίων των παθογόνων. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση μονοπατιών άμυνας συνήθως επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), η οποία οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στο σημείο της μόλυνσης

(Belkhadir et al., 2004; Schulze-Lefert, 2004). Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η μόλυνση φυτών από το *Pseudomonas syringae* προκαλεί υπερέκφραση των θερμοεπαγόμενων γονιδίων *HSP90.1* και *HSP90.2*, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στα ίδια μονοπάτια με τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας RPM1 και RPS2 (Takahashi et al., 2003). Είναι επίσης γνωστό ότι μείωση της δράσης του HSP90 τσαπερονίου έχει ως αποτέλεσμα μείωση της ανθεκτικότητας των φυτών σε διάφορα παθογόνα (Hubert et al., 2003).

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* μερική παρεμπόδιση της έκφρασης των HSP90 με χρήση τζελνταναμυκίνης οδήγησε σε ποικιλία φαινοτύπων όπως παρουσία επιναστικών κοτυληδόνων, ασυμμετρία στο σχηματισμό των φύλλων ροζέτας και ανώμαλη ανάπτυξη των τριχιδίων τις ρίζας (Queitsch et al., 2002).

Τα οργανιδιακά μέλη των *HSP90* έχει δειχθεί πως επηρεάζουν την ομαλή ανάπτυξη των φυτών. Μετάλλαξη του χλωροπλαστικού *HSP90.5* προκαλεί μεταβολή στην απόκριση του φυτικού οργανισμού στο κόκκινο φως, αντοχή στη χλώρωση και συνεχώς καθυστερημένη ανάπτυξη των χλωροπλαστών στο μετάλλαγμα *cr88*. Μετάλλαξη του *HSP90.7* (ER) προκάλεσε φαινοτύπους ανθικών και βλαστικών μεριστωμάτων στο μετάλλαγμα *shepherd* που έμοιαζαν εκείνους των *clavata* (*clv*) μεταλλαγμάτων (Ishigouro et al., 2002).

Συμπερασματικά το HSP90 τσαπερόνιο περιορίζει το μέγεθος των διαταραχών της ανάπτυξης, αποτελεί προϋπόθεση του πολυμορφισμού κατά τη μορφογένεση των πολυκύτταρων οργανισμών και τέλος εμπλέκεται στη ρύθμιση του αναπτυξιακού προτύπου (Samakovli et al., 2007).

#### **1.4.5 Η οικογένεια των HSP100 πρωτεϊνών (CLP)**

Μέλη αυτής της οικογένειας έχουν απομονωθεί από ευβακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 84 έως 104kDa. Συμμετέχουν στην παρεμπόδιση συσσώρευσης καθώς και στην αποικοδόμηση μετουσιωμένων πρωτεϊνών στο κύτταρο.

Οι οικογένεια των HSP100 διαχωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Τα μέλη της πρώτης κατηγορίας (Clp A, Clp B, Clp C, Clp D) έχουν στο μόριό τους δύο θέσεις πρόσδεσης νουκλεοτιδίων ενώ τα μέλη της δεύτερης κατηγορίας (Clp M, Clp N, Clp X, Clp Y) έχουν μία (Schirmer et al., 1996) .

Στα φυτά εντοπίζονται υποκυτταρικά στο κυτταρόπλασμα, στο χλωροπλάστη και στα μιτοχόνδρια. Η έκφρασή τους ρυθμίζεται αναπτυξιακά αλλά επάγεται και από διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως συνθήκες υψηλής αλατότητας, ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, ψύχος και επιδράσεις βαρέων μετάλλων (Schirmer et al., 1994).

### 1.5 Παράγοντες θερμικής καταπόνησης

Οι παράγοντες θερμικής καταπόνησης (Heat Shock Factors, HSFs) είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των θερμοεπαγόμενων γονιδίων υπό συνθήκες θερμικού στρες σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των φυτών (Morimoto R.I., 1998). Σε φυσιολογικές συνθήκες οι παράγοντες θερμικού σοκ βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση ως μονομερή. Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση ασυνήθιστων πρωτεϊνών μετά από κάποια μορφή καταπόνησης ενεργοποιεί τους HSFs που σχηματίζουν έτσι τριμερείς δομές.

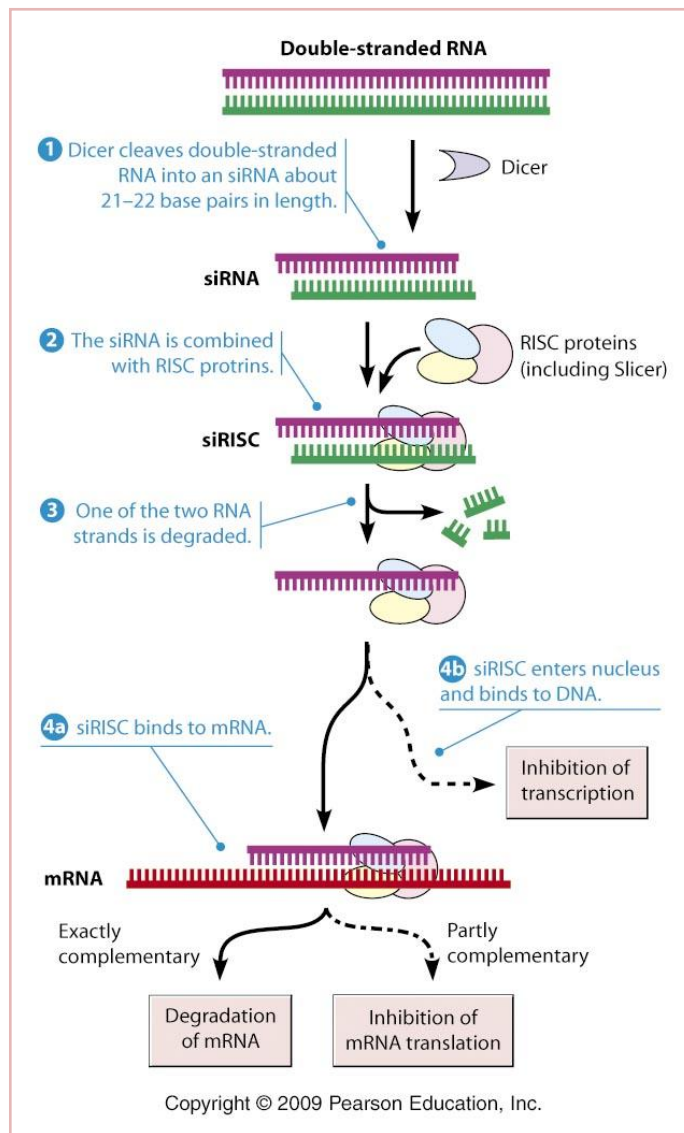
Ο HSF συνδέεται με το στοιχείο θερμικού σοκ (Heat Shock Element, HSE) το οποίο αποτελεί μια συγκεκριμένη DNA αλληλουχία (nGAAn) στον προαγωγέα των *HSP* γονιδίων. Η τυπική θέση πρόσδεσης του HSF αποτελείται από τρεις επαναλήψεις του HSE (HSE3)(Morimoto R.I., 1998). Η επιτυχής πρόσδεση του HSF στο HSE προϋποθέτει την απόκτηση τριμερούς δομής του τελευταίου (Sorgger et al., 1988). Στους ζωικούς οργανισμούς και στη ζύμη απαντώνται λίγα HSF γονίδια σε αντίθεση με τους φυτικούς οργανισμούς στους οποίους απαντώνται πολλά HSF ομόλογα κατηγοριοποιημένα σε τρεις υποοικογένειες (A,B,C). Για παράδειγμα η *Drosophila melanogaster* και ο *Saccharomyces cerevisiae* έχουν από ένα αντίγραφο ενώ το *Arabidopsis thaliana* διαθέτει 21 ομόλογα.

Οι φυτικοί παράγοντες θερμικής καταπόνησης αποτελούνται από μια υψηλά συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή πρόσδεσης του DNA, μια υδρόφοβη HR-A/B περιοχή και μια περιοχή μεταγραφική ενεργοποίησης. Η HR-A/B περιοχή συνδέεται με την περιοχή πρόσδεσης του DNA και είναι υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό του HSF (Nover et al., 2001).

## 1.6 Μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης

Η RNA αποσιώπηση αποτελεί ένα σύστημα γονιδιακού ελέγχου που απαντάται σε διάφορους οργανισμούς όπως φυτά, ζώα, μύκητες ακόμα και πρωτόζωα. Στους φυτικούς οργανισμούς χρησιμοποιούνται οι όροι συγκαταστολή ή μετά-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS), στους μύκητες χρησιμοποιείται ο όρος καταστολή και στους ζωικούς οργανισμούς χρησιμοποιείται ο όρος RNA παρεμβολή (RNA interference). (Baulcombe, 1999; Ding, 2000; Vance and Vaucheret, 2001). Κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη φυτών και ζώων ενεργοποιώντας ένα ευαίσθητο σύστημα γονιδιακής ρύθμισης ,μετα-μεταγραφικά, επαγόμενο από την παρουσία δίκλωνου RNA, dsRNA (double stranded RNA). Επίσης λειτουργεί ως ένας αμυντικός μηχανισμός έναντι ιών, μεταθετών στοιχείων και ενδεχομένως άλλων επαναλαμβανόμενων γενωματικών ακολουθιών (αποσταθεροποίησης).

Ο μηχανισμός της RNA παρεμβολής (RNA interference), ο οποίος επάγεται από δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης, ελέγχεται από το RNA επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης, RISC (RNA induced silencing complex). Όσον αφορά την περίπτωση των διαγονιδίων το δίκλινο RNA είναι αποτέλεσμα εισαγωγής αλληλουχιών με αντίστροφο προσανατολισμό ως προς το γονίδιο στόχο. Στο στάδιο αυτό συμμετέχει και το ένζυμο RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) η οποία χρησιμοποιεί ως μήτρα μονόκλινο RNA (συμμετέχοντας έτσι στη διαδικασία σχηματισμού δίκλωνων μορίων RNA). Στη συνέχεια η πρωτεΐνη Dicer η οποία περιέχει μια αμινοτελική περιοχή RNA ελικάσης, μια περιοχή δέσμησης RNA γνωστή ως περιοχή PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), δύο περιοχές RNase III και μια περιοχή δέσμησης δίκλωνου RNA (dsRBD)(Collins and Cheng, 2005) προσδένεται στα δίκλινα RNA και τα διασπά σε μικρά τμήματα μήκους 22-23 ζευγών βάσεων με 2-3 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο, δημιουργώντας έτσι τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (short interfering RNAs, siRNAs). Μία από τις δύο αλυσίδες του siRNA ενσωματώνεται στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC (RNA induced silencing complex) το οποίο περιέχει πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute (ενδονουκλεάσες). Το σύμπλοκο RISC είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη αποικοδόμηση συγκεκριμένων mRNA-στόχων (Matthew et al., 2006), τα οποία παρουσιάζουν ομολογία με την ακολουθία του siRNA.



**Εικόνα 1.7** Απεικόνιση των βημάτων του μηχανισμού της αποσιώπησης.. Η εισαγωγή στο κύτταρο μεγάλων δίκλωνων μορίων RNA (*dsRNAs*) ενεργοποιεί το μηχανισμό της αποσιώπησης.**(1)**: Το δίκλωνο μόριο πέπτεται σε μικρότερα τμήματα 21-24 νουκλεοτιδίων(, *siRNAs*) με τη βοήθεια του ενζύμου *Dicer*. **(2), (3)**: Τα *siRNAs* ενσωματώνονται στο RNA-inducing silencing complex (*RISC*) με τη βοήθεια των *Argonaute (Ago)* πρωτεϊνών. Οι *Ago* επιλέγει και αποκόπτει την μία αλυσίδα (*sense*) από το σύμπλοκο. **(4), (5)**: Η εναπομένουσα αλυσίδα (*antisense*) του *siRNA* καθοδηγεί το *RISC* σε ομόλογες με αυτήν *mRNA*- περιοχές με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του *mRNA* και συνεπώς την καταστολή της έκφρασης.

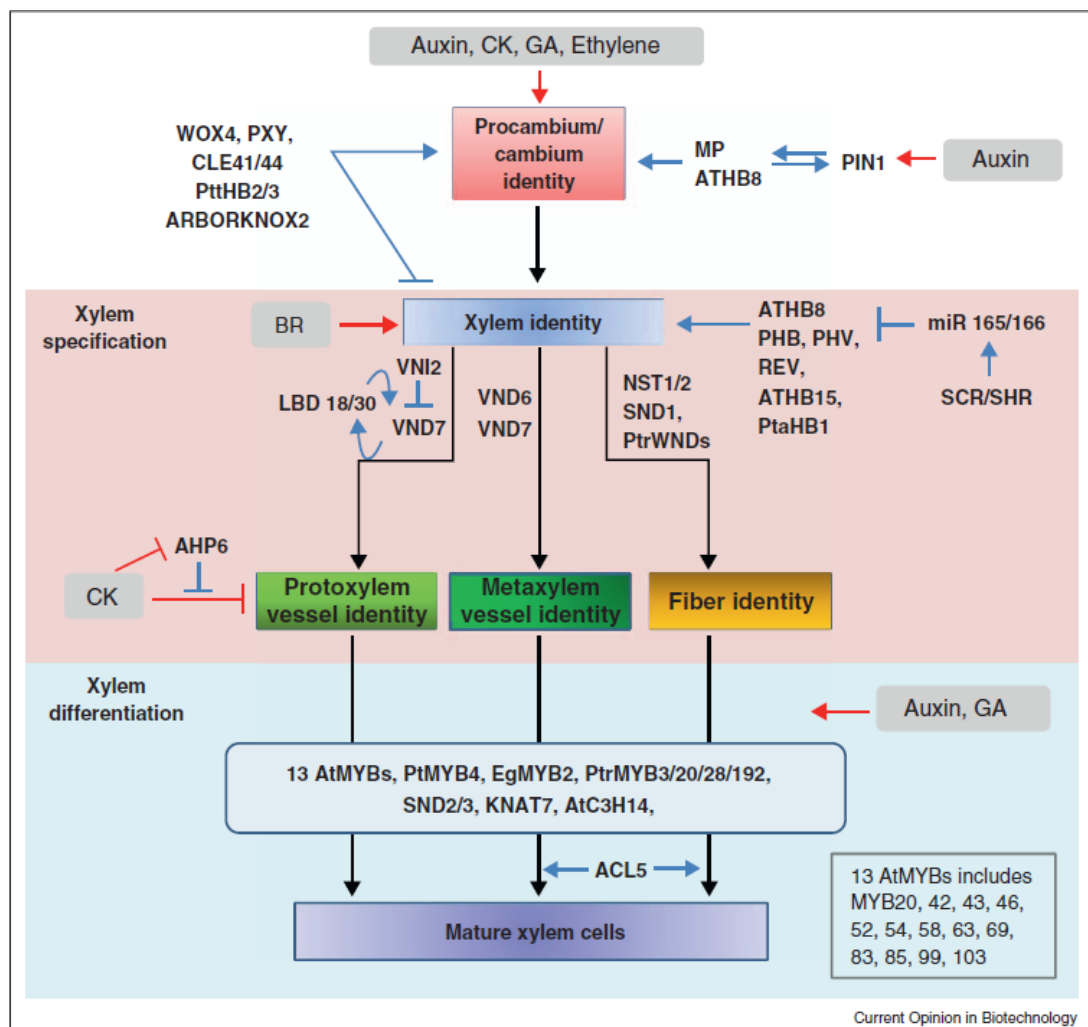
## 1.7 Ο αγγειακός ιστός

Τα αγγειώδη φυτά (τραχεόφυτα) έχουν προσαρμοστεί σε μια ποικιλία από περιβάλλοντα που κυμαίνονται από άνυδρες ερήμους μέχρι τροπικά δάση, και σήμερα περιλαμβάνουν περισσότερα από 250.000 είδη. Ενώ διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στην εμφάνιση και στις συνθήκες ανάπτυξης, έχουν ένα παρόμοιο σύστημα εξειδικευμένων ιστών (αγγειακός ιστός) για τη μεταφορά νερού και θρεπτικών ουσιών σε όλο τον οργανισμό. Ο αγγειακός ιστός των φυτών συνδέει μεταξύ τους όλα τα φυτικά όργανα και αποτελείται από δύο βασικά είδη ιστών, το ξύλο και τον ηθμό.

Στα ανώτερα φυτά, οποιαδήποτε περίσσεια θρεπτικών συστατικών που παράγονται μέσω φωτοσύνθεσης και δεν απαιτούνται για τη συντήρηση του γενικού μεταβολισμού, επενδύονται στην ανάπτυξη και μεταφέρονται από τα φωτοσυνθετικά όργανα στους αποταμιευτικούς ιστούς. Αυτή η μεταφορά πραγματοποιείται από τον ηθμό, έναν άκρως εξειδικευμένο ιστό που αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων: τους ηθμοσωλήνες, τα συνοδά κύτταρα και τα κύτταρα του ηθμώδους παρεγχύματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το αγγειακό σύστημα περιλαμβάνει επίσης τον ξυλώδη ιστό, ο οποίος μεταφέρει νερό και διαλυμένα μέταλλα από την ρίζα προς το υπέργειο τμήμα του φυτού. Το ξύλο αποτελεί αποταμιευτικό ιστό, που ενσωματώνει τα ζάκχαρα σε νέα κυτταρικά τοιχώματα και αποτελεί τον κύριο ιστό συσσώρευσης βιομάζας σε πολυετή δικοτυλήδονα. Τρεις βασικοί τύποι κυττάρων απαντώνται στο ξύλωμα σχεδόν όλων των αγγειώδων φυτών: τα αγγεία του ξύλου, τα οποία είναι υπεύθυνα για την μεταφορά νερού και διαλυτών ουσιών; οι ξυλώδεις ίνες, οι οποίες διαθέτουν μεγάλα σε πάχος δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα για την παροχή μηχανικής στήριξης; και τα παρέγχυμα κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ίνες.

Η έκταση του ξυλώδους ιστού είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη του φυτού, επειδή η δυναμικότητα της διακίνησης του νερού και των διαλυτών ουσιών οριοθετεί την ανάπτυξη του βλαστού καθώς το φυτό μεγαλώνει. Τα δικοτυλήδονα, έχουν λύσει αυτό το αναπτυξιακό πρόβλημα με τη συνεχή επέκταση των αγγειακών τους ιστών σε όλο τον κύκλο ζωής τους, με αποτέλεσμα την ακτινωτή διαστολή βλαστού και ρίζας. Αυτή η λεγόμενη δευτερογενής ανάπτυξη προσφέρει επίσης το πλεονέκτημα ότι τα μη λειτουργικά αγγεία του ξύλου μπορεί να αντικατασταθούν, καθώς δεν μπορούν να αντισταθμίζουν για πάντα την αρνητική πίεση που δημιουργείται λόγω της διαπνοής. Επιπλέον, επειδή η αρνητική πίεση σε συνδυασμό με την μηχανική καταπόνηση αυξάνουν λόγω ύψους, η δευτερογενής ανάπτυξη επιτρέπει στα φυτά να ψηλώσουν, και ως εκ τούτου αποτελεί τον μηχανισμό που συνέβαλε τα μέγιστα στην εξέλιξη των δέντρων.

Η δευτερογενής ανάπτυξη σχετίζεται με την ενεργότητα του δεσμικού καμβίου, ένα δευτερογενές μερίστωμα που περιβάλλεται από τον ηθμό και το ξύλο μέσα σε μια αγγειακή δεσμίδα. Τα καμβιακά βλαστικά κύτταρα παράγουν θυγατρικά κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν σε ηθμό ή ξύλο, ανάλογα με την πολικότητα. Μελέτες στο *Arabidopsis thaliana* έχουν υποδείξει διάφορα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σωστή διαφοροποίηση των κυττάρων του αγγειακού ιστού, και πολλά μεταξύ αυτών εμπλέκουν ορμονικά μονοπάτια (Zhang et al. 2011). Για παράδειγμα, η πολική μεταφορά της αυξίνης απαιτείται για την de novo αγγειακή διαφοροποίηση και τον σχηματισμό του αγγειακού μοτίβου, ενώ η κυτοκίνη έχει έναν κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό της ταυτότητας του ξύλου έναντι του ηθμού. Σε διάφορα είδη, το μονοπάτι της γιββερελλίνης (GA) έχει εμπλακεί στην προαγωγή της ξυλογένεσης σε συνδυασμό με το μονοπάτι της αυξίνης, καθώς και στην επαγωγή της διαφοροποίησης ίνας (Mauriat and Moritz, 2009).



**Εικόνα 1.8 :** Ρυθμιστικό δίκτυο σχηματισμού του ξύλου στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και στα δέντρα. Τα προκαμβιακά και καμβιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε διάφορων ειδών κύτταρα ξύλου κατά

την διάρκεια της πρωτογενούς και δευτερογενούς ανάπτυξης. Η ρύθμιση του μονοπατιού της ξυλογένεσης φαίνεται να είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των ποωδών και των ξυλωδών ειδών και μάλιστα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι μεταγραφικοί παράγοντες, φυτικές ορμόνες και άλλοι ρυθμιστικοί παράγοντες. CK: κυτοκίνη, GA: γιββερελίνη, JA: γιασμονικό οξύ, BR: μπρασινοστεροειδή (Zhang et al. 2011).

## 1.8 Γιββερελλίνες

Οι γιββερελλίνες (GAs) είναι φυτορμόνες που ελέγχουν την ανάπτυξη καθόλη τη διάρκεια ζωής των ανθοφόρων φυτών. Ο ρόλος των γιββερελλινών στην επιμήκυνση του βλαστού σπορόφυτων, αγγειόσπερμων και γυμνόσπερμων ανακαλύφθηκε με αφορμή μία ασθένεια του ρυζιού, ονόματι *Bakanae*. Η προσβολή των φυτών ρυζιού από τον παθογόνο μύκητα *Gibberella fujikuroi* έχει σαν αποτέλεσμα την υπερβολική αύξηση των στελεχών τους. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην παραγωγή συγκεκριμένων χημικών ουσιών από τον μύκητα που αργότερα ονομάστηκαν γιββερελλίνες. Από τότε πάνω από 130 GAs έχουν εντοπιστεί στα αγγειώδη φυτά, καθώς και σε μύκητες και βακτήρια. Ωστόσο, λίγες είναι οι γιββερελλίνες που είναι ενεργοί ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών (εικόνα 2), με την πλειοψηφία να αποτελεί βιοσυνθετικά ενδιάμεσα των βιοδραστικών γιββερελλινών (Tai-ping Sun, 2011).

Οι ενεργές GAs ρυθμίζουν ταυτόχρονα την βλαστητική και αναπαραγωγική ανάπτυξη των φυτών. Στο *Arabidopsis*, οι γιββερελλίνες είναι απαραίτητες για την βλάστηση των σπόρων, την ανάπτυξη των φύλλων και της ρίζας, την επαγωγή της ανθοφορίας, την επιμήκυνση του ανθοφόρου βλαστού (bolting), την ανάπτυξη των ανθών και των πετάλων αλλά και την ανάπτυξη του καρπού και του σπόρου. Επιπλέον οι GAs απαιτούνται σε δύο διακριτές φάσεις δημιουργίας του αγωγού ιστού στην ιτιά: στην ξυλογένεση, που διαμεσολαβεί από την GA σηματοδότηση στο κάμβιο, και στην δημιουργία ξυλωδών ινών (Mauriat and Moritz, 2009). Έρευνες έδειξαν πως μεταλλάγματα έλλειψης γιββερελλινών εμφανίζουν πλειοτροπικούς φαινοτύπους κατά τη διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου όπως είναι δραματική μείωση της βλαστικότητας των σπόρων, σκούρες πράσινες συμπαγείς ροζέτες, νανισμό, καθυστέρηση στην ανθοφορία και στείρα φυτά.

### 1.8.1 Βιοσύνθεση και καταβολισμός των γιββερελλινών

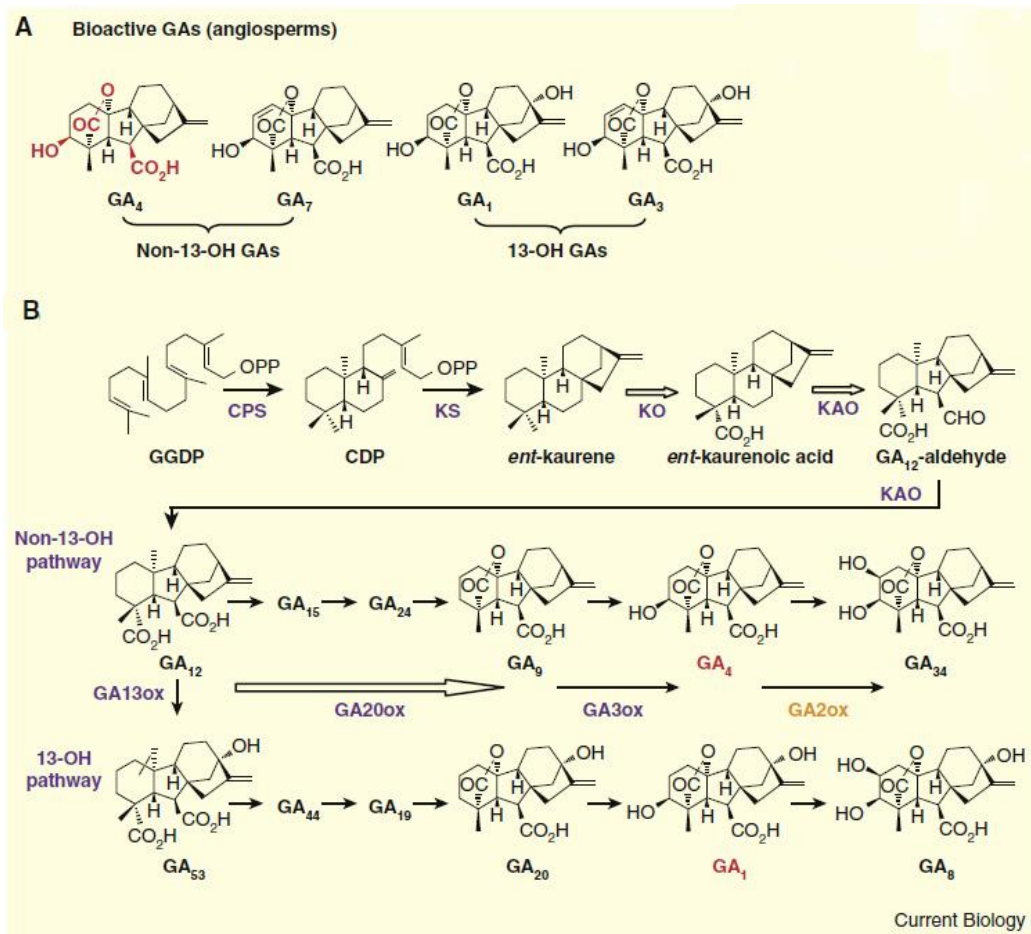
Η βιοσύνθεση των γιββερελλινών στους ανώτερους φυτικούς οργανισμούς μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια:

1. Βιοσύνθεση του *ent-kaurene* από το γερανυλγερανυλοδιφωσφορικό (GGPP) στα πλαστίδια. Το GGDP αποτελεί κοινή πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση γιββερελλινών, καρτενοειδών και χλωροφυλλών. Το GGDP μετατρέπεται σε *ent-*



*kaurene* μέσω μιας αντίδρασης κυκλοποίησης δύο σταδίων που καταλύεται από την *ent-copalyl* διφωσφορική συνθάση (CPS) και την *ent-kaurene* συνθάση (KS).

- Μετατροπή του *ent-kaurene* σε GA<sub>12</sub> ή GA<sub>53</sub> στο ενδοπλασματικό δίκτυο από τη δράση των ενζύμων *ent-kaurene* οξειδάση (KO) και *ent-kaurenoic acid* οξειδάση (KAO)
- Μετατροπή των GA<sub>12</sub> ή GA<sub>53</sub> μέσω οξειδωτικών διεργασιών σε άλλες μορφές ενεργών ή μη γιββερελλινών. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις καταλύονται από τις 2-οξογλουταρικού εξαρτώμενες διοξυγενάσες (2ODDs), τις GA 20-οξειδάσες (GA20ox) και τις GA 3-οξειδάσες (GA3ox). Το κοινό χαρακτηριστικό των τεσσάρων ενεργών GAs που προκύπτουν, GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> είναι η ύπαρξη μιας 3β-υδροξυλομάδας. Η 2β-υδροξυλίωση, η οποία καταλύεται από μια υποομάδα των 2ODDs, τις GA 2-οξειδάσες (GA2ox), αποτελεί την βασική αντίδραση μετατροπής των ενεργών GAs σε μη ενεργές μορφές. Δύο επιπλέον μηχανισμοί απενεργοποίησης των GAs είναι η εποξείδωση των μη υδροξυλιωμένων GAs στο ρύζι και η μεθυλίωση στην *Arabidopsis*.



**Εικόνα 1.9:** Μονοπάτι βιοσύνθεσης και καταβολισμού των γιββερελλινών στα φυτά. (Α) Ενεργές γιββερελλίνες. Η  $GA_3$  είναι η πιο κοινή ενεργή γιββερελλίνη στους μύκητες ενώ η  $GA_4$  είναι η κύρια ενεργή γιββερελλίνη στο *Arabidopsis thaliana*. (Β) Βιοσύνθεση γιββερελλινών από GGDP και απενεργοποίηση από το ένζυμο GA2ox. Μαύρα βέλη: αντίδραση ενός σταδίου. Διάφανα βέλη: αντίδραση πολλαπλών σταδίων. Κόκκινο: ενεργές GAs. Μώβ: ένζυμα βιοσύνθεσης. Πορτοκαλί: ένζυμο καταβολισμού (πηγή: Tai-ring Sun, 2011)

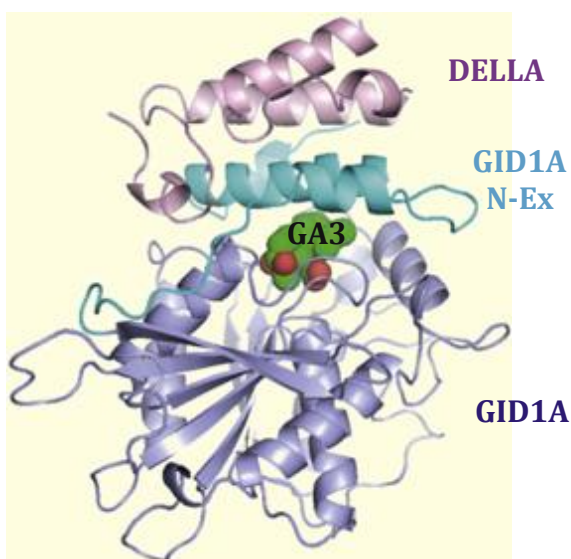
### 1.8.2 Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος GA-GID1-DELLA

Βασικοί ρυθμιστές του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των GAs είναι οι παρεμποδιστές ανάπτυξης πρωτεΐνες DELLA. Οι DELLA είναι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια GRAS. Καταστέλλουν το σινιάλο των γιββερελλινών και περιορίζουν την ανάπτυξη των φυτών, πιθανώς προκαλώντας μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό. Το γονιδίωμα του *Arabidopsis* κωδικοποιεί για πέντε πρωτεΐνες DELLA -GA-INSENSITIVE [GAI], REPRESSOR OF GA1-3 [RGA], RGA-LIKE1[RGL1], RGL2, και RGL3- στις οποίες απαντάται το DELLA μοτίβο στο αμινοτελικό άκρο (GA-επαγόμενη αποικοδόμηση) καθώς και μια συντηρημένη GRAS περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο (μεταγραφική ρύθμιση). Γενετικές αναλύσεις υπέδειξαν ξεχωριστές αλλά και επικαλυπτόμενες λειτουργίες των DELLA πρωτεϊνών στην παρεμπόδιση της GA απόκρισης. Για παράδειγμα οι RGA και GAI καταστέλλουν την επιμήκυνση του βλαστού (King et al., 2001), η RGL2 εμποδίζει την βλάστηση των σπερμάτων (Lee et al., 2002) και οι RGA, RGL1 και RGL2 μαζί ρυθμίζουν την ανάπτυξη του άνθους (Cheng et al., 2004). Γενικότερα οι DELLA πρωτεΐνες καθυστερούν την ανάπτυξη του φυτού σε αντίθεση με τις γιββερελλίνες που την ενισχύουν.

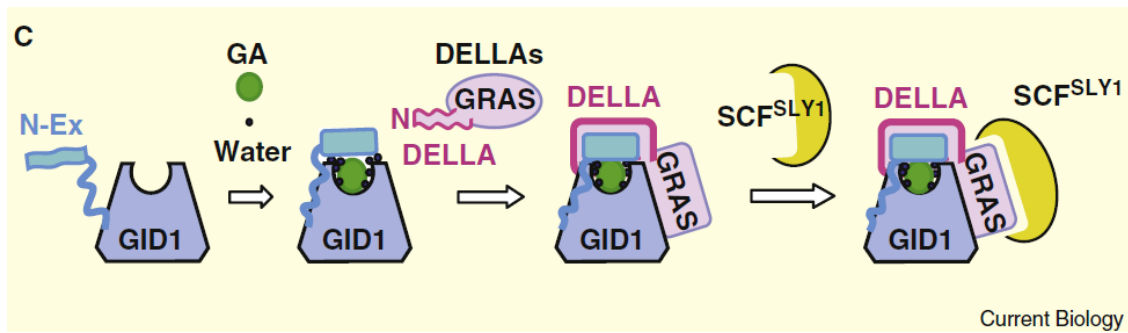
Το σήμα γίνεται αντιληπτό από τον υποδοχέα GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), ο οποίος εντοπίστηκε για πρώτη φορά από μελέτες που έγιναν σε νάνα μεταλλάγματα ρυζιού. Το *Arabidopsis* περιέχει τρία GID1 ορθόλογα (GID1A, GID1B και GID1C) (Nakajima et al., 2006), τα οποία έχουν διαφορετικές αλλά και επικαλυπτόμενες λειτουργίες στη ρύθμιση διαφόρων αναπτυξιακών διεργασιών. Επιπλέον, in vitro δοκιμασίες σύνδεσης έδειξαν ότι οι OsGID1s και AtGID1s είναι διαλυτοί υποδοχείς GA, οι οποίοι προσδένονται με υψηλή συγγένεια μόνο σε ενεργές GAs και όχι σε ανενεργά GA παράγωγα.

Η παρουσία GA επάγει ταχεία πρωτεόλυση της πρωτεΐνης καταστολέα DELLA με την ταυτόχρονη συμμετοχή του υποδοχέα GID1 και μιας F-box πρωτεΐνης: SLEEPY1(SLY1) στο *Arabidopsis* και GIBBERELLIN INSENSITIVEDWARF2 (GID2) στο ρύζι (Nakajima et al., 2006). Ο

GID1 συνδέεται με τα LEXLE και VHYNP μοτίβα εντός της συντηρημένης αμινο-τελικής περιοχής των DELLA πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός της δομής του GA-GID1-DELLA συμπλέγματος με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ επιβεβαιώνει τον παραπάνω ισχυρισμό. Συγκεκριμένα η κρυσταλλική δομή των GA-GID1-DELLA περιέχει την ενεργή GA (GA<sub>3</sub> ή GA<sub>4</sub>), τον AtGID1A και την DELLA περιοχή του AtDELLA GAI (Shimada et al., 2008). Οι δομικές αυτές μελέτες αποκαλύπτουν ότι ο GID1 περιέχει έναν καρβόξυ-τελικό κεντρικό πυρήνα, ο οποίος σχηματίζει έναν θύλακα σύνδεσης της GA αλλά και μια αμινο-τελική περιοχή επέκτασης (N-Ex), η οποία δρα ως ένα καπάκι για τον θύλακα (εικόνα 1.4). Χωρίς την δέσμευση GA στο θύλακα, η N-Ex περιοχή του GID1 παρουσιάζει μια ευέλικτη δομή που είναι ευάλωτη στην πρωτεόλυση. Η δέσμευση της GA στο καρβόξυ-τελικό κεντρικό πυρήνα του GID1, προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή του N-Ex ώστε να καλύψει σαν ένα «καπάκι» την GA η οποία έχει δεσμευτεί στον θύλακα. Επίσης, η δράση αυτή δημιουργεί μια υδρόφοβη και δεσμευτική προς τις DELLA πρωτεΐνες περιοχή. Αν και δεν υπάρχει άμεση επαφή μεταξύ DELLA και GA, η δέσμευση της DELLA σταθεροποιεί περαιτέρω το GA-GID1-DELLA σύμπλοκο. Η DELLA-GID1 αλληλεπίδραση οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές στο υπόλοιπο της πρωτεΐνης DELLA προκειμένου να ενισχυθεί η αναγνώριση της GRAS περιοχής της DELLA από την F-box πρωτεΐνη, με απώτερο σκοπό την πολυουβικιτινίωση της από το σύμπλοκο SCF<sup>SLY1/GID2</sup>. Συνεπώς παρουσία GA, η DELLA οδηγείται στο σύμπλοκο SCF<sup>SLY1/GID2</sup> λιγάζηση της ουβικιτίνης E3 για πολυ-ουβικουϊτινίωση και επακόλουθη αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα 26S(Dill et al.,2004).



**Εικόνα 3:** το σύμπλοκο GA – GID1 – DELLA. Κρυσταλλική δομή συμπλόκου που περιέχει την GA<sub>3</sub>, το AtGID1a και την DELLA περιοχή της πρωτεΐνης GAI. Μωβ: καρβόξυ-τελικός κεντρικός πυρήνας του GID1. Γαλάζιο: αμινο-τελική περιοχή επέκτασης (N-Ex) του GID1. Ροζ: περιοχή DELLA. Η δεσμευμένη GA<sub>3</sub> απεικονίζεται με πράσινο (άτομα άνθρακα) και κόκκινο (οξυγόνο) (πηγή: Tai-ping Sun, 2011)



**Εικόνα 4:** Ένα μοντέλο για την GA-εξαρτώμενη αλληλεπίδραση των GID1-DELLA και επακόλουθη σύνδεση του SCF<sup>SLY1</sup>. Η δέσμευση της GA επάγει διαμορφωτικές αλλαγές στην περιοχή N-Ex δημιουργώντας μια υδρόφοβη και δεσμευτική προς τις DELLA πρωτεΐνες περιοχή. Αυτό το σταθερό σύμπλοκο επιτρέπει την αποτελεσματική του αναγνώριση από το SCF<sup>SLY1</sup> και την μεταγενέστερη αποικοδόμηση της DELLA από το πρωτεάσωμα 26S (πηγή: Tai-ring Sun, 2011).

## **2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού

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

### 2.1.1 Ιστοκαλλιέργεια

- Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS (Murashige And Skoog Medium)
  1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS με την ανάλογη σύσταση.
  2. Αποστείρωση του υποστρώματος MS για 20min στους 120<sup>0</sup>C.
  3. Γέμισμα των τρυβλίων με 25ml θρεπτικού υποστρώματος μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminair flow), με τον οποίο επιτυγχάνονται ασηπτικές συνθήκες.
  4. Αφήνονται να στερεοποιηθούν.
  5. Τα τρυβλία μπορεί να φυλαχθούν για περίπου 2 εβδομάδες στους 4<sup>0</sup>C.
  
- Καλλιέργεια σποροφύτων *Arabidopsis thaliana*
  1. Η εκβλάστηση των σπερμάτων προϋποθέτει την επιτυχημένη έξοδό τους από την κατάσταση ληθάργου. Για να συμβεί αυτό, τα σπέρματα τοποθετούνται σε dH<sub>2</sub>O για 24h στους 4<sup>0</sup>C.
  2. Απολύμανση των σπερμάτων με 70% αιθανόλη για 30sec, απομάκρυνση της αιθανόλης και προθήκη διαλύματος χλωρίνης 30% για 1min περίπου ανάλογα με την ποσότητα των σπερμάτων. Απομάκρυνση του διαλύματος της χλωρίνης και ξέπλυμα των σπερμάτων 5 φορές με ddH<sub>2</sub>O από 1min τη φορά. Οι συγκεκριμένοι χειρισμοί πραγματοποιούνται με τη βοήθεια πιπέτας Paster. Η όλη διαδικασία γίνεται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.
  3. Επίστρωση των σπερμάτων στην επιφάνεια υποστρώματος, σε στρογγυλά τρυβλία Petri που περιέχουν θρεπτικό μέσο MS με τη βοήθεια πιπέτας Gilson.
  4. Τα τρυβλία αφήνονται ανοιχτά να στεγνώσουν για 30min περίπου.

5. Σφραγίζονται με ταινία parafilm και μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών.
6. 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.

➤ Ανάπτυξη των φυτών *Nicotiana benthamiana*

Για την ανάπτυξη των φυτών καπνού ακολουθείται αντίστοιχη διαδικασία με αυτή για το φυτό *Arabidopsis thaliana*, όσον αφορά την απολύμανση και την επίστρωση των σπορίων σε τριβλία Petri. Τα φυτά του καπνού αναπτύσσονται θάλαμο ανάπτυξης όπου επικρατούν συνθήκες μακράς ημέρας (φωτοπερίοδος 16hrs φως/ 8hrs σκοτάδι, θερμοκρασία 22°C και υγρασία 40%).

### **2.1.2 Τύποι φυτών *Arabidopsis thaliana* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.**

- i. Φυτά οικότυπου Columbia (Col-0) ή αλλιώς αγρίου τύπου.
- ii. Φυτά RAC αποσιωπημένες σειρές, RACRNAi line 10H, 26, 9.84.

(Μαργαριτοπούλου Θεώνη, διπλωματική εργασία 2007)

## **2.2 Βακτηριακά στελέχη**

### **2.2.1 *Escherichia coli***

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

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

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους (DH5a) αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο LB για 12hrs στους 37°C.
- Μεταφορά 2ml από την αρχική καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB (αναλογία 1:1).
- Επώαση των κωνικών φιαλών στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει  $O.D._{550} = 0.5$ .
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας σε πάγο.
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε πλαστικό μπουκάλι και φυγοκέντρηση για 5min στις 5000rpm/min στους 4°C (πλήρης ισοζύγηση απαραίτητη). Κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου 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 υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο  $CaCl_2$  75mM. Προσθήκη ίσου όγκου με το 1/15 του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας.
- Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v. Απαιτείται πολύ καλή μίξη.
- Το δείγμα μοιράζεται σε φιαλίδια erpendorf και καταψύχεται αμέσως με την βοήθεια υγρού αζώτου.
- Αποθήκευση και διατήρηση των 'δεκτικών' βακτηριακών κυττάρων στους -80°C.

#### **2.2.1.β Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA**

- 200μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a προστίθενται σε 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30min
- Ακολουθεί θερμικό σοκ του δείγματος για 1-2 min στους 42°C.
- Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB ενώ το δείγμα βρίσκεται στους 42 °C και επώαση στη συνέχεια στους 37°C για 1hr.
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 13000r/ min για 1min και απομάκρυνση των 2/3 του υπερκειμένου.



- Επαναδιάλυση του ιζήματος και επιστροφή κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής που διαφέρει κατά περίπτωση.
- Επώαση των τρυβλίων για 12-16 hrs σε θάλαμο στους 37 °C.

### 2.2.1.γ Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασηματισμού (Transform efficiency)

- Το τρυβλίο χωρίζεται σε τεταρτημόρια και μετρούνται οι αποικίες σε ένα από αυτά. Έστω ότι έχουμε n αποικίες.
- Στο τρυβλίο θα έχουμε:  $4 \times n = 4n$  αποικίες.
- Έχουμε περίπου 10ng plasmid DNA. Οπότε:

Στα 10ng έχουμε 4n αποικίες

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

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

Στα γ μl που επιστρώθηκαν έχουμε 400n αποικίες

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

Ικανοποιητικό εύρος αποδοτικότητας:

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

### 2.2.2 Agrobacterium tumefaciens

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram- αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους, ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και προκαλεί στα φυτά την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου. Η παθογενετικότητά του αποδίδεται στην ύπαρξη του Ti- πλασμιδίου (200-250Kb). Μέσω του Ti πλασμιδίου είναι δυνατή η μεταφορά εξωγενών γονιδίων (ή DNA γενικότερα) μέσα στα φυτά μετά τη μόλυνσή τους με το βακτήριο.

### **2.2.2.α Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* για μετασηματισμό**

- Ανάπτυξη ενός στελέχους *Agrobacterium tumefaciens* σε 5ml θρεπτικό μέσο LB συν κατάλληλο αντιβιοτικό ολονύχτια στους 28°C.
- Προσθήκη 4ml από την ολονύχτια καλλιέργεια σε 100ml θρεπτικό μέσο LB σε κωνική φιάλη των 500ml και ζωηρή ανάδευση στους 28°C (+shaker) μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει την τιμή  $OD_{600}=0.5$  έως 1.0 (η τιμή 0.6 λειτουργεί καλύτερα).
- Κρύωμα της καλλιέργειας στον πάγο. Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος στις 3000r/min για 5min στους 4°C.
- Αποβολή του υπερκείμενου διαλύματος. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 2ml διαλύματος 20mM  $CaCl_2$ . Διανομή 0.1ml ποσοτήτων σε προκρυωμένα φιαλίδια erpendorf.
- Αποθήκευση και διατήρηση των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων στους -80°C.

### **2.2.2.β Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο freeze – thaw**

- Προσθήκη περίπου 1μg πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα.
- Πάγωμα των κυττάρων σε υγρό άζωτο <sup>(1)</sup>.
- Ξεπάγωμα των κυττάρων με επώαση του φιαλιδίου erpendorf σε υδατόλουτρο των 37°C για 5min.
- Προσθήκη 1ml LB θρεπτικού μέσου στο φιαλίδιο erpendorf και επώαση στους 28°C για 2-4hrs με απαλή ανάδευση. Αυτή η περίοδος επιτρέπει τα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο αντιβιοτικής αντοχής.
- Φυγοκέντρηση των φιαλιδίων για 30sec. Αποβολή του υπερκείμενου διαλύματος και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 0.1ml LB θρεπτικό μέσο.
- Για την επιλογή τόσο του πλασμιδίου Ti, όσο και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα τα μετασηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τριβλίο LB/agar που περιέχει τα αντιβιοτικά <sup>(2)</sup> Ριφαμπικίνη (Rifampicin), Τζενταμυκίνη (Gendamycin sulphate) και Καναμυκίνη (Kanamycin) με τελικές συγκεντρώσεις 50μg/ml, 25μg/ml και 50μg/ml, αντίστοιχα.
- Επώαση στους 28°C.

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

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

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

Μονή αποικία του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιείται για εμβολιασμό κατάλληλου θρεπτικού μέσου που περιέχει κάποιο αντιβιοτικό στο οποίο είναι ανθεκτικό το στέλεχος, με σκοπό την αποφυγή ενδεχομένων μολύνσεων.

Επώαση στους 37°C με συνεχή ανάδευση για 12-16hrs.

- Μεταφορά 800μl από την παραπάνω καλλιέργεια σε φιαλίδιο errendorf και προσθήκη 400μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%.
- Έντονη ανάμιξη και ψύξη του φιαλιδίου σε υγρό άζωτο.
- Αποθήκευση στους -80°C

## **2.3 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA**

### **2.3.1 Αλκαλική λύση**

1.5ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας που αναπτύχθηκε ολονύχτια μεταφέρεται σε φιαλίδιο errendorf και φυγοκεντρείται για 1min στις 13000r/min.

- Απομάκρυνση υπερκειμένου ώστε το ίζημα να μείνει όσο πιο στεγνό γίνεται.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος P1 και επαναδιάλυση του ιζήματος με πιπέτα.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος P2, ανάδευση ελαφρά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- Προσθήκη 200μl παγωμένου διαλύματος 3M CH<sub>3</sub>COOK/5M CH<sub>3</sub>COOH (P3) και καλή ανάμιξη μέχρι να εμφανιστούν λευκά κομμάτια.
- Επώαση στους -20°C για 15min.
- Φυγοκέντρηση για 20min στους 4°C στις 13000r/min.
- Προσεκτική μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο errendorf.
- Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης αιθανόλης 100% και καλή ανάμιξη.
- Επώαση για 30min σε RT.
- Φυγοκέντρηση στις 13000r/min για 15min.
- Απομάκρυνση της αιθανόλης.
- Προσθήκη 30μl ddH<sub>2</sub>O και επαναδιάλυση του ιζήματος.

- Αποθήκευση και διατήρηση στους -20°C.

## 2.4 Πέψη Νουκλεϊνικών Οξέων με Ενδονουκλεάσες Περιορισμού

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

- Πρώτον, πρέπει να υπάρχει ένα υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να είναι πλασμιδιακό DNA, γενωματικό DNA ή DNA φάγου και να περιέχει τουλάχιστον μια αλληλουχία έξι βάσεων, η οποία να αναγνωρίζεται από το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού. Επίσης, και η καθαρότητα του υποστρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στο βαθμό που θα προχωρήσει η αντίδραση αφού πολλές φορές κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA μπορεί να μεταφέρονται παράγοντες που να δρουν περιοριστικά για τη δράση των ενζύμων.
- Δεύτερον, η ποσότητα και η ποιότητα του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου (buffer) παίζουν ρόλο. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρέχονται κυρίως έτοιμα με το ένζυμο περιορισμού από την εταιρεία προέλευσης και η ποσότητα που χρησιμοποιείται είναι το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης από 10x buffer.
- Τρίτον, η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται παίζει σημαντικό ρόλο. Περιοριστικό ρόλο στην ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται αποτελεί η συγκέντρωση της γλυκερόλης που περιέχεται στο διάλυμα συντήρησης του ενζύμου η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% στον τελικό όγκο της αντίδρασης. Ο όγκος της αντίδρασης όπου λαμβάνει χώρα η πέψη κυμαίνεται μεταξύ 30-50μl.
- Σε φιαλίδιο erpendorf προσθέτουμε:
  1. 10x ρυθμιστικό διάλυμα: 10% του τελικού όγκου
  2. Δείγμα DNA: μέχρι 80% του τελικού όγκου
  3. Ένζυμο περιορισμού: μέχρι 10% του τελικού όγκου
  4. ddH<sub>2</sub>O: μέχρι το 100% του τελικού όγκου
- Στη συνέχεια αναμιγνύουμε το δείγμα και επωάζουμε σε κατάλληλη θερμοκρασία για 1-2hrs. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού. Η

πλειονότητα όμως λειτουργεί άριστα στους 37°C. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη φαίνονται στον πίνακα 1.

ΟΝΟΜΑ ΕΝΖΥΜΟΥ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ
<b>EcoR I</b>	5' ...G ▼ AATTC...3' 3' ...CTTAA ▲ G...5'
<b>Sal1</b>	5' ...G ▼ TCGAC...3' 3' ...CAGCT ▲ G...5'
<b>BamH1</b>	5' ...G ▼ GATCC...3' 3' ...CCTAG ▲ G...5'

**Πίνακας 1:** Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Τα βέλη στις αλληλουχίες δείχνουν το σημείο τομής.

## 2.5 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.

1. Σε διάλυμα 1X TAE προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης.
2. Θερμαίνουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα καταστεί διαφανές.
3. Προσθέτουμε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
4. Τοποθετούμε την πηκτή σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνουμε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα χρωστικής 5x dye.
6. Μετά την πήξη απομακρύνουμε τη χτένα και προσθέτουμε κατάλληλο όγκο 1X TAE,

που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

7. Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής που δημιουργήθηκαν από τη χτένα.

8.

υνδέουμε 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.

Σ

## 2.6 Απομόνωση και Καθαρισμός Κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

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

## 2.7 Ενωποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα

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

### 2.7.1 Διαδικασία A-tailing

Στις περιπτώσεις όπου τα τμήματα τα οποία πρόκειται να ενοποιηθούν δεν παρουσιάζουν κολλώδη άκρα (5' ή 3'), έχουν δηλαδή τυφλά άκρα, εφαρμόζεται μια διαδικασία στόχος της οποίας είναι η δημιουργία τμημάτων με προεξέχοντα μόρια αδενινών στο 3' άκρο. Αυτό επιτυγχάνεται με μια αντίδραση στην οποία χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως η EXT (FINZYMES) ή και η Taq (INVITROGEN) DNA πολυμεράσες, οι οποίες

έχουν τη δυνατότητα να προσθέτουν μόρια αδενινών στο 3' άκρο. Έτσι, καθίσταται δυνατή η ενοποίηση των υπό κλωνοποίηση τμημάτων με φορείς οι οποίοι φέρουν προεξέχοντες θυμίνες στο 3' άκρο τους, όπως είναι ο φορέας PGEM-T easy.

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται:

- Κατάλληλη ποσότητα DNA
  - Κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 10x, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1x
1. Επώαση στους 95 °C για 12 min  
και προσθήκη
    - 0,5μl Taq DNA πολυμεράση
    - dATPs σε τελική συγκέντρωση 0.2mM
    - ddH2O μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης
  2. Επώαση της αντίδρασης στους 70°C για 15-30min

### 2.7.2 Αντίδραση Ενωποίησης

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας PGEM-Teasy. Η κάθε αντίδραση ενοποίησης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl ή 20μl. Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται:

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

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

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

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

- 1μl T4 DNA λιγάσης
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του όγκου της αντίδρασης
- το δείγμα αναμιγνύεται και τοποθετείται για 12hrs στους 8°C

## 2.8 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο πλασμιδιακοί φορείς, ο rSPYNE και ο rSPYCE, σε κάθε έναν από τους οποίους είναι κλωνοποιημένη η αμινο-υπομονάδα και η καρβοξυ-υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να ελεγχθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση κλωνοποιούνται η κάθε μια σε διαφορετικό φορέα σε μεταφραστική σύντηξη με την αντίστοιχη υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης. Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών οι δύο υπομονάδες της GFP πρωτεΐνης έρχονται κοντά παράγοντας φθορισμό. Αναλυτικότερα:

- Χρησιμοποιείται στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, μετασχηματισμένο με πλασμιδιακό φορέα. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται με ηλεκτροπόρωση ή με τη μέθοδο freeze-thaw.
- Μετά τον μετασχηματισμό, τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, με τριπλή επιλογή (ριφαμπικίνη Rif, τζενταμικίνη Gen και καναμικίνη Kan). Τα αγροβακτήρια αναπτύσσονται στους 28°C και η ανάπτυξή τους διαρκεί έως και τρεις ημέρες.
- Επιλογή μονής αποικίας και καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (5ml), με τριπλή επιλογή (ριφαμπικίνη Rif- προαιρετικό, τζενταμικίνη Gen και καναμικίνη Kan). Ανάπτυξη για 1-2 ημέρες, έως ότου θολώσει καλά.
- Μεταφορά 1,5 ml της καλλιέργειας σε φιαλίδιο erpendorf και φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 15min.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο dilution buffer. Χρειάζεται πολλή προσοχή διότι το βακτηριακό ίζημα μπορεί εύκολα να αποκολληθεί και να χαθεί σημαντικός αριθμός βακτηρίων.
- Παράλληλα φωτομετρούνται τα βακτηριακά διαλύματα και αραιώνονται, έτσι ώστε να έχουν τελικά την επιθυμητή οπτική πυκνότητα. (για το p19: 1, για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες:0,7).
- Ακολουθεί επώαση για 3 hrs σε θερμοκρασία δωματίου.
- Εμβολιάζεται η αποαξονική επιφάνεια των φύλλων καπνού.



- Παρατήρηση της επιδερμίδας των φύλλων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου OLYMPOUS U-CMAD3 μετά το πέρας 72h. Το μικροσκόπιο φέρει φωτογραφικό φακό τύπου OLYMPOUS DX50.

## 2.9 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς

- Φρέσκο φυτικό υλικό (ολόκληρα φυτά *Arabidopsis* ή διάφορα όργανά του) ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου με κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης.
- Το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf των 1,5ml όπου προστίθεται ίση ποσότητα φαινόλης και RNA Extraction Buffer ( για κάθε 0,1 gr φυτικού ιστού προστίθενται 150 μl φαινόλης και 150 μl RNA Extraction Buffer)
- Έντονη ανάμιξη του δείγματος και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 10min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 5min .
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο erpendorf χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 5min.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο erpendorf χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 5min.
- Κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων με προσθήκη στο υπερκείμενο 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.8 και 2.5 όγκους παγωμένης αιθανόλης 100%
- Κατακρήμνιση στους -20°C για 12 ώρες
- Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13.000rpm για 20min.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και στη συνέχεια διαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστερωμένου ddH<sub>2</sub>O
- Αποθήκευση στους -80°C.

## 2.10 Καθαρισμός και ποσοτικοποίηση RNA

### 2.10α Καθαρισμός RNA από υπολείμματα DNA με το ένζυμο RQ1 DNase

- Σε φιαλίδιο erpendorf των 1,5ml προστίθενται:
- 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x αρχική συγκέντρωση
- 4 μl DNase
- 40 μl RNA
- 46 μl ddH<sub>2</sub>O
- Ανάμιξη και τοποθέτηση του erpendorf στους 37°C για 1h
- Με το πέρας των 60min προστίθενται αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 500μl
- Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1). (1:1)
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13.000rpm) για 10 min.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13000rpm) για 5min
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής (25:24:1).
- Έντονη μίξη και φυγοκέντρηση (13000rpm) για 5min
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο.
- Κατακρήμνιση των νουκλεϊνικών οξέων με προσθήκη 1/10 του όγκου 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.8 (30μl) και 2.5 όγκους παγωμένης αιθανόλης 100%
- Κατακρήμνιση στους -20°C για 12 ώρες.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 13.000rpm για 20min.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O
- Αποθήκευση στους -80°C.

### 2.10β Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων ( και συγκεκριμένα του RNA) πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (**O.D.**) των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται μετρήσεις στα 260 nm και

280nm. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260 nm. Στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες λόγω της παρουσίας αρωματικών αμινοξέων.

- Ο λόγος  $O.D_{260}/O.D_{280}$  δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος. Σε καθαρά δείγματα DNA και RNA ο ιδανικός λόγος έχει τιμή 1.8 και 2.0, αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε νουκλεϊνικά οξέα προκύπτει από τον νόμο των Beer – Lambert :

$$C_{(\mu\text{g}/\mu\text{l})} = \alpha \times \text{συντελεστής αραιώσης} \times O.D_{260}$$

όπου α ορίζεται η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων για O.D ίσο με 1 και συγκεκριμένα α= 50 μg/ml για δείγμα DNA και α= 40 μg/ml για δείγμα RNA.

### 2.11α Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

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

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα PCR<sup>(1)</sup></b>	10x / 5x	5μl /10μl	1x
<b>dNTPs</b>	10mM από καθένα	1μl	200μM
<b>Άνω εκκινητής</b>	10-20μM	2μl	300nM
<b>Κάτω εκκινητής</b>	10-20μM	2μl	300nM
<b>μήτρα</b>	-	1.5μl	-
<b>DNA πολυμεράση: DreamTaq/Phusion</b>	5 /2 units/μl	0.25 /0.45 μl	1,25/0.02 units
<b>dH2O</b>	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl		

<sup>(1)</sup> Το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να περιέχει  $MgCl_2$  (συνήθως σε συγκέντρωση 15mM) ή όχι, οπότε παρέχεται ξεχωριστά ως πυκνό διάλυμα. Η συνηθής συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{+2}$  στο τελικό μείγμα της αντίδρασης είναι 1.5mM. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση 1.5μl διαλύματος  $MgCl_2$  50 mM ( τελική συγκέντρωση 1.5mM).

Κάθε ένα από τα αντιδραστήρια προστίθεται σε φιαλίδιο χωρητικότητας 0.5ml, κατάλληλο για αντιδράσεις PCR, που είναι τοποθετημένο στον πάγο. Ακολουθεί αναμειξη και φυγοκεντρηση για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν τα αντιδραστήρια στον πατο του φιαλιδίου. Τέλος το φιαλίδιο τοποθετείται 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 σε αντιδράσεις PCR.

➤ Οι θερμοκύκλοι επιλέχθηκαν με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται παρακάτω.

<b>1x</b>	1. Αποδιάταξη της μήτρας για 2min στους 94 <sup>0</sup> C
<b>25-40x</b>	2. Αποδιάταξη στους 94 <sup>0</sup> C για 30sec 3. Υβριδισμός εκκινητών σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το Tm των εκκινητών για 30-40sec <sup>(1)</sup> 4. Σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA συνήθως στους 70 -75 <sup>0</sup> C για χρόνο που ποικίλει <sup>(2)</sup>
<b>1x</b>	5. Τελική επιμήκυνση του προϊόντος για 7-10min στη θερμοκρασία επιμήκυνσης του κάθε ενζύμου

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

<sup>(1)</sup>: Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το στάδιο του υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης Tm. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού έχει μια απόκλιση 5<sup>0</sup>C από την θερμοκρασία τήξης.

Η Tm υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Tm = 81.5 + 16.6 * \log_{10} [K^+] + 0,41 * (\% G + C) - 675 / \text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$$

<sup>(2)</sup>: Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της χρησιμοποιούμενης θερμοανεκτικής DNA πολυμεράσης. Η χρονική διάρκεια του σταδίου εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης και τις προδιαγραφές του ενζύμου.

Όταν τελειώσουν οι αντιδράσεις PCR, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 0.8-1.2% ανάλογα με το αναμενόμενο μήκος των αποτελεσμάτων. Η αποθήκευση των αντιδράσεων PCR γίνεται στους -20<sup>0</sup>C.

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

18s-F	5'-TTG ATT CTA TGG GTG GTG GT -3'
18s-R	5'-CCT TGT TAC GAC TTC TCC TT -3'
HSP-F	5'-AAA GAA TTC ATG GAG GCG TTG G-3'
HSP-R	5'-CAA GCT GTC CTT CAA CTG AGA AAT GC-3'
sGAIF BamHI	5'-CCTCGGATCCATGAAGAGAGATCATCATCATC-3'
GAIR Sal1	5'-ATTTGTGCGACATTGGTGGAGAGTTTCCACGC-3
GAIR	5'-CGTTTGAGCATTTC AACCGCTTGTGTGAGTATACG-3
GID1A F BamHI	5'-AAAAGGATCCGAATGGCTGCGAGCG-3'
GID1A R SALI	5'-AAAAGTCGACACATTCCGCGTTTACAAACG-3'
GID1B F SmaI	5'-AAAACCCGGGGATGGCTGGTGGTAACG-3'
GID1B R BamHI	5'-TTGAGGATCCAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTGAC-3'
PIN1-F	5'- ACAAAGATGATTACGGCGG-3'
PIN1-R	5'- GACCATAACTCTCTCTCTCTCG-3'
GA3ox1-F	5'-AAGAGCAAGATGCCTGCTATG-3'
GA3ox1-R	5'-ACGATATCGCAGTAGTT5GAGG-3'
GA20ox2-F	5'-CTCCATGCCAAACACCAGATC-3'
GA20ox2-R	5'-TTCACCATGAGAACAAAGGAC-3'
GA20x2-F	5'-CAGATAATCTCAGTGCTAAGATC-3'
GA20x2-R	5'-AAGCTAATCCAAACACTATCC-3'

### 2.11.β RT-PCR

Στην RT-PCR ολικό RNA ελεύθερο από DNA μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA ώστε να προκύψει η κατάλληλη DNA μήτρα για την πραγματοποίηση PCR αντιδράσεων . Η διαδικασία περιλαμβάνει δυο στάδια:

Αρχικά 1.5 μg ολικού RNA ελεύθερο από DNA και ο εκκινητής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης αποδιατάσσονται στους 65<sup>0</sup>C για 5min. Πιο συγκεκριμένα σε φιαλίδιο χωρητικότητας 0.5ml, κατάλληλο για αντιδράσεις PCR, που είναι τοποθετημένο στον πάγο προστίθενται τα ακόλουθα:

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

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

Συστατικά 2 <sup>ου</sup> Σταδίου	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης	4 μl	1 x
100 mM DTT	2 μl	10 mM
Αναστολέα RNάσης 30 units/ μl (Promega)	1 μl	30 units
SuperScript <sup>TM</sup> II Ανάστροφη Μεταγραφάση 200 units/ μl (Invitrogen)	1 μl	200 units
<b>Όγκος δεύτερου βήματος 8μl</b>		
<b>Τελικός όγκος αντίδρασης όγκος πρώτου και δευτέρου βήματος 20 μl</b>		

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 42<sup>o</sup>C για 1h ενώ ακολουθούν 15min στους 70<sup>o</sup>C.

Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση ακολουθεί αραιώση του cDNA στα 60μl (προσθήκη 40μl ddH<sub>2</sub>O) και διατήρηση αυτού στους 4<sup>o</sup>C. Από τον συνολικό όγκο των 60μl χρησιμοποιήθηκε για κάθε PCR αντίδραση σε κάθε δείγμα 1.5μl.

## **2.12 Μικροσκοπική παρατήρηση βλαστού και υποκοτυλίου σε φυτά *Arabidopsis thaliana***

### **2.12.1 Συλλογή ιστού**

#### **2.12.1.α Βλαστός**

- Κάθε βλαστός αποκόπτεται από τη βάση του φυτού, ακινητοποιείται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια λαβίδα και με τη βοήθεια λεπίδας τύπου “astor” απομονώνονται τα προς εξέταση μεσογονάτια διαστήματα.
- Κάθε μεσογονάτιο μεταφέρονται (ξεχωριστά) σε ειδικά τρυβλία με πολλές θέσεις μέσα σε διάλυμα FAA.
- Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 4°C για τουλάχιστον 24h.

#### **2.12.1.β Υποκοτύλιο**

- Από κάθε φυτό αποκόπτεται το υπέργειο μέρος και το ριζικό σύστημα. Το κάθε υποκοτύλιο μεταφέρεται σε ειδικά τρυβλία ( που διαθέτουν διαχωριστικά) μέσα σε διάλυμα FAA.
- Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 4°C για τουλάχιστον 24h.

### **2.12.2 Προετοιμασία του παρασκευάσματος προς παρατήρηση**

- Μεταφορά του ιστού (υποκοτυλίου ή βλαστού) σε αντικειμενοφόρο και προσθήκη σταγόνας νερού προς αποφυγή αφυδάτωσής του.
- Μεταφορά της αντικειμενοφόρου στο στερεοσκόπιο, ακινητοποίηση του ιστού με τη βοήθεια λαβίδας και πραγματοποίηση εγκάρσιων τομών με τη βοήθεια λεπίδας τύπου “astor”.
- Άμεση παρατήρηση του παρασκευάσματος σε μικροσκόπιο OLYMPUS U-CMAD3. (Το μικροσκόπιο φέρει ενσωματωμένο φωτογραφικό φακό τύπου OLYMPUS Bx50 με τον οποίο τραβήχτηκαν οι φωτογραφίες.)

## **2.13 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ**

### **Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης φυτών**

#### MS (Murashige and Skoog)

- Σουκρόζη : 1 g (1%)
- MES : 0,05 g (0,05%)
- MS : 0,44 g (MS : Murashige And Skoog Medium)
- KOH 1N
- Phytigel : 0,3 – 0,35 g (0,3-0,35%) ή Αγαρόζη : 0,7 – 1 g (0,7-1%)

### **Διαλύματα απομόνωσης και καθαρισμού νουκλεϊκών οξέων**

#### SEVAG

24 χλωροφορμιο: 1 ισοαμυλική αλκοόλη

### **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης**

#### TAE 50x

24.2gr (w/v) Tris-base, 100ml 0.5M EDTA pH8 (Ethylene- Diamine- Tetracetic Acid disodium salt), 57ml CH<sub>3</sub>COOH for 1lt of buffer

#### Ethidium Bromide (EtBr)

10mg/ml H<sub>2</sub>O. Αποθήκευση σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου

#### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για gel αγαρόζης

1x TAE, 0.5μg/ml EtBr

#### Διάλυμα χρωστικής για ηλεκτροφόρηση DNA

1x βασικού διαλύματος χρωστικών (10x) που περιέχει 1.25% (w/v) bromophenol blue και 1.25% (w/v) xylene cyanol σε dH<sub>2</sub>O, 50% σουκρόζη

#### GeneRuler™ DNA Ladder Mix Fermentas

### **Διαλύματα μετασηματισμού και καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων**

#### Θρεπτικό μέσο LB



0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) peptone. Για στερεό θρεπτικό μέσο προσθέτουμε και 1.4% bacteriological agar

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside).

200mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Κρατείται στους -20°C.

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (BRL)).

20mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο. Αποθηκεύεται στους -20°C.

Ampicillin

100mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C

Kanamycin

50mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C

Gentamicin sulphate

25mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C

Rifampicin

25mg/ml σε μεθανόλη. Φυλάσσεται στους -20°C

Bacteria transformation buffer (BTB) 25mM CaCl<sub>2</sub>

25mM CaCl<sub>2</sub> σε 10mM Tris-HCl pH8 (0.376gr CaCl<sub>2</sub> για διάλυμα 100ml)

### **Διαλύματα χειρισμού και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA**

P1 διάλυμα αλκαλικής λύσης

1ml P1: 20μl EDTA 0.5M, 50μl Tris-HCl pH8, 10μl RNase, 920μl dH<sub>2</sub>O

P2 διάλυμα αλκαλικής λύσης

1% SDS, 0.2N NaOH

P3 διάλυμα αλκαλικής λύσης

100ml P3: 60ml 3+5M CH<sub>3</sub>COOK, 11.5ml CH<sub>3</sub>COOH, 28.5ml dH<sub>2</sub>O

2x ligation buffer

30mM Tris-HCl pH7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 5% PEG

RNάση

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

#### NEBuffer 1

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

#### NEBuffer 3

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

#### NEBuffer 4

50mM Potassium acetate, 20mM Tris-HCl, 10mM Magnesium acetate, 1mM Dithiothreitol, pH7.9 at 25°C

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

#### Ρυθμιστικό διάλυμα 5x Superscript II Reverse Transcriptase

250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> (pH8.3 στους 20°C)

#### Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (DreamTaq Fermentas)

200mM Tris-HCl, 500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>

#### Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (Phusion)

200mM Tris-HCl, 500mM KCl, 7.5mM MgCl<sub>2</sub>

#### dNTPs

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

### **Διαλύματα μονιμοποίησης φυτικών ιστών**

#### FAA

Αιθανόλη 50%, Οξικό οξύ 5%, Φορμαλδεύδη 3,7%, dH<sub>2</sub>O 41,3%

### **Διαλύματα παροδικής έκφρασης σε φύλλα καπνού**

#### Dilution Buffer

10mM MES PH 5.6 , 10mM MgCl<sub>2</sub>

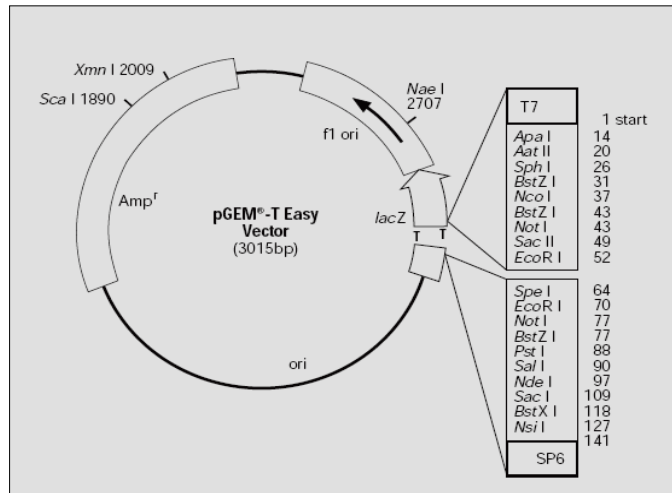
#### Induction buffer

10mM MES PH 5.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 150 μM ακετοσυριγγκόνη

## 2.14 Πλασμιδιακοί Φορείς

### 2.14.1 pGEM-T Easy vector

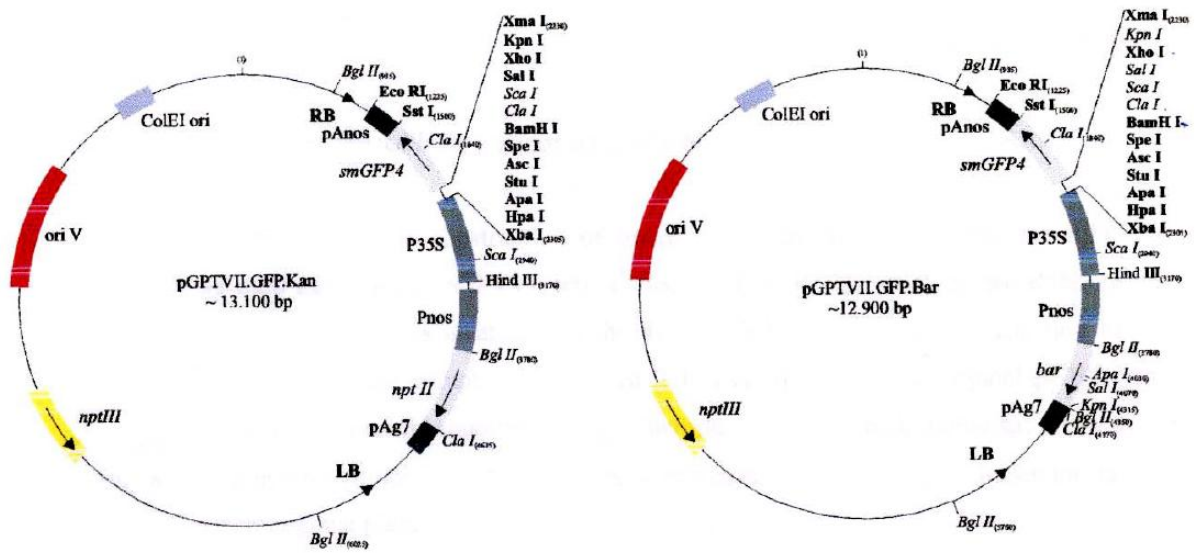
Είναι ένας μικρός (3.015bp), εύχρηστος φορέας για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, παρέχει τη δυνατότητα επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών και είναι υψηλής αντιγραφικότητας μέσα σε κύτταρα E.Coli. Η περιοχή κλωνοποίησης έχει ελεύθερες 3' θυμίνες και εμπεριέχεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το κλωνοποιούμενο τμήμα DNA εξαγεται εύκολα με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού.



Εικόνα 1. Χάρτης PGEM-T easy φορέα

### 2.14.2 SPYNE – SPYCE vectors

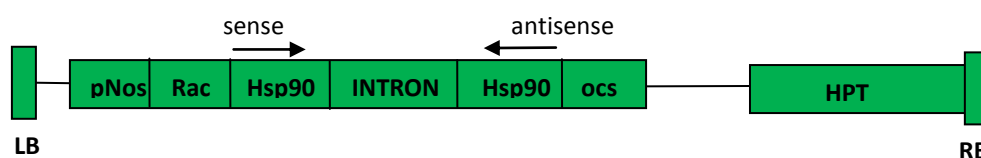
Είναι φορείς οι οποίοι δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της τεχνολογίας του BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) για την οπτικοποίηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα ζωικών και φυτικών οργανισμών. Οι φορείς αυτοί ονομάστηκαν ως pSPYNE and pSPYCE από (split YFP N-terminal/C-terminal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



Εικόνα 2. Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pSPYNE (pGPTVII.GFP.Kan) και pSPYCE (pGPTVII.GFP.Bar)

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

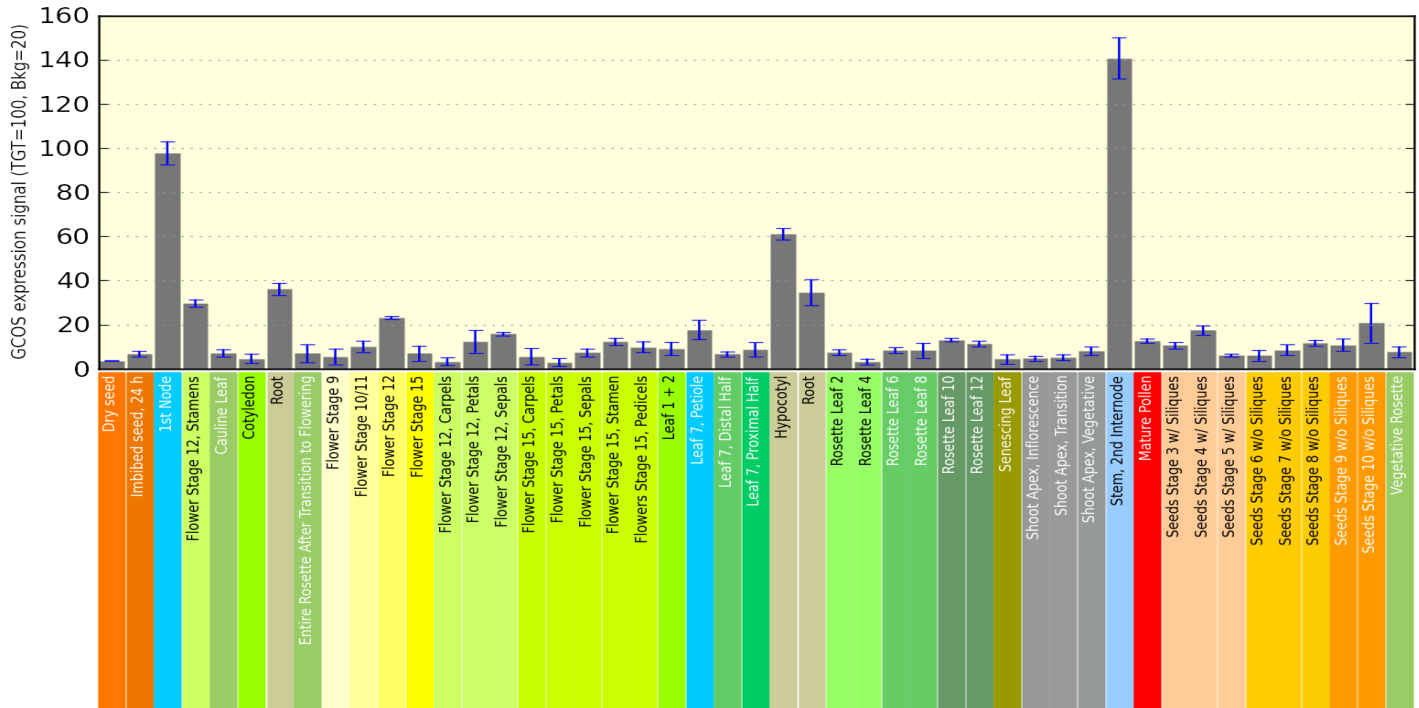
Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη του ενδεχόμενου ρόλου των HSP90 στο μονοπάτι ανάπτυξης και διαφοροποίησης του αγγειακού ιστού. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η στοχευμένη (χρονικά και αναπτυξιακά) απώλεια λειτουργίας όλων των κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων με τη στρατηγική της σίγησης του RNA (RNAi). Η περιοχή των HSP90 που περιέχεται στην κατασκευή αποσιώπησης αποτελεί περιοχή με τη μεγαλύτερη ομολογία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο μεταξύ των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *HSP90* μελών, και βρίσκεται σε κατεύθυνση νοήματος και αντινοήματος καθοδηγούμενη από τον ιστοειδικό προαγωγέα RAC (εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1:** Σχηματική αναπαράσταση της κασέτας έκφρασης *ihpRNA* για την αποσιώπηση των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων υπό τον έλεγχο του ιστοειδικού προαγωγέα RAC.

Το γονίδιο *RAC2/ROP7* ανήκει στην RHO οικογένεια των μικρών GTPασών (RHO, RAC και Cdc42). Οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες και ενεργοποιούνται όταν προσδένεται GTP και απενεργοποιούνται όταν το GTP υδρολύεται σε GDP. Τα μέλη της RHO οικογένειας έχουν χαρακτηριστεί ως βασικοί ρυθμιστές πολλών κυτταρικών διεργασιών. Έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού, στον έλεγχο της παραγωγής υπεροξειδίου ως αντίδραση άμυνας, στην επαγόμενη από στρες μεταγωγή σήματος καθώς και σε μηχανισμούς κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Αυτή η οικογένεια διαιρείται σε δύο υποοικογένειες (υποοικογένεια I και II), λόγω διαφορών σε επίπεδο ακολουθίας και της παρουσίας ενός επιπρόσθετου ιντρονίου στα μέλη της υποομάδας II. Το γονίδιο *AtRAC2/ROP7* (At5g45970) είναι αρχαίο μέλος της υποομάδας I της *AtRAC/ROP* οικογένειας γονιδίων και πιθανότατα έχει αναπτυχθεί από τότε που εμφανίστηκαν τα αγγειώδη φυτά (Winge et al, 2000, Christensen et al, 2003). Η έκφρασή του ανιχνεύεται στο **πρωτογενές ξύλωμα των ριζών, υποκοτυλίου, κοτυληδόνων, βλαστών και φύλλων** και έχει σχετιστεί με το σχηματισμό δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Brembu et al, 2005). Επιπλέον δεδομένα από το **Arabidopsis eFP Browser** (εικόνα 3.2) υποδεικνύουν χαμηλή έκφραση του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* καθ' όλη

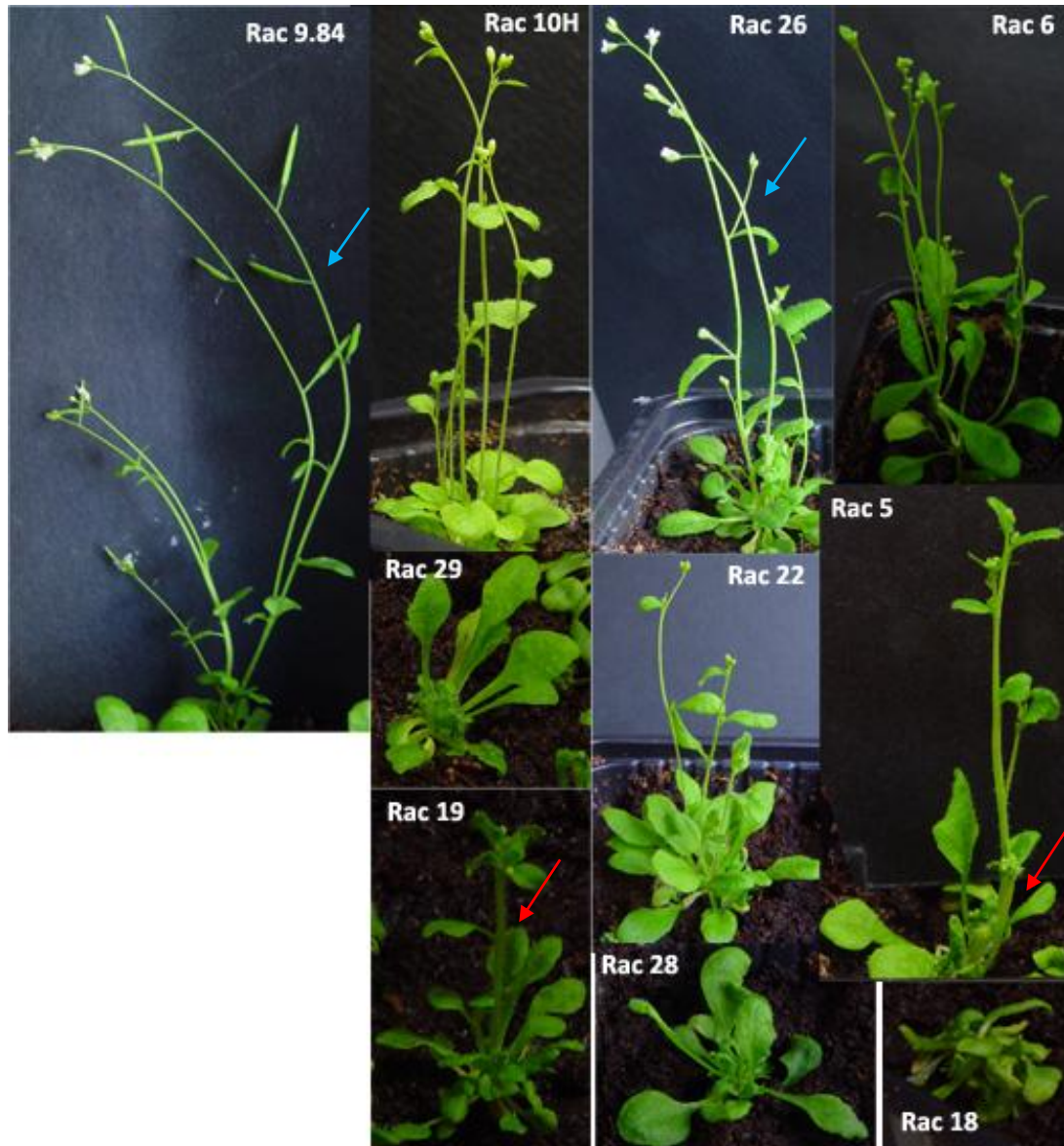
την ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis* ενώ τα μέγιστα της έκφρασης του παρουσιάζονται σε συγκεκριμένους ιστούς όπως το υποκοτύλιο, η ρίζα και το δεύτερο μεσογονάτιο του κεντρικού ανθοφόρου.



**Εικόνα 3.2:** Διάγραμμα της έκφρασης του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* σύμφωνα με δεδομένα του *Arabidopsis* eFP Browser

### 3.1 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των αποσιωπημένων σειρών *Rac2::Hsp90RNAi*

Από την στοχευμένη αποσιώπηση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων υπό τον έλεγχο του *AtRAC2/ROP7* προαγωγή προέκυψαν 33 αποσιωπημένες σειρές οι οποίες παρουσίασαν πλειοτροπικό φαινότυπο. Γενικότερα παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην ανάπτυξη, διακύμανση στο ύψος, αυξημένος αριθμός φύλλων ροζέτας, έκπτυξη πολυάριθμων πλάγιων καθώς και σιαμαίων βλαστών, ανώμαλο πρότυπο αγγειακού ιστού στις κοτύλες κα. Χαρακτηριστικοί φαινότυποι *RACRNAi* σειρών παρουσιάζονται στην εικόνα 3.3



**Εικόνα 3.3:** Αντιπροσωπευτικοί φαινότυποι φυτών διαφορετικών RACRNAi σειρών ηλικίας 32 ημερών. Θαμνώδη φυτά: Rac 18, Rac 28, Rac 29, πολυάριθμοι πλάγιοι βλαστοί – απουσία κεντρικού ανθοφόρου: Rac 6, Rac 10H, αυξημένος αριθμός φύλλων ροζέτας: Rac 22, σιαμαίοι βλαστοί: Rac 5, Rac 19(κόκκινο βέλος), αδυναμία στήριξης βλαστών: Rac 9.84, Rac 26 (μπλε βέλος)

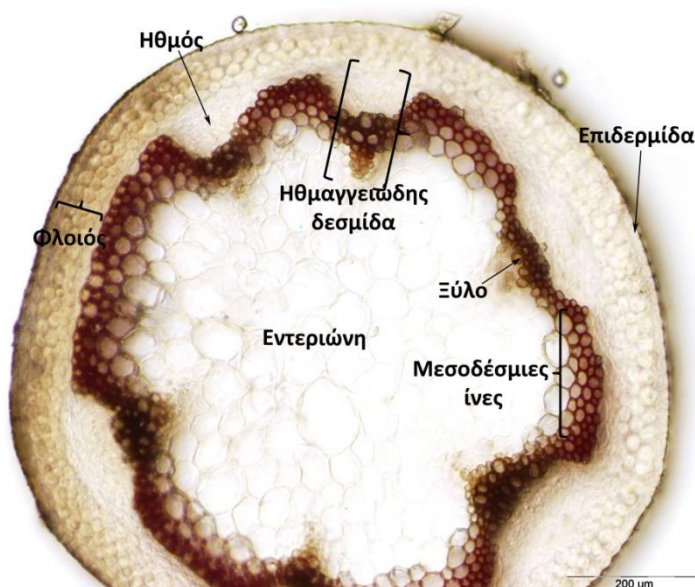
Η μέχρι τώρα φαινοτυπική παρατήρηση είχε επικεντρωθεί στη σειρά RACRNAi 10H, η οποία παρουσιάζει έναν αρκετά ενδιαφέροντα φαινότυπο. Τα φυτά της συγκεκριμένης σειράς εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται παραπάνω (απουσία κυριαρχίας κορυφής, αδυναμία στήριξης βλαστών, αυξημένο αριθμό φύλλων ροζέτας, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, φυτά που παραμένουν στο στάδιο της ροζέτας). Τα συγκεκριμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται σε διαφορετικά ποσοστά ανάμεσα στα φυτά της σειράς RACRNAi 10H με την πλειοψηφία (~ 40%) να αποτελείται από φυτά που εμφανίζουν έλλειψη κυριαρχίας κορυφής, πεπλατυσμένους βλαστούς οι οποίοι ξεκινούν ως ένας και καταλήγουν σε τρεις ή και τέσσερις και ύψος που κυμαίνεται από 6 έως 8 cm (Δημοπούλου Α., μεταπτυχιακή μελέτη). Στην RACRNAi 10H σειρά μελετήθηκε η



δομή που εμφανίζει ο αγωγός ιστός στους πλάγιους βλαστούς. Τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής παρατήρησης έδειξαν ότι το μετάλλαγμα 10H ακολουθεί το πρότυπο οργάνωσης του φυτού αγρίου τύπου όσον αφορά τη διεύθυνση των κυττάρων του αγγειακού ιστού, και συγκεκριμένα του ξυλώματος, αλλά παρουσιάζει αυξημένη εναπόθεση λιγνίνης, γεγονός που συνηγορεί με την αδυναμία στήριξης που εμφανίζουν οι πλάγιοι βλαστοί των φυτών της συγκεκριμένης σειράς (Ράμπου Α., πτυχιακή μελέτη).

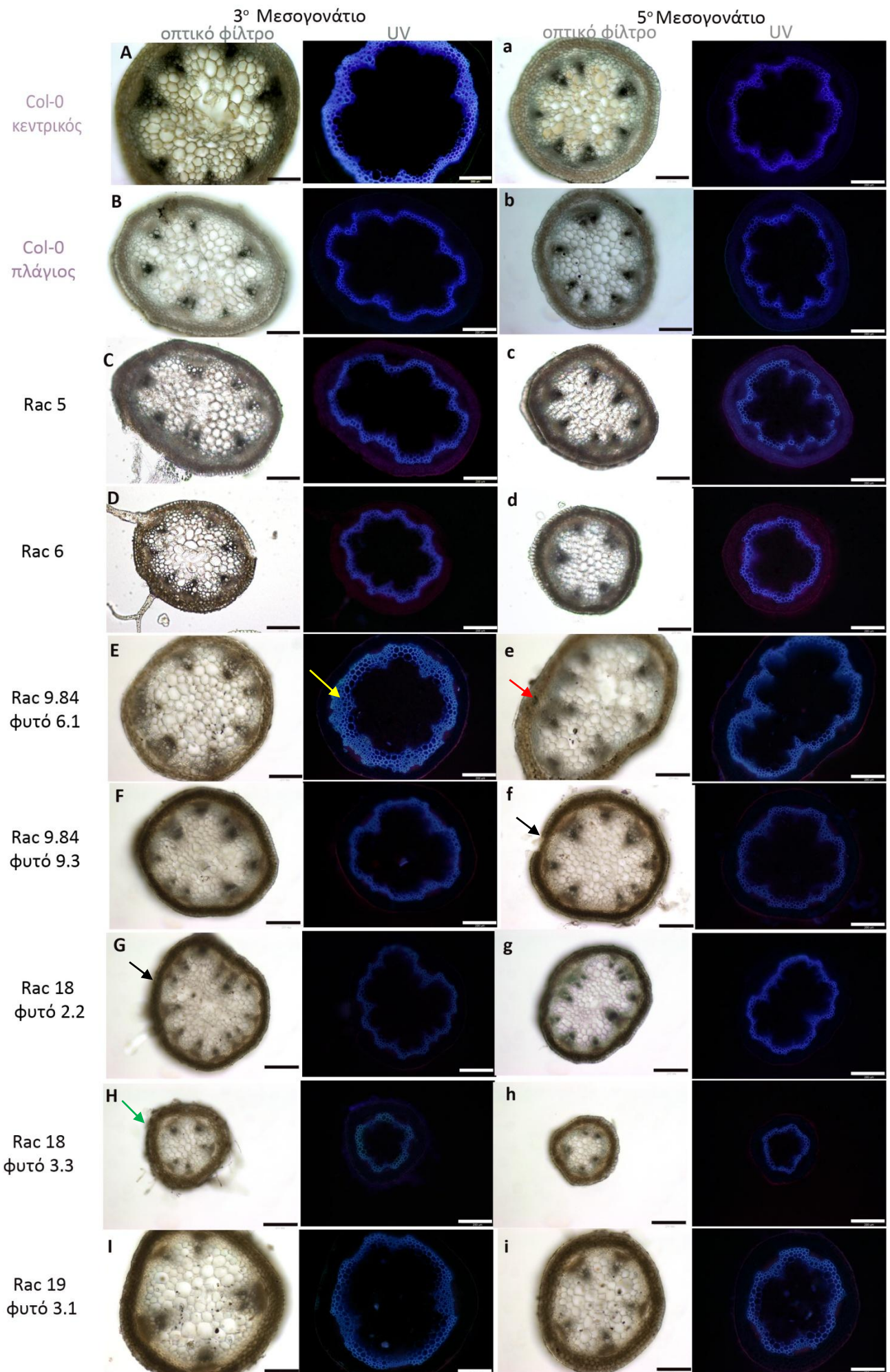
Στο πλαίσιο της επέκτασης της φαινοτυπικής παρατήρησης πραγματοποιήθηκε η μελέτη της δομής του αγωγού ιστού σε πλάγιους βλαστούς (σιαμαίους και μη) συνολικά δέκα αποσιωπημένων σειρών τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 3.5. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πλάγιοι βλαστοί ενήλικων φυτών που διέθεταν τουλάχιστον επτά μεσογονάτια (μη σιαμαίοι βλαστοί), πραγματοποιήθηκαν τομές με το χέρι κατά μήκος του τρίτου και του πέμπτου μεσογονατίου και ακολούθησε παρατήρηση των παρασκευασμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού.

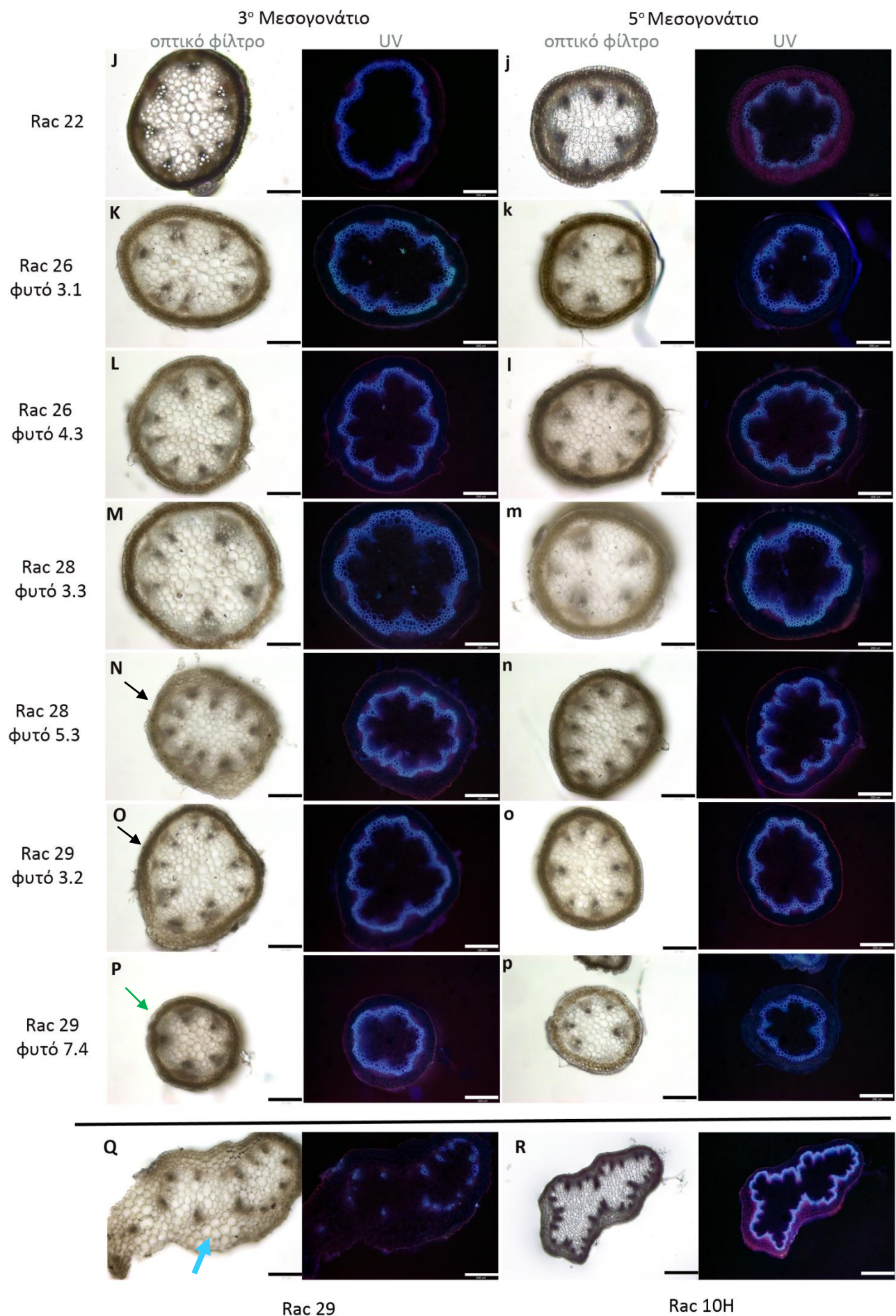
Σε ένα τυπικό βλαστό Col-0 (εικόνα 3.4) απαντώνται διακριτοί τύποι κυττάρων οργανωμένοι σε ένα ακτινωτό μοτίβο, ξεκινώντας με την επιδερμίδα στο εξωτερικό, ακολούθως τον φλοιό και στη συνέχεια τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, που συνιστούν τον αγγειακό ιστό του βλαστού, διατάσσονται σε ένα δακτύλιο. Στον δακτύλιο περιέχονται 5 έως 8 αγγειακές δεσμίδες, διευθετημένες σε περίπου ίση



απόσταση μεταξύ τους, χωριζόμενες μέσω λιγνητοποιημένων μεσοδέσμιων κυττάρων. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες αποτελούνται από κύτταρα ηθμού στο εξωτερικό, κύτταρα ξύλου στο εσωτερικό και κύτταρα καμβίου να παρεμβάλλονται μεταξύ τους. Στο κέντρο απαντώνται μεγάλα παρεγχυματικά κύτταρα της εντεριώνης.

**Εικόνα 3.4:** Εγκάρσια τομή κεντρικού ανθοφόρου βλαστού Col-0





Εικόνα 3.5: Εγκάρσιες τομές βλαστών φυτών *Col-0(A,B)* και *RacRNAi (C-R)* κατά μήκος του τρίτου (A-

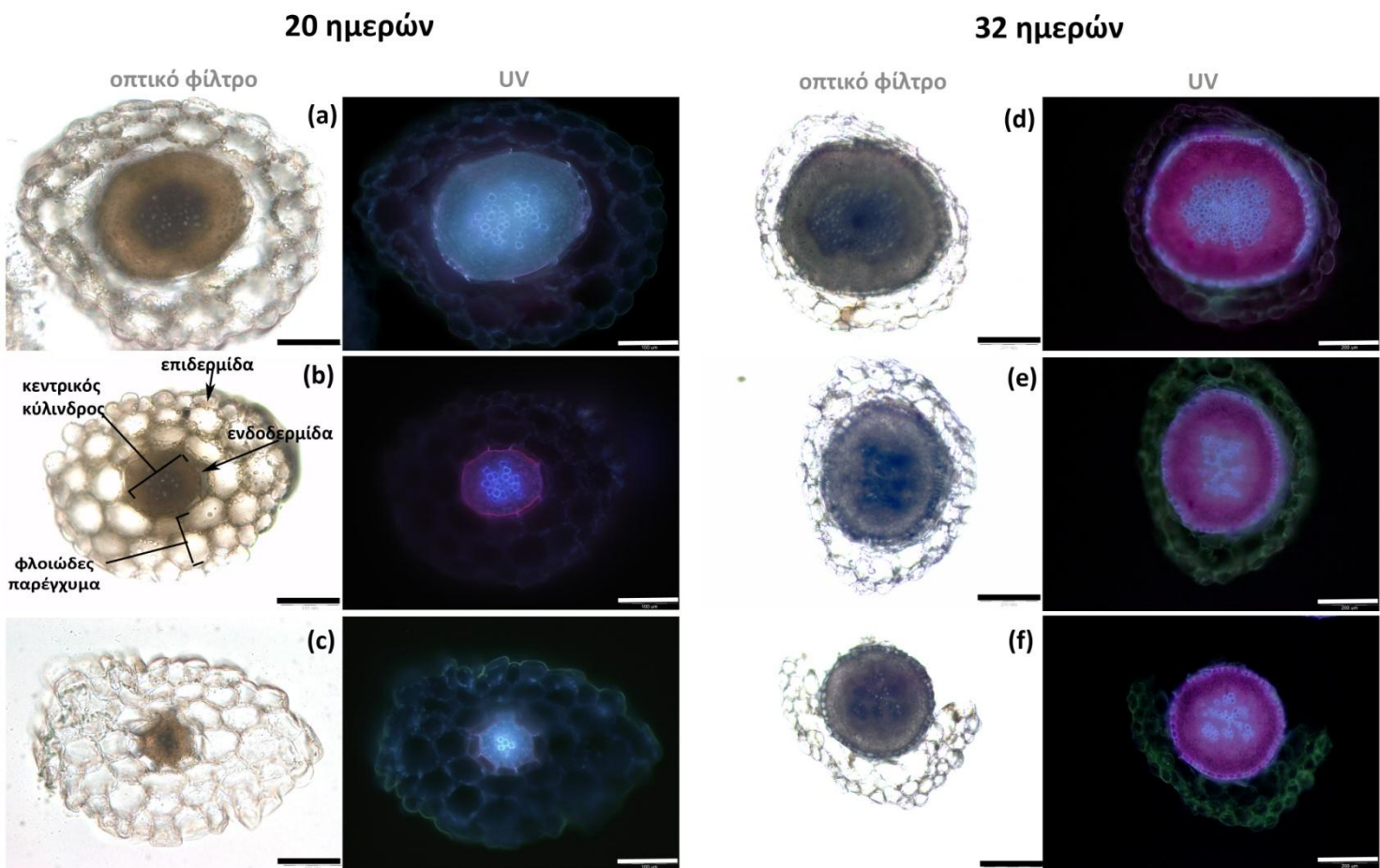
P) και του πέμπτου(a-p) μεσογονατίου διαστήματος. (Q, R): εγκάρσιες τομές σιαμαίων βλαστών RacRNAi φυτών. Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε σε οπτικό φίλτρο και σε υπεριώδες φως. Μαύρο βέλος: αυξημένος αριθμός ηθμαγγειωδών δεσμίδων, Πράσινο βέλος: μικρή διάμετρος βλαστού, Κόκκινο βέλος: παραμορφωμένο σχήμα αγγειακού δακτυλίου, Κίτρινο βέλος: αύξηση πάχους αγγειακού δακτυλίου Κλίμακα:( A-Q) 200 μm, (R) 500 μm

Επειδή τα φυτά RacRNAi στην πλειοψηφία τους χαρακτηρίζονται από έλλειψη κυριαρχίας κορυφής χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι βλαστών από το φυτό ελέγχου Col-0 για σύγκριση: κεντρικός και πλάγιος βλαστός. Το πρότυπο οργάνωσης στους βλαστούς ελέγχου είναι το ίδιο. Οι διαφορές τους εντοπίζονται στο μέγεθος, καθώς ο πλάγιος βλαστός έχει μικρότερη διάμετρο, και στο ποσοστό της λιγνιτοποίησης (μπλε αυτοφθορισμός στο υπεριώδες φως), αφού ο πλάγιος βλαστός φαίνεται να είναι λιγότερο ξυλοποιημένος σε σχέση με τον κεντρικό. Όσον αφορά τις RacRNAi σειρές, αρχικά παρατηρήθηκαν βλαστοί οι οποίοι μακροσκοπικά φαινόταν φυσιολογικοί. Η μικροσκοπική παρατήρηση των συγκεκριμένων βλαστών υπέδειξε ένα εύρος φαινοτύπων. Υπήρξαν φυτά που εμφάνισαν πρότυπο ίδιο με αυτό του αγρίου τύπου (Rac 5, Rac 6, Rac 19, Rac 22, Rac 26) όπου όλοι οι φυτικοί ιστοί διατάσσονται ομοιόμορφα σε ένα ακτινωτό μοτίβο. Σε ορισμένες σειρές παρουσιάστηκαν φυτά με αυξημένο αριθμό ηθμαγγειωδών δεσμίδων (F, f, G, g, N, n, O), ο οποίος κυμαινόταν από 9 έως 15 έναντι του φυσιολογικού που κυμαίνεται από 5 έως 8. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση του πάχους του αγγειακού δακτυλίου. Στην εικόνα E παρατηρείται αύξηση των κυτταρικών στρώσεων τόσο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες όσο και στις μεσοδέσμιες ίνες. Τέλος σε κάποιες σειρές ενώ το πρότυπο ήταν φυσιολογικό η διάμετρος του βλαστού ήταν εμφανώς μικρότερη σε σχέση με το Col-0 (H, h, P, p).

Όσον αφορά τους διπλούς βλαστούς (Q, R) έχει χαθεί η οποιαδήποτε ομοιομορφία στο πρότυπο διάταξης των αγγειακών δεσμίδων στο δακτύλιο, ο αριθμός των οποίων υπερβαίνει κατά πολύ το φυσιολογικό. Στον διπλό βλαστό του φυτού της σειράς Rac 29 (Q) έχει χαθεί η ακτινωτή κατανομή των φυτικών ιστών. Πρώτον μεγάλα παρεγχυματικά κύτταρα παρεμβάλλονται μεταξύ επιδερμίδας και αγωγού ιστού διακόπτοντας την συνέχεια των κυττάρων του φλοιού(Q – γαλάζιο βέλος). Δεύτερον ο αγωγός ιστός δεν σχηματίζει συγκροτημένη δομή, καθώς οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι άτακτα διατεταγμένες και οι μεσοδέσμιες ίνες απουσιάζουν. Τέλος οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες φαίνεται να μην έχουν αναπτυχθεί πλήρως.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η φαινοτυπική ποικιλομορφία που παρουσιάζεται στο πρότυπο οργάνωσης του βλαστού των RacRNAi φυτών εμφανίζεται όχι μόνο μεταξύ των διαφορετικών σειρών αλλά και ανάμεσα στα φυτά της ίδιας RacRNAi σειράς (πχ Rac 18 (φυτά 2.2 και 3.3), Rac 28 (φυτά 3.3 και 5.3)).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το γονίδιο *AtRAC2/ROP7* εκφράζεται κατά την διαφοροποίηση του ξυλώματος σε συγκεκριμένους ιστούς, ένας εκ των οποίων είναι το υποκοτύλιο. Το υποκοτύλιο του φυτού *Arabidopsis thaliana* υπόκειται σε δευτερογενή ανάπτυξη και αποτελεί ένα ιδιαίτερα κατάλληλο μοντέλο για την μελέτη βασικών μηχανισμών δευτερογενούς ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *AtRAC2/ROP7* στον συγκεκριμένο ιστό οδήγησε αρχικά στην μελέτη της κυτταρικής οργάνωσης υποκοτυλίων *RacRNAi* 10H φυτών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτά Col-0 και *Rac* 10H ηλικίας 20 ημερών, 32 ημερών και 9 εβδομάδων μεγαλωμένα σε συνθήκες 16h φώς/8h σκοτάδι στους 22°C. Απομονώθηκε το υποκοτύλιο, πραγματοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές με το χέρι και ακολούθησε παρατήρηση των παρασκευασμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού.

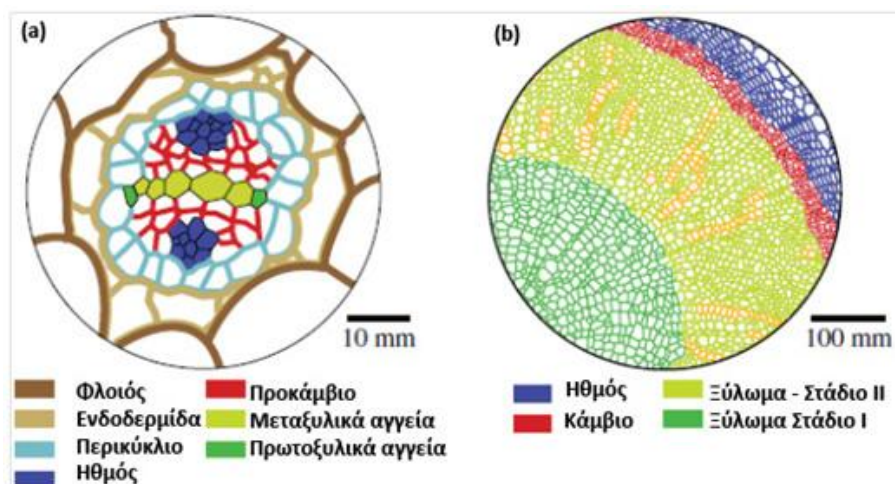


**Εικόνα 3.6:** Εγκάρσιες τομές υποκοτυλίων Col-0 (a,d) και *RacRNAi* 10H (b,c,e,f) φυτών. Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε σε οπτικό φίλτρο και σε υπεριώδες φως. Κλίμακα: (α-σ) 100 μm, (d-f) 200μm.

Σε μια εγκάρσια τομή υποκοτυλίου *Arabidopsis thaliana* ηλικίας 20 ημερών (εικόνα 3.6 a-c) είναι διακριτός ο κεντρικός κύλινδρος, στο κέντρο του οποίου βρίσκεται ο αγωγός ιστός, περιβαλλόμενος από την ενδοδερμίδα. Ακολούθως απαντάται το φλοιώδες

παρέγχυμα και τέλος η επιδερμίδα. Τα φυτά ηλικίας 20 ημερών παρουσιάζουν κανονικό πρότυπο όσον αφορά την διευθέτηση των διαφορετικών ιστών. Η διαφοροποίησή τους σε σχέση με τον άγριο τύπο εντοπίζεται στο μέγεθος του κεντρικού κυλίνδρου και κατ' επέκταση του αγωγού ιστού. Στα φυτά 10H η διάμετρος του κεντρικού κυλίνδρου είναι αισθητά μικρότερη και αγωγός ιστός αποτελείται από λιγότερα αγγεία, δίνοντας την εικόνα που εμφανίζει ένα υποκοτύλιο ηλικίας περίπου 7 ημερών. Στα φυτά ηλικίας 32 ημερών (εικόνα 3.6 d-f) η διαφορά μεγέθους του κεντρικού κυλίνδρου εξακολουθεί να υπάρχει, με τα φυτά 10H να εμφανίζουν μικρότερη διάμετρο. Όσον αφορά τον αγωγό ιστό παρατηρείται διαφορά στο πρότυπο διάταξης των αγγείων. Στο υποκοτύλιο αγρίου τύπου τα αγγεία παρουσιάζουν μια ομοιόμορφη, ακτινωτή διευθέτηση στο κέντρο του κεντρικού κυλίνδρου. Στο υποκοτύλιο των RacRNAi 10H φυτών η ομοιομορφία αυτή χάνεται και τα αγγεία διατάσσονται άτακτα, εξακολουθώντας όμως να βρίσκονται στο κέντρο του κυλίνδρου. Επίσης διαφορά φαίνεται να υπάρχει και στον αριθμό των αγγείων με τα φυτά 10H να έχουν λιγότερα.

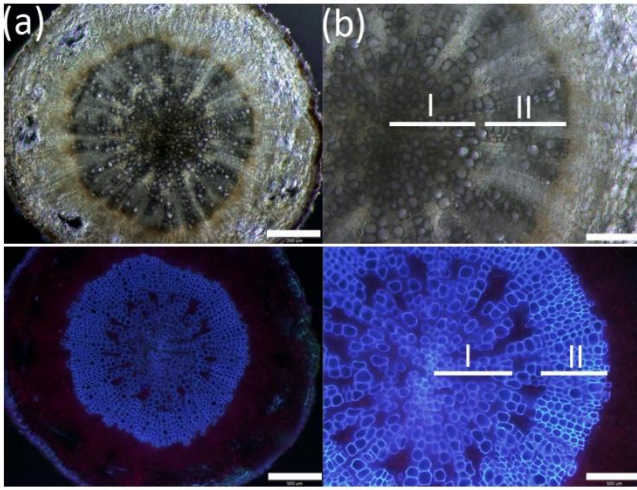
Η δευτερογενής ανάπτυξη ξεκινάει όταν τα κύτταρα του προκαμβίου (βρίσκονται ανάμεσα στο πρωτογενές ξύλο και τον πρωτογενή ηθμό) αρχίζουν να διαιρούνται περικλινώς οδηγώντας στον σχηματισμό ενός συνεχούς δακτυλίου κυττάρων με λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, το λεγόμενο κάμβιο. Οι κυτταρικές διαιρέσεις του καμβίου δίνουν γένεση στο δευτερογενές ξύλο (προς το εσωτερικό του οργάνου) και τον δευτερογενή ηθμό (προς το εξωτερικό του οργάνου). Όσον αφορά την δευτερογενή ανάπτυξη του ξύλου διακρίνονται δύο φάσεις. Στην πρώτη έχουμε την δημιουργία μόνο αγγείων ενώ στη δεύτερη έχουμε την ταυτόχρονη δημιουργία αγγείων και ινών (εικόνα 3.7)



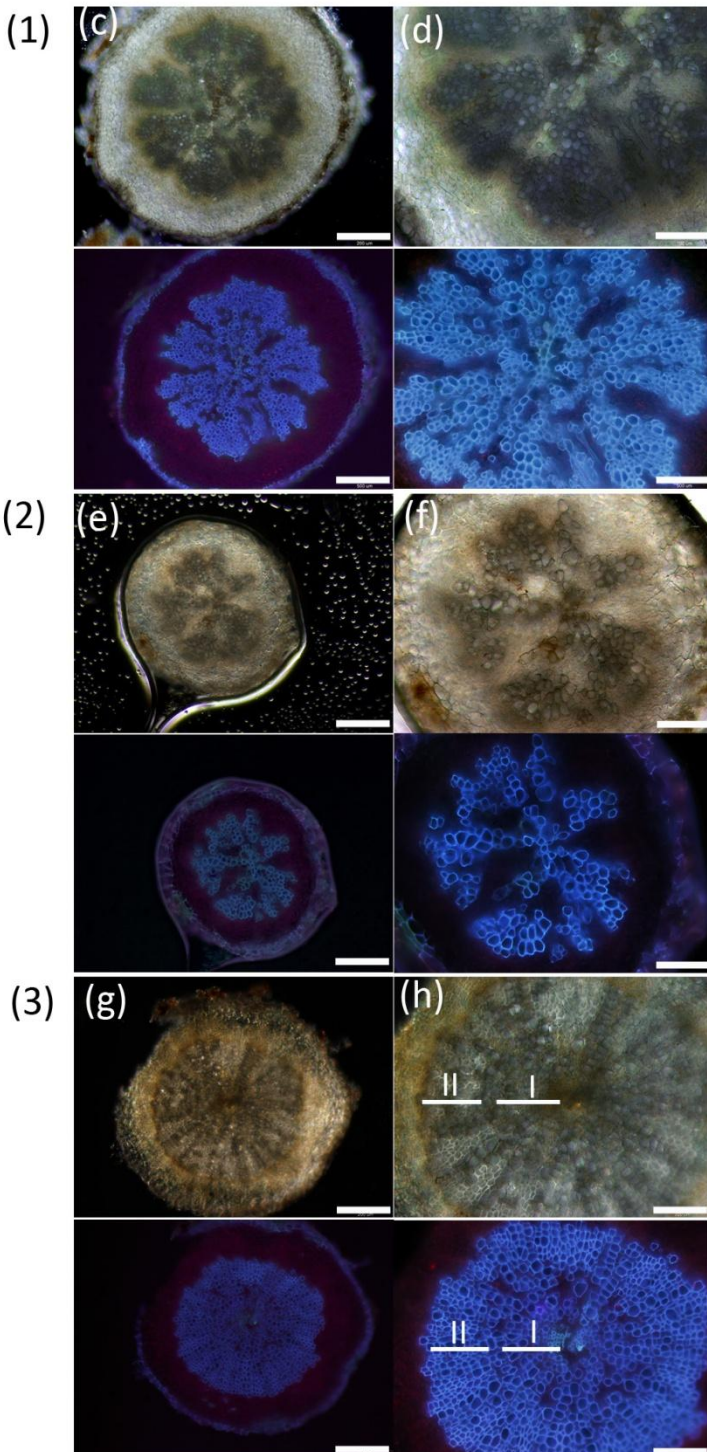
**Εικόνα 3.7:** Εγκάρσιες τομές υποκοτυλίου *Arabidopsis thaliana* που απεικονίζουν την διάταξη των διαφορετικών ιστών κατά την πρωτογενή (a) και τη δευτερογενή (b) ανάπτυξη. (a) Βάση υποκοτυλίου φυταρίου ηλικίας 10 ημερών. (b)

Υποκοτύλιο φυτού ηλικίας 8 εβδομάδων όπου παρατηρείται η φάση I και II της δευτερογενούς ανάπτυξης του ξυλώματος. Η δομή στο σχήμα (a) θα εξελιχθεί στη δομή στο σχήμα (b).

### Col-0



### RacRNAi 10H



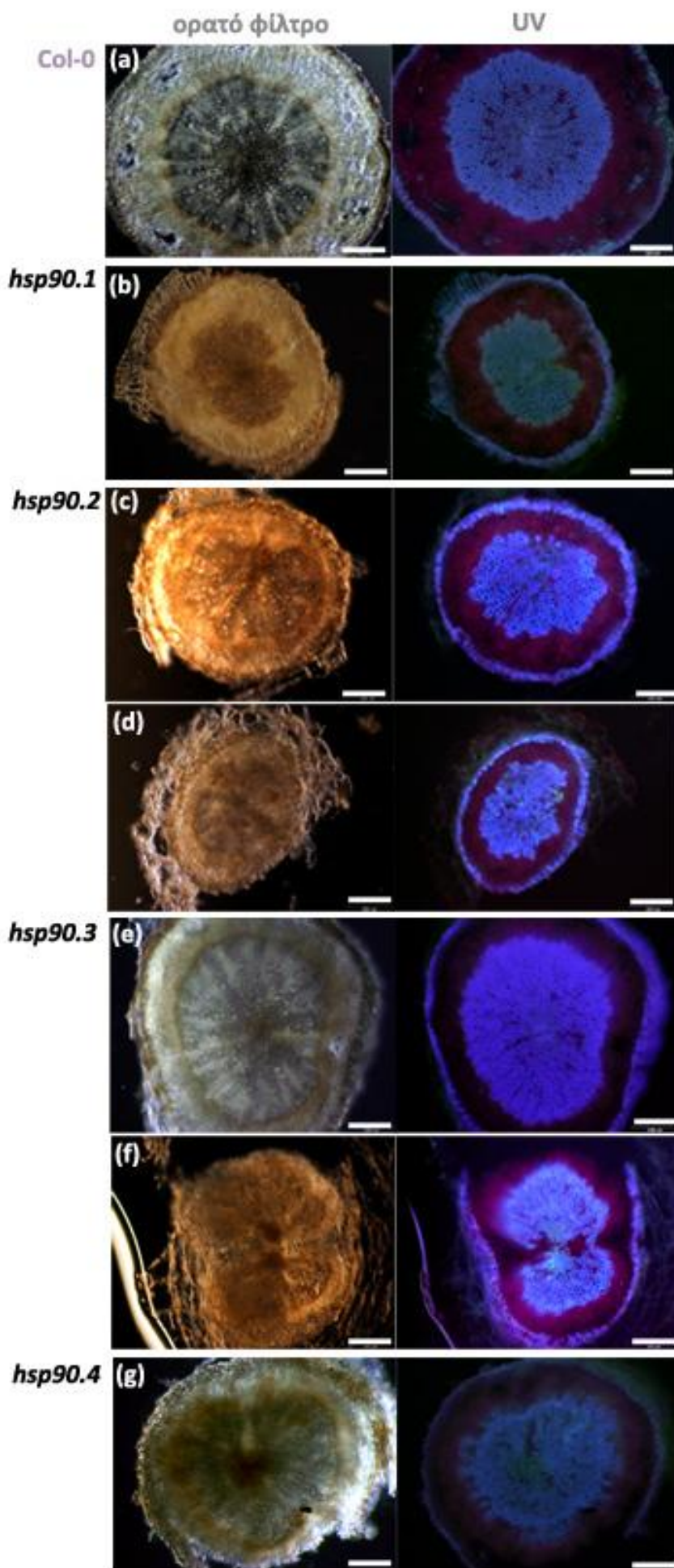
**Εικόνα 3.8:** Εγκάρσιες τομές υποκοτυλίων Col-0 (a,b) και RacRNAi 10H (c-h) ηλικίας 9 εβδομάδων. Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε σε οπτικό φίλτρο και σε υπεριώδες φως. Κλίμακα:(a-g)200μm, (b-h)100 μm.

Προκειμένου να μελετηθεί η δευτερογενής ανάπτυξη του ξυλώματος πραγματοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές σε υποκοτύλια Col-0 και ηλικίας 9 εβδομάδων (εικόνα 3.8). Τα υποκοτύλια Col-0 εμφάνισαν την δομή που απεικονίζεται στο σχήμα 3.7 (b) όσον αφορά το ξύλωμα, δηλαδή διακρίνεται η φάση I και II της δευτερογενούς ανάπτυξης του ξυλώματος. Ο καμβιακός δακτύλιος και ο ηθμός δεν διακρίνονται ξεκάθαρα λόγω του ότι οι τομές πραγματοποιήθηκαν με το χέρι και δεν είναι τόσο λεπτές για να φαίνονται ξεκάθαρα κύτταρα με λεπτότερα κυτταρικά τοιχώματα. Τα υποκοτύλια RacRNAi 10H παρουσίασαν ένα εύρος φαινοτύπων. Αρχικά παρατηρήθηκε ένας φαινότυπος όμοιος με αυτόν του αγρίου τύπου (g, h), δηλαδή εμφανίζεται η ομοιόμορφη διάταξη των αγγείων του ξύλου και διακρίνονται η δύο ξεχωριστές φάσεις της δευτερογενούς ανάπτυξης. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι η μικρότερη διάμετρος υποκοτυλίου που έχει το φυτό 10H. Στη συνέχεια

παρατηρήθηκαν φυτά 10H τα οποία παρουσίασαν πρόβλημα στη δευτερογενή ανάπτυξη του ξύλου και στη γενικότερη διαμόρφωση του προτύπου. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάστηκαν υποκοτύλια στα οποία δεν διακρινόταν τα δύο στάδια της δευτερογενούς ανάπτυξης του ξυλώματος (c-f) με την απουσία των ινών να είναι χαρακτηριστική. Από τις εικόνες φαίνεται ότι αγωγός ιστός αποτελείται μόνο από αγγεία που διατάσσονται άτακτα και ανάμεσα τους παρεμβάλλονται παρεγχυματικά κύτταρα. Η απουσία των ινών αφενός και η άτακτη διάταξη των αγγείων (με μεγάλα κενά να εμφανίζονται μεταξύ τους) αφετέρου, έχουν σαν αποτέλεσμα την διατάραξη της ομοιομορφίας και της «συμπαγούς» ακτινωτής δομής του αγωγού ιστού που παρουσιάζει το φυτό Col-0 . Ο φαινότυπος αυτός εμφάνισε διακυμάνσεις με την πιο ακραία μορφή να παρατίθεται στην εικόνα 3.8 e-f, όπου ο αριθμός των αγγείων φαίνεται να είναι κατά πολύ μικρότερος και το μέγεθος του υποκοτυλίου να είναι σχεδόν υποδιπλάσιο σε σχέση με τον άγριο τύπο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη ότι οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες εμπλέκονται στην δευτερογενή ανάπτυξη του ξυλώματος. Για να θεμελιωθεί περαιτέρω αυτή η άποψη μελετήθηκε η δομή του αγωγού ιστού που εμφανίζει το υποκοτύλιο σε μονά T-DNA μεταλλάγματα των τεσσάρων κυτταροπλασματικών μελών, ηλικίας 9 εβδομάδων (εικόνα 3.9). Η μικροσκοπική παρατήρηση αποκάλυψε, όπως ήταν αναμενόμενο, εύρος φαινοτύπων μεταξύ των οποίων είναι και αυτός του άγριου τύπου (δεν παρατίθενται εικόνες). Σε γενικές γραμμές οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν ήταν πιο ήπιοι συγκριτικά με τα φυτά RacRNAi 10H. Τα HSP90 μεταλλάγματα υπόκεινται σε δευτερογενή ανάπτυξη η οποία όμως εμφανίζει προβλήματα. Η παρουσία των ινών ανιχνεύεται σε όλα τα υποκοτύλια αλλά η διάταξη και το πρότυπο αποκλίνουν από τον άγριο τύπο. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως στην εικόνα 3.9 e, παρατηρείται αλλαγή του σχήματος του υποκοτυλίου με επακόλουθο την προσαρμογή των ιστών στο σχήμα αυτό χωρίς όμως να εμφανίζεται πρόβλημα στο πρότυπο διάταξής τους (ο συγκεκριμένος φαινότυπος παρατηρήθηκε σε όλα τα μεταλλάγματα). Σε άλλες περιπτώσεις η διαφοροποίηση του σχήματος συνδυάστηκε με διαφοροποίηση του προτύπου, όπως στην εικόνα 3.9 f όπου το υποκοτύλιο φαίνεται να αποτελείται από δύο κέντρα και προσπαθεί να χωρίσει στα δύο. Επιπλέον παρατηρήθηκαν υποκοτύλια όπου η έκταση της φάσης I ήταν μικρότερη και τα αγγεία που απαρτίζουν τη φάση II παρουσίασαν μία τάση μετατόπισης προς το εξωτερικό του οργάνου, με αποτέλεσμα να μη σχηματίζεται η συμμετρική μορφή που παρουσιάζει ο άγριος τύπος (εικόνα 3.9 g). Τέλος εμφανίστηκαν υποκοτύλια με διάμετρο αρκετά μικρότερη του Col-0 (b,d) καθώς και υποκοτύλια όπου η φάση I του ξυλώματος ήταν έκκεντρη με αποτέλεσμα την μετατόπιση και των υπολοίπων ιστών.





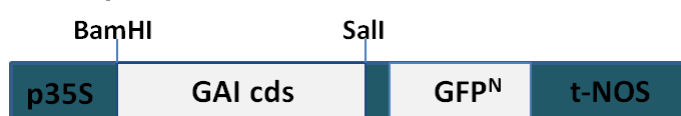
**Εικόνα 3.9:**  
 Εγκάρσιες τομές υποκοτυλίων Col-0 (a) και *hsp90* μεταλλαγμάτων (b-g) ηλικίας 9 εβδομάδων. *hsp90.1.1*: (b), *hsp90.2*: (c, d), *hsp90.3*: (e,f), *hsp90.4*: (g) Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε σε οπτικό φίλτρο και σε υπεριώδες φως. Κλίμακα: 200μm.

### 3.2 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in planta*

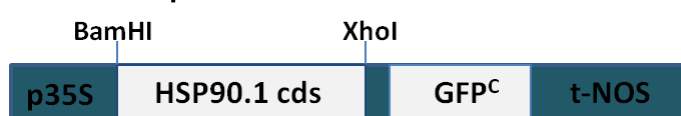
Τα φαινοτυπικά αποτελέσματα των Rac2::Hsp90RNAi σειρών υποδεικνύουν πιθανή εμπλοκή των HSP90 σε μονοπάτια που διέπουν την ανάπτυξη και εγκαθίδρυση του αγγειακού ιστού στο *Arabidopsis thaliana*. Δεδομένου ότι οι HSP90, έχοντας την ιδιότητα του μοριακού συνοδού, κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση πληθώρας πρωτεϊνών που αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές διάφορων βιολογικών συστημάτων, θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με κάποια πρωτεΐνη του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των γιββερελλινών επηρεάζοντας έτσι την ξυλογένεση (πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως η σηματοδότηση και η βιοσύνθεση των GAs είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του ξύλου). Κινούμενοι προς αυτή την κατεύθυνση θελήσαμε να εξετάσουμε την ενδεχόμενη αλληλεπίδραση των HSP90 με την πρωτεΐνη GAI. Η GAI ανήκει στις πρωτεΐνες DELLA, που αποτελούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι καταστέλλουν το σινιάλο των γιββερελλινών και περιορίζουν την ανάπτυξη των φυτών.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη GAI χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία bimolecular fluorescence complementation (BiFC) γνωστή ως και split YFP. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στο σχηματισμό ενός φθορίζοντος συμπλόκου από δύο μη φθορίζοντα θραύσματα της πρωτεΐνης YFP (yellow fluorescent protein) τα οποία σε περίπτωση αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών αναδιπλώνονται και δημιουργούν μια ενεργή φθορίζουσα YFP πρωτεΐνη. Η κάθε κατασκευή από μόνη της καθώς και η μη αλληλεπίδραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών δεν παράγουν ανιχνεύσιμο σήμα στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.1-GAI και HSP90.3-GAI. Οι τελικές κατασκευές στους φορείς pSPYNE και pSPYCE παρατίθενται στην εικόνα 3.10.

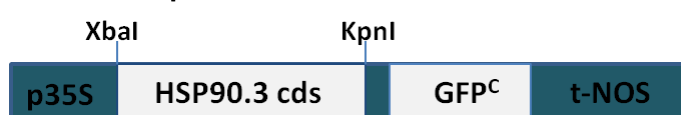
#### AtGAI-pSPYNE



#### AtHSP90.1-pSPYCE



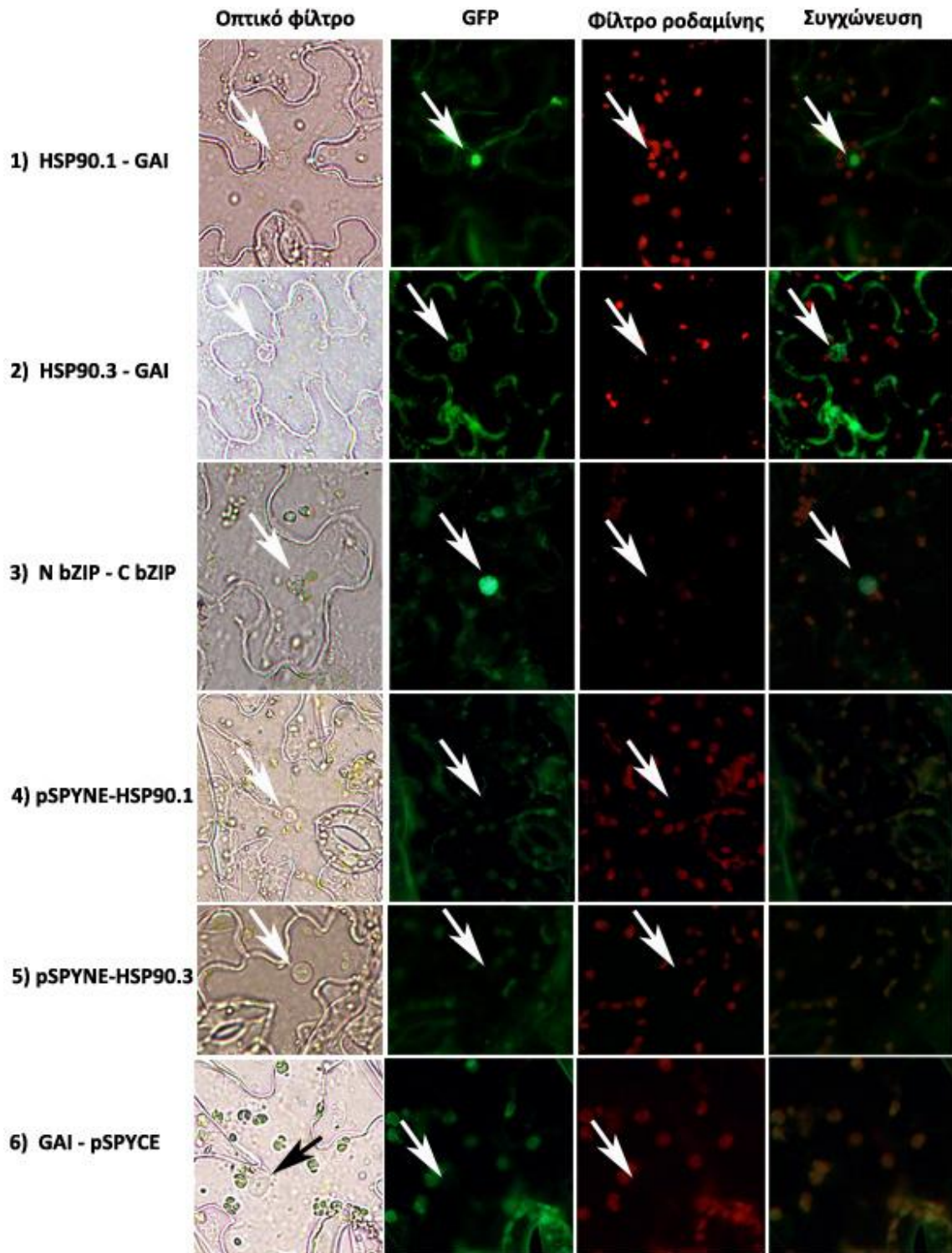
#### AtHSP90.3-pSPYCE



**Εικόνα 3.10:** Σχηματική απεικόνιση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού. Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο pSPYNE και ο pSPYCE. Τα cDNA των γονιδίων κλωνοποιούνται στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα σε μεταφραστική σύντηξη με το τμήμα της GFP πρωτεΐνης που περιέχεται στον φορέα. Οι κασέτες έκφρασης είναι υπό την καθοδήγηση του καθολικού προαγωγέα 35S.

Για τον παροδικό σχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana benthamiana*) στο αναπτυξιακό στάδιο των 6 (περίπου) πραγματικών φύλλων. Πραγματοποιήθηκε ένεση στην αποαξονική επιφάνεια των φύλλων με καλλιέργεια *Agrobacterium* όπου εμπεριέχονταν οι παρακάτω συνδυασμοί κατασκευών: **1)** rSPYNE:GAI / rSPYCE:HSP90.1 / p19, **2)** rSPYNE:GAI / rSPYCE:HSP90.3 / p19, **3)** rSPYNE:NbZIP / rSPYCE:CbZIP / p19, **4)** rSPYNE:GAI / rSPYCE / p19, **5)** rSPYNE / rSPYCE:HSP90.1 / p19, **6)** rSPYNE / rSPYCE:HSP90.3 / p19. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν επιπλέον μετασχηματισμοί που αφορούσαν στον θετικό και αρνητικό έλεγχο της μεθόδου δοκιμής. Για τον θετικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη bZIP63 που ανήκει στην υποοικογένεια C των μεταγραφικών παραγόντων bZIP. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σχηματίζει ομοδιμερή και ετεροδιμερή και εντοπίζεται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Για τον αρνητικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί κατασκευών 4, 5, 6. Μετά από 72 ώρες αφαιρέθηκε η υποδερμίδα των εμβολιασμένων φύλλων και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού (εικόνα 3.11).

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3.11 η αλληλεπίδραση θετικού ελέγχου λειτούργησε καθώς ανιχνεύεται φθορισμός στον πυρήνα των μετασχηματισμένων κυττάρων. Όσον αφορά τους συνδυασμούς των κατασκευών αρνητικού ελέγχου, δεν παρατηρείται φθορισμός στον πυρήνα των κυττάρων παρά μόνο ανιχνεύεται ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης. Στα φύλλα καπνού, όπου πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με τις κατασκευές rSPYNE:GAI / rSPYCE:HSP90.1 και rSPYNE:GAI / rSPYCE:HSP90.3, ανιχνεύθηκε φθορισμός (στον πυρήνα των κυττάρων), γεγονός που αποτελεί ισχυρή ένδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ GAI:HSP90.1 και GAI:HSP90.3. Η δράση της πρωτεΐνης GAI τοποθετείται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Όμως παρουσία γιββερελίνης οι DELLA, και κατά συνέπεια η πρωτεΐνη GAI, οδηγούνται στο κυτταρόπλασμα για να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα 26S. Η ανίχνευση φθορισμού στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού μπορεί να σημαίνει ότι οι HSP90 βοηθούν την πρωτεΐνη GAI να εισέλθει στον πυρήνα και να εκδηλώσει την δράση της ή ότι αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη GAI στον πυρήνα αποτελώντας μέρος του συμπλόκου GA-GID-DELLA που οδηγεί τις πρωτεΐνες DELLA στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση.

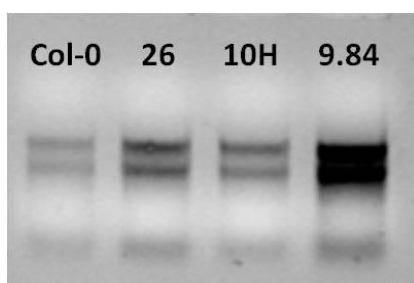


**Εικόνα 3.11:** Αποτελέσματα μικροσκοπικής παρατήρησης υποδερμίδας φύλλων καπνού όπου πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασχηματισμός με τους εξής συνδυασμούς κατασκευών: **1)** pSPYNE:GAI / pSPYCE:HSP90.1 / p19, **2)** pSPYNE:GAI / pSPYCE:HSP90.3 / p19, **3)** pSPYNE:NbZIP / pSPYCE:CbZIP / p19, **4)** pSPYNE:GAI / pSPYCE / p19, **5)** pSPYNE / pSPYCE:HSP90.1 / p19, **6)** pSPYNE / pSPYCE:HSP90.3 / p19. Τα φίλτρα του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι το οπτικό, το φίλτρο GFP για την ανίχνευση φθορισμού(αλληλεπίδρασης) και το φίλτρο ροδαμίνης για την ανίχνευση του φθορισμού του χλωροπλάστη. Τα βέλη υποδεικνύουν τους υπό μελέτη πυρήνες.

### 3.3 Μοριακή ανάλυση των Rac2::Hsp90RNAi φυτών

Από την φαινοτυπική παρατήρηση των Rac2::Hsp90RNAi σειρών είναι εμφανές ότι τα αποσιωπημένα φυτά παρουσιάζουν πρόβλημα στη δομή του αγωγού ιστού, ιδιαίτερα κατά την δευτερογενή ανάπτυξη του ξύλου όπου λαμβάνει χώρα η δημιουργία των ινών. Η επαγωγή της διαφοροποίηση των ινών ελέγχεται από φυτικές ορμόνες: την αυξίνη, την γιββερελλίνη και την κυτοκίνη. Οι αυξίνες και οι γιββερελλίνες εμπλέκονται στην δημιουργία και δομή της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των ινών (Dayan et al, 2010). Επιπλέον έχει δειχθεί πως οι γιββερελλίνες έχουν δύο συγκεκριμένους ρόλους κατά την διαφοροποίηση του ξύλου: επάγουν την ξυλογένεση και την επιμήκυνση των ξυλωδών ινών (Mauriat and Moritz, 2009).

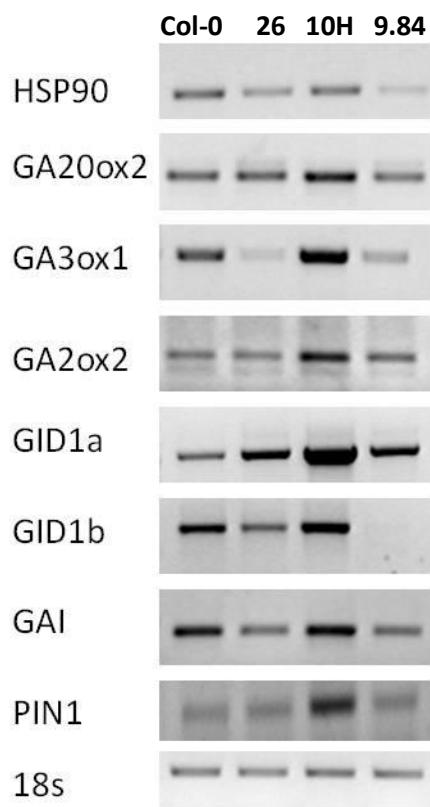
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση (*GA20ox2*, *GA3ox1*), τον καταβολισμό (*GA2ox2*) και την μεταγωγή σήματος (*GID1a*, *GID1b*, *GAI*) των γιββερελλινών, την πολική μεταφορά της αυξίνης (*PIN1*) καθώς επίσης ελέγχθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης των κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ημιποσοτικού-PCR (RT-PCR). Απομονώθηκε ολικό RNA από υποκοτύλια φυτών ηλικίας 7 ημερών (Col-0 και RACRNAi 26, 10H, 9.84), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε μήτρα για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA (εικόνα 3.12).



**Εικόνα 3.12:** Ανάλυση RNA (1μl) σε 1% πηκτή αγαρόζης.

Για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων απαιτείται η ενίσχυση των μεταγραφημάτων ενός γονιδίου αναφοράς (18S rRNA), το οποίο χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για την κανονικοποίηση των διαφορετικών δειγμάτων RNA. Με τον τρόπο αυτό καθορίζεται (εξισορροπείται) η ποσότητα RNA που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε αντίδραση. Συνεπώς διαφορές στην ποσότητα ενίσχυσης του μεταγραφήματος στόχου οφείλονται στη διαφορετική έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στα διαφορετικά δείγματα και όχι στις διαφορετικές ποσότητες ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Μετά την

κανονικοποίηση των δειγμάτων με το συστατικό γονίδιο, εξειδικευμένοι εκκινητές από τα επιλεγμένα προς ανάλυση γονίδια χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση PCR με μήτρα το cDNA. Τα αποτελέσματα της PCR αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικόνα 3.13 ).



**Εικόνα 3.13.:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR της μελέτης έκφρασης των κυτταροπλασματικών AtHSP90 και γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων του αγωγού ιστού σε υποκοτύλια Rac2::Hsp90RNAi (26, 10H, 9.84) και στον άγριο τύπο(Col-0). Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1,5 μg ολικού RNA για αντίστροφη μεταγραφή.

Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων δείχνουν μείωση των επιπέδων έκφρασης των HSP90 στα RacRNAi φυτά με εξαίρεση το 10H στο οποίο ανιχνεύονται σε φυσιολογικά επίπεδα. Τα επίπεδα των μεταγραφημάτων των γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι βιοσύνθεσης και σηματοδότησης της γιββερελλίνης ποικίλουν. Συγκεκριμένα τα υποκοτύλια του άγριου τύπου στην ηλικία των επτά ημερών παρουσιάζουν έλλειψη γιββερελλίνης καθώς τα βιοσυνθετικά γονίδια και τα γονίδια που εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος γιββερελλίνης παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με το γονίδιο καταβολισμού. Η σειρά 10H παρουσιάζει μεγαλύτερη έλλειψη GA εφόσον τα επίπεδα έκφρασης των βιοσυνθετικών και σηματοδοτικών γονιδίων γιββερελλίνης καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα αυξίνης αυξάνονται σε σχέση με τον άγριο τύπο. Οι σειρές 26 και 9.84 ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων, σύμφωνα με το οποίο φαίνεται να επηρεάζεται κυρίως η αντίληψη σήματος των γιββερελλινών. Τα αποτελέσματα των PCR δείχνουν πως και στις δύο σειρές

τα επίπεδα της γιββερελλίνης είναι υψηλότερα σε σχέση με τον άγριο τύπο καθώς η έκφραση του *GA3ox1*, που εμπλέκεται στο τελευταίο στάδιο βιοσύνθεσης ενεργών GAs, είναι μειωμένη σε σχέση με το Col-0. Η παρουσία γιββερελλίνης θα έπρεπε να επιφέρει μείωση των μεταγραφημάτων των γονιδίων *GID1*, πράγμα που παρατηρείται μόνο στο γονίδιο *GID1b*. Στο γονίδιο *GID1a* παρατηρείται αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων σε σχέση με τον άγριο τύπο. Άρα και στις δύο αυτές σειρές παρατηρείται πρόβλημα στην αντίληψη της παρουσίας γιββερελλίνης. Συνεπώς μείωση των μεταγραφημάτων των *HSP90* επιφέρει πρόβλημα τόσο στη βιοσύνθεση όσο και στην απόκριση των γιββερελλινών, γεγονός που ενδεχομένως είναι απόρροια της μη ορθής πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ *HSP90* και *GAI* που οδηγεί σε διατάραξη του μονοπατιού των γιββερελλινών.

## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



Τα φυτά όντας οργανισμοί στερούμενοι μετακίνησης αντιμετωπίζουν τις συνεχείς προκλήσεις ενός διαρκώς μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος. Ως εκ τούτου, μηχανισμοί που συντελούν στην αναπτυξιακή σταθερότητα ενώ ταυτόχρονα επιτρέπουν μεταβολές απόκρισης σε περιβαλλοντική πίεση, πιθανώς να είναι μεγαλύτερης σημασίας σε φυτά παρά σε άλλα συστήματα. Το σύστημα των HSP90 μοριακών συνοδών έχει την ικανότητα να λειτουργεί σαν ρυθμιστής πληθώρας γενετικών και περιβαλλοντικών διαταράξεων που επηρεάζουν την ανάπτυξη ενός οργανισμού.

Στους ευκαρυώτες οι HSP90 είναι απαραίτητες για την διατήρηση της ζωτικότητας των κυττάρων και συνεπώς της βιωσιμότητας των οργανισμών. Αποτελούν υψηλά συντηρημένο, μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, μοριακό τσαπερόνιο, το οποίο διευκολύνει την ωρίμανση διαφόρων ασταθών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, που αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές βιολογικών συστημάτων. Επίσης οι HSP90 έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν την φαινοτυπική ποικιλομορφία καταστέλλοντας τις συνέπειες των υφιστάμενων γενετικών πολυμορφισμών (Queitsch et al 2002). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν χαρακτηριστεί επτά μέλη που απαρτίζουν την πολυγονιδιακή οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών, τέσσερα κυτταροπλασματικά (*Hsp90.1*, *Hsp90.2*, *Hsp90.3*, *Hsp90.4*), ένα χλωροπλαστικό (*Hsp90.5*), ένα μιτοχονδριακό (*Hsp90.6*) και ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (*Hsp90.7*). Από τα κυτταροπλασματικά μέλη ένα επάγεται από θερμικό σοκ, ενώ τα υπόλοιπα εκφράζονται συνεχώς.

Αντικείμενο αυτής της εργασίας αποτελεί η μελέτη του ενδεχόμενου ρόλου των κυτταροπλασματικών HSP90 πρωτεϊνών στη δημιουργία του αγωγού ιστού του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ο μηχανισμός της RNA γονιδιακής αποσιώπησης (RNAi) που επιτρέπει την ταυτόχρονη επενέργεια στα επίπεδα έκφρασης και των τεσσάρων γονιδίων χωρίς να απειλείται, στις περισσότερες περιπτώσεις, η βιωσιμότητα του οργανισμού. Αναλύθηκαν RNAi σειρές *Arabidopsis thaliana* που περιείχαν κατασκευή αποσιώπησης για τις κυτταροπλασματικές HSP90 υπό τον έλεγχο του ιστοειδικού προαγωγέα Rac2/ROP7. Το γονίδιο *Rac2/ROP7* εκφράζεται στο πρωτογενές ξύλωμα των ριζών, υποκοτυλίου, κοτυληδόνων, βλαστών και φύλλων και έχει σχετιστεί με το σχηματισμό δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Brembu et al, 2005). Γενικότερα χαμηλή έκφραση του γονιδίου *AtRac2/ROP7* ανιχνεύεται καθ'όλη την ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis* ενώ μέγιστα παρατηρούνται σε συγκεκριμένους ιστούς όπως το υποκοτύλιο, η ρίζα και ο βλαστός.

#### **4.1 Οι HSP90 επηρεάζουν τον φαινότυπο του αγωγού ιστού στο *Arabidopsis thaliana*.**

Από την στοχευμένη αποσιώπηση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων υπό τον έλεγχο του *AtRac2/ROP7* ιστοειδικού προαγωγέα προέκυψαν 33 αποσιωπημένες σειρές. Τα μέχρι τώρα εργαστηριακά αποτελέσματα για τον ρόλο των *HSP90* πρωτεϊνών στο μονοπάτι ανάπτυξης του αγωγού ιστού πηγάζουν από την σειρά *RacRNAi 10H*. Η συγκεκριμένη σειρά παρουσίασε πλειοτροπικό φαινότυπο και χαρακτηρίστηκαν πέντε φαινοτυπικές κατηγορίες (Δημοπούλου Α., μεταπτυχιακή μελέτη). Γενικότερα παρατηρήθηκε καθυστέρηση στην ανάπτυξη, διακύμανση στο ύψος, αυξημένος αριθμός φύλλων ροζέτας, έκπτυξη πολυάριθμων πλάγιων καθώς και σιαμαίων βλαστών, ανώμαλο πρότυπο αγγειακού ιστού στις κοτύλες κα. Παρόμοιοι φαινότυποι παρατηρήθηκαν τόσο σε έκφυτα *Arabidopsis thaliana*, που χαρακτηρίζονται από μειωμένα επίπεδα *HSP90* λόγω χρήσης του στοχευμένου χημειοθεραπευτικού φαρμάκου Geldanamycin (Τζελνταναμυκίνης) (Queitsch et al., 2002).

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη του αγγειακού προτύπου σε βλαστούς δέκα *RacRNAi* σειρών. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση εγκαρσίων τομών βλαστών των αποσιωπημένων σειρών παρατηρήθηκε εύρος φαινοτύπων που κυμάνθηκε από το φαινότυπο άγριου τύπου έως φαινοτύπους με έντονα διαταραγμένο πρότυπο των αγωγών στοιχείων του ηθμού και του ξύλου. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν φυτά που εμφάνισαν αυξημένο αριθμό ηθμαγειώδων δεσμίδων, υποδιπλάσια διάμετρο βλαστού, αύξηση των κυτταρικών στρώσεων αγγειακών δεσμίδων και μεσοδέσμιων ινών και διατάραξη σχήματος του αγγειακού προτύπου. Στους διπλούς βλαστούς παρουσιάστηκε επιπλέον άτακτη διευθέτηση και παρουσία υπανάπτυκτων αγγειακών δεσμίδων καθώς και απόκλιση από το φυσιολογικό πρότυπο διάταξης των φυτικών ιστών στο βλαστό (παρεγχυματικά κύτταρα καταλαμβάνουν τη θέση των κυττάρων του φλοιού). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε στο πρότυπο διάταξης των στοιχείων του αγωγού ιστού παρατηρήθηκε και σε φυτά που ανήκουν στην ίδια *RacRNAi* σειρά.

Το *Arabidopsis thaliana* παρόλο που είναι πώδες φυτό αποτελεί μοντέλο για την μελέτη σχηματισμού του ξύλου, καθώς έχει δείχτει πως συντηρημένοι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την αγγειακή ανάπτυξη και τη δημιουργία ξύλου απαντώνται σε δέντρα και πώδη φυτά. Ιδιαίτερα το υποκοτύλιο του φυτού *Arabidopsis* αποτελεί ιδανικό μοντέλο για την μελέτη βασικών μηχανισμών δευτερογενούς ανάπτυξης. Για να διερευνηθεί ο ρόλος

των HSP90, σε αυτήν τη σημαντική και δυναμική διαδικασία της δευτερογενούς ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκαν τομές σε υποκοτύλια RacRNAi 10H και Col-0 σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν ήταν ηπιότεροι στα νεαρά φυτά και δριμύτεροι στα ενήλικα. Ειδικότερα τα RacRNAi 10H ενήλικα φυτά παρουσίασαν έντονο πρόβλημα οργάνωσης του αγωγού ιστού στο υποκοτύλιο. Χαρακτηριστική είναι η έλλειψη της ακτινωτής διάταξης των ινών στο xylem I σε σύγκριση με τον άγριο τύπο καθώς παρατηρείται μείωση του αριθμού των λιγνιτοποιημένων ινών που αποτελούν συστατικό φυτικό ιστό της δεύτερης φάσης της δευτερογενούς ανάπτυξης (xylem II).

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η δομή του αγωγού ιστού που εμφανίζει το υποκοτύλιο ενήλικων μονών T-DNA μεταλλαγμάτων των τεσσάρων *hsp90* κυτταροπλασματικών μελών. Σε γενικές γραμμές οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν ήταν πιο ήπιοι συγκριτικά με τα φυτά RacRNAi 10H, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε αλληλοεπικάλυψη των δράσεων των τεσσάρων γονιδίων. Τα *hsp90* μεταλλάγματα παρόλο που υπόκεινται δευτερογενή ανάπτυξη παρουσιάζουν προβλήματα στη διάταξη του δευτερογενούς ξυλώματος, το οποίο δεν είναι κυκλικά συμμετρικό όπως στην περίπτωση του άγριου τύπου. Επίσης τα επίπεδα έλλειψης των λιγνιτοποιημένων ινών διαφέρουν καθώς φαινοτυπική ποικιλομορφία εξακολουθεί να υφίσταται τόσο μεταξύ των διαφορετικών μεταλλαγμάτων όσο και ανάμεσα στα φυτά του ίδιου μεταλλάγματος.

Από τα παραπάνω καθίσταται εμφανές ότι οι HSP90 πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την μορφογένεση και ανάπτυξη του αγωγού ιστού στην *Arabidopsis*, καθώς η μείωση των επιπέδων έκφρασής τους προκαλεί διατάραξη του αγγειακού προτύπου σε βλαστό και υποκοτύλιο. Είναι γνωστό πως η ανάπτυξη του αγγειακού ιστού αρχίζει όταν ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις των κορυφαίων μεριστωμάτων δημιουργούν το προκάμβιο (πρωτογενής μεριστωματικός ιστός που παράγει τους πρωτογενείς αγωγούς ιστούς). Αργότερα στον κύκλο ζωής του φυτού μερικά από τα πολυδύναμα προκαμβιακά κύτταρα διαιρούνται περικλινώς και δημιουργούν τα πλευρικά μεριστώματα. Τα πλευρικά μεριστώματα παράγουν μόνιμους ιστούς όπως το κάμβιο το οποίο δίνει γένεση στους δευτερογενείς αγωγούς ιστούς. Συνεπώς ο φαινότυπος που παρατηρήθηκε κατά την μελέτη της δομής του αγωγού ιστού θα μπορούσε να είναι απόρροια δυσλειτουργίας του κεντρικού μεριστώματος, γεγονός που συνηγορεί και με την απώλεια κυριαρχίας κορυφής που εμφανίζεται στα RacRNAi 10H φυτά. Εργαστηριακά δεδομένα που δεν παρατίθενται στην παρούσα εργασία αποκαλύπτουν πρόβλημα στην κυτταρική οργάνωση και δομή του κορυφαίου μεριστώματος βλαστού των RacRNAi φυτών

(Σαμακοβλή Δέσποινα, προσωπική επικοινωνία). Επιπλέον το πρόβλημα που παρατηρήθηκε στην δευτερογενή ανάπτυξη των υποκοτυλίων των αποσιωπημένων φυτών θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της μη σωστής λειτουργικότητας του καμβίου, εφόσον το κάμβιο (είναι υπεύθυνο για τη δευτερογενή αύξηση) παράγει τους δευτερογενείς αγωγούς ιστούς. Επειδή όμως το πρόβλημα παρουσιάζεται εξειδικευμένα στην απουσία ινών, καθώς τα αγγεία του ξύλου υφίστανται, ο συγκεκριμένος φαινότυπος ίσως να είναι αποτέλεσμα της μη σωστής διαφοροποίησης των κυττάρων και όχι της δυσλειτουργίας του καμβίου. Τέλος δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ο συγκεκριμένος φαινότυπος να είναι θέμα ανεπαρκούς λιγνιτοποίησης των ινών. Η λιγνιτοποίηση στο συγκεκριμένο στάδιο ελέγχεται ορμονικά καθώς οι αυξίνες και οι γιββερελλίνες εμπλέκονται στην δημιουργία και δομή της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των ινών (Dayan et al, 2010).

Όσον αφορά τη διατάραξη του προτύπου που εμφάνισαν τα αποσιωπημένα φυτά στη δομή του αγγειακού μοτίβου σε υποκοτύλιο και βλαστό, είναι γνωστό πως η πολική μεταφορά της αυξίνης είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του αγγειακού μοτίβου και της διαφοροποίησης του προκαμβίου. Έχει δειχθεί επίσης ότι η εφαρμογή αυξίνης μαζί με γιββερελίνη προάγει την διαίρεση των κυττάρων του καμβίου περισσότερο από την μεμονωμένη εφαρμογή των δυο ορμονών ξεχωριστά, δηλώνοντας πως οι δυο αυτές ορμόνες δρουν συνεργιστικά για την ρύθμιση της δράσης του καμβίου ( Zhang et al, 2010). Επιπλέον οι γιββερελλίνες μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό ξύλου σε δύο ιστοειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια: την ξυλογένεση στο κάμβιο και την επιμήκυνση ινών στο αναπτυσσόμενο ξύλο (Mauriat and Moritz, 2009).

Τέλος δεν θα μπορούσε να περάσει απαρατήρητη η φαινοτυπική ποικιλομορφία που παρουσίασαν τόσο οι RacRNAi σειρές όσο και τα *hsp90* μεταλλάγματα ως προς τα μελετώμενα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Η οξύτητα των μορφολογικών αυτών χαρακτηριστικών δεν ήταν ίδια ανάμεσα σε όλα τα φυτά των υπό μελέτη σειρών. Για τα RacRNAi φυτά αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το ποσοστό της γονιδιακής αποσιώπησης είναι δυνατό να ποικίλει από φυτό σε φυτό, γεγονός που οδηγεί σε μία διαβάθμιση των παρατηρούμενων φαινοτύπων. Επιπλέον, οι HSP90 πρωτεΐνες εμπλέκονται σ' ένα εξελικτικά συντηρημένο μοριακό μηχανισμό που επηρεάζει την φαινοτυπική ποικιλομορφία (Rutherford and Lindquist, 1998). Ειδικότερα, το HSP90 τσαπερόνιο ρυθμίζει την καναλοποίηση κατά την ανάπτυξη, καταστέλλοντας τους πολυμορφισμούς και συνεπώς περιορίζοντας την φαινοτυπική πλαστικότητα (Salathia N.

and Queitsch, 2007 ). Οι HSP90 λοιπόν θέτουν τα “όρια” μεταξύ των οποίων κυμαίνεται ο φαινότυπος. Είναι πιθανό ότι αν με κάποιο τρόπο ελαττωθούν ή απαλείφουν τα επίπεδα των HSP90, τότε τα όρια αυτά ελαστικοποιούνται και οι στοχαστικοί μηχανισμοί οδηγούν σε πληθώρα φαινοτύπων που αποκλίνουν από τον κανονικό. .

#### 4.2 Οι HSP90 και το μονοπάτι των γιββερελλινών

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως η βιοσύνθεση και η σηματοδότηση των GAs είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του ξύλου, καθώς και ότι η διαφοροποίηση των ινών είναι έμμεσο αποτέλεσμα της GA-ενεργοποιημένης επέκτασης του ξυλώδους ιστού (Ragni et al, 2011). Οι πρωτεΐνες DELLA είναι βασικοί ρυθμιστές του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των GAs και αποτελούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Γενικότερα οι DELLA πρωτεΐνες καθυστερούν την ανάπτυξη του φυτού (ειδικότερα η πρωτεΐνη GAI καταστέλλει την επιμήκυνση του βλαστού, King et al., 2001) σε αντίθεση με τις γιββερελλίνες που την επάγουν, οδηγώντας τις DELLA για αποικοδόμηση μετά τη σύνδεσή τους με τους GID1 υποδοχείς. Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης των HSP90.1 και HSP90.3 με την GAI έδειξε ότι οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν *in planta*. Η δράση της πρωτεΐνης GAI τοποθετείται στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Όμως παρουσία γιββερελίνης οι DELLA, και κατά συνέπεια η πρωτεΐνη GAI, προσδέονται στο σύμπλοκο GA-GID1 και οδηγούνται στο κυτταρόπλασμα για να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα 26S. Στα ζωικά συστήματα έχει επιβεβαιωθεί η είσοδος των HSP90 στον πυρήνα των κυττάρων (Echeverria et al., 2009). Επίσης, στους φυτικούς οργανισμούς πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως οι HSP90 εισέρχονται στον πυρήνα σχηματίζοντας σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα BIN2, εμπλεκόμενες έτσι στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασινοστεροειδών (Samakovli et. al, in preparation). Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την αποδεδειγμένη συνεργασία των HSP90 με το πρωτεάσωμα 26S για τον έλεγχο της ομοιόστασης των πρωτεϊνών (Makhnevych and Houry, 2011) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι HSP90 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη GAI στον πυρήνα είτε σταθεροποιώντας το συμπλόκο GA-GID-DELLA, είτε συμβάλλοντας στην μεταγενέστερη αποικοδόμηση της DELLA από το πρωτεάσωμα 26S (εφόσον έχει προηγηθεί αναγνώριση της DELLA και πολυ-ουβικουϊτινίωση από το SCF<sup>SLY1/GID2</sup> λιγάση της ουβικιτίνης E3 σύμπλοκο). Βέβαια απαιτούνται και άλλες πειραματικές προσεγγίσεις για την επιβεβαίωση της ορθότητας του παραπάνω ισχυρισμού.

Μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση (*GA20ox2*, *GA3ox1*), τον καταβολισμό (*GA2ox2*) και την μεταγωγή σήματος (*GID1a*, *GID1b*,

GAI) των γιββερελλινών. Επιπρόσθετα ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *PIN1* που κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα εκροής της αυξίνης καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων.

Τα αποτελέσματα των προτύπων έκφρασης των παραπάνω γονιδίων υποδεικνύουν πως μείωση των μεταγραφημάτων των *HSP90* επιφέρει πρόβλημα τόσο στη βιοσύνθεση όσο και στην απόκριση των γιββερελλινών, καθώς είτε παρουσιάζεται πρόβλημα στην αντίληψη παρουσίας της γιββερελλίνης (σειρές 26 και 9.84) είτε έντονη έλλειψή της (σειρά 10H). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως είναι απόρροια της μη ορθής πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ *HSP90* και GAI που οδηγεί σε διατάραξη του μονοπατιού των γιββερελλινών.

Η διατάραξη του μονοπατιού του γιββερελλινικού οξέος λόγω της μείωσης των επιπέδων των *HSP90* επιβεβαιώνεται και από άλλα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας. Συγκεκριμένα τα φυτά της σειράς *RacRNAi* 10H όταν αναπτύσσονται σε συνθήκες μικρής ημέρας παρουσιάζουν πρόβλημα στην άνθηση (καθυστέρηση ή και απουσία άνθησης). Οι γιββερελλίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της άνθησης σε συνθήκες μικρής ημέρας καθώς μελέτες στο *Arabidopsis* έχουν δείξει πως φυτά που αδυνατούν να συνθέσουν GA δεν ανθίζουν όταν μεγαλώνουν σε συνθήκες μικρής ημέρας (Wilson et al., 1992).

Τα ένζυμα *GA20ox2* και *GA3ox1* καταλύουν το τελευταίο και προτελευταίο στάδιο της βιοσύνθεσης ενεργών γιββερελλινών στο *Arabidopsis*, αντίστοιχα (Hedden και Phillips, 2000). Η GA ομοιόσταση επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης που φαίνεται να συντονίζει τις δραστηριότητες του μεταβολισμού και της απόκρισης των γιββερελλινών. Έλλειψη γιββερελλίνης ή μετάλλαξη που παρεμποδίζει την GA μεταγωγή σήματος αυξάνει την έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων, όπως τα *GA20ox* και *GA3ox*, και μειώνει αυτή των γονιδίων καταβολισμού *GA2ox*. Πρόσφατα, η έκφραση των γονιδίων *GID1* στο *Arabidopsis* βρέθηκε να υπόκειται σε μηχανισμό ανατροφοδότησης. Μεταγραφικά επίπεδα των τριών *GID1* γονιδίων μειώνονται μετά από εφαρμογή GA (Griffiths et al., 2006). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως η GA επαγόμενη αποκοικοδόμηση των DELLA προηγείται της GA μείωσης των *GA3ox1* και *GA2ox2* mRNA επιπέδων (Zentella et al., 2007). Συνεπώς οι DELLA πρωτεΐνες όχι μόνο είναι καταστολείς της GA σηματοδότησης, αλλά επίσης ρυθμίζουν την GA ομοιόσταση με αύξηση της έκφρασης των GA βιοσυνθετικών γονιδίων και των GA γονιδίων υποδοχέων (Zentella et al., 2007).

Η έκφραση του *PIN1* στη ρίζα αυξάνεται απουσία GA και μειώνεται με την προσθήκη GA (Bjorn C. et al., 2011). Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε διάφορα είδη φυτών δείχνουν ότι οι γιββερελλίνες προωθούν την σωστή μεταφορά της αυξίνης. Δεδομένα φυσιολογικών παρατηρήσεων υποδηλώνουν αλληλοπαρεμβολή μεταξύ GA σηματοδότησης και μεταφοράς αυξίνης. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η εξασθενημένη μεταφοράς αυξίνης οδηγεί στην σταθεροποίηση του DELLA καταστολέα RGA στο *Arabidopsis* και ότι οι DELLA πρωτεΐνες καθυστερούν την ανάπτυξη της ρίζας σε απόκριση προς την απώλεια της προερχόμενης από τον βλαστό αυξίνης (Fu και Harberd, 2003). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η αυξίνη επάγει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων βιοσύνθεσης GA στο *Arabidopsis* (Frigerio et al., 2006), συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *GA20ox2*.

Συμπερασματικά μείωση των επιπέδων έκφρασης των τεσσάρων κυτταροπλασματικών *HSP90* γονιδίων υπό την καθοδήγηση του ιστοειδικού Rac2/ROP7 προαγωγέα προκαλεί δημιουργία ποικίλων φαινοτύπων στον αγωγό ιστό. Αυτό πιθανώς συμβαίνει εξαιτίας της εμπλοκής των *HSP90* στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των γιββερελλινών, το οποίο μεταξύ άλλων ρυθμίζει την ξυλογένεση, και συγκεκριμένα στο υποκοτύλιο έχει δειχθεί πως η γιββερελλίνη αποτελεί το προερχόμενο από το βλαστό σήμα το οποίο κατευθυνόμενο στην καμβιακή ζώνη του υποκοτυλίου ενεργοποιεί την επέκταση του ξύλου (Ragni et al., 2011). Βέβαια απαιτούνται περαιτέρω πειραματικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ακριβούς δράσης των *HSP90* στην εγκαθίδρυση και ανάπτυξη του αγωγού ιστού στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Agrawal N, Dasaradhi V.N, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar R.K and Mukheherjee S.K.** 2003. RNA Interference: Biology, mechanism and applications. *Microb. and Molec. Biology* 4, 657-685.
- **Agusti Javier, Raffael Lichtenberger, Martina Schwarz, Lilian Nehlin, Thomas Greb (2011).** Characterization of Transcriptome Remodeling during Cambium Formation Identifies MOL1 and RUL1 As Opposing Regulators of Secondary Growth. *PLoS Genet* 7(2): e1001312
- **Bagasra O & Prilliman K.R. (2004).** RNA interference: The molecular immune system. *Journal of Molecular Histology* 35: 545–553.
- **Baucher Marie, Mondher El Jaziri and Olivier Vandeputte. (2007).** From primary to secondary growth: origin and development of the vascular system. *Journal of Experimental Botany, Vol. 58, No. 13, pp. 3485–3501*
- **Beissinger M and Buchner J. 1998.** How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379, 245-259.
- **Bjorn C.Willige, Erika Isono, Rene´ Richter, Melina Zourelidou, and Claus Schwechheimer (2011).** Gibberellin Regulates PIN-FORMED Abundance and Is Required for Auxin Transport–Dependent Growth and Development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell, Vol. 23: 2184–2195*
- **Boston R. S, Viitanen P. V, Vierling E. 1996.** Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology* 32, 191-222.
- **Brembu T., Winge P. and Bones M. (2005).** The small GTPase AtRAC2/ROP7 is specifically expressed during late stages of xylem differentiation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany, Vol. 56, No. 419, pp. 2465-2476*
- **Buchner J. 1999.** Hsp90 & Co. - a holding for folding. *TIBS* 24: 136-141
- **Bukau B and Horwich A.L. 1998.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- **Carlsbecker A. and Helariutta Y. (2005).** Phloem and xylem specification of the puzzle emerge. *Plant Biology* 8:512-517.
- **Cendreau Emmanuel, Jan Traas, Thierry Demos, Olivier Crandjean, Michel Caboche, and Herman Hofte. (1997).** Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 11 4: 295-305
- **Chen Q, Osteryoung K, Vierling E. (1994).** A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes in vivo and in organelle. *J. Bio. Chem.* 269, 13216-13223.
- **Chengsong Zhao, Johanna C. Craig, H. Earl Petzold, Allan W. Dickerman, and Eric P. Beers (2005).** The Xylem and Phloem Transcriptomes from Secondary Tissues of the *Arabidopsis* Root-Hypocotyl. *Plant Physiology, Vol. 138, pp. 803–818*
- **Cloe´ Paul-Victor and Nick Rowe (2011).** Effect of mechanical perturbation on the biomechanics, primary growth and secondary tissue development of inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 107: 209–218



- **Craig E.A., Gambill B.D., Nelson R.J. 1993.** Heat shock proteins: Molecular chaperons of protein biogenesis. *Microbiological Rev.* 57: 402-414.
- **Dayan Jonathan, Maayan Schwarzkopf, Adi Avni and Roni Aloni (2010).** Enhancing plant growth and fiber production by silencing GA 2-oxidase. *Plant Biotechnology Journal* 8, pp. 425–435
- **Demura T. and Fukuda H.(2006).** Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in plant science* Vol.12, No.2, 64-70
- **Dettmer J., Elo A., Helariutta Y. (2008).** Hormone interactions during vascular development. *Plant Mol Biol*, 69:347–360.
- **Ellis R. J. (1999).** Molecular chaperones: Pathways and networks, *Current Biology*, 9:R137–R139
- **Ellis, R. J. (1996).** Stress proteins as molecular chaperones. In Van Eden, W. and Young, D.B. (eds), *Stress Proteins in Medicine. Marcel Decker*: 1–26.
- **Eudes A., Pollet B., Sibout R., Do C., Seguin A., Lapierre C. and Jouanin L. (2006).** Evidence of role of AtCAD1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*: 23-39.
- **Eva M. Sehr, Javier Agusti, Reinhard Lehner, Edward E. Farmer2, Martina Schwarz and Thomas Greb (2010).** Analysis of secondary growth in the *Arabidopsis* shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant Journal* 63, 811–822
- **Frydman J. (2001).** Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:603–647.
- **Haralampidis Kosmas, Milioni Dimitra, Rigas Stamatis, and Hatzopoulos Polydefkis. 2002.** Combinatorial Interaction of Cis Elements Specifies the Expression of the *Arabidopsis* AtHsp90-1 Gene1. *Plant Physiology*, Vol. 129, 1138–1149
- **Hardtke Christian S (2011).** Mobile Gibberellin Directly Stimulates *Arabidopsis* Hypocotyl Xylem Expansion. *The Plant Cell*, Vol. 23: 1322–1336
- **Harley M. S. Smith and Sarah Hake (2003).** The Interaction of Two Homeobox Genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, Regulates Internode Patterning in the *Arabidopsis* Inflorescence. *The Plant Cell*, Vol. 15, 1717–1727
- **Hedden Peter, and Miguel A. Blázquez (2006).** Transcriptional Regulation of Gibberellin Metabolism Genes by Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol. 142, pp. 553–563
- **Hendrick, J. and Hartl, F.U. (1993).** Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62, 349-384
- **Jakob Ursula, Gaestel Matthias, Engel Katrin, and Buchner Johannes. (1993).** Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 268, pp. 1517-152
- **Juan Pablo Matte Risopatron & Yuqiang Sun & Brian Joseph Jones (2010).** The vascular cambium: molecular control of cellular structure. *Protoplasma* 247:145–161
- **Kazuo Shinozaki,b,d,e and Masaru Ohme-Takagi (2007).** NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are Key Regulators of the Formation of Secondary Walls in Woody Tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 19: 270–280

- **Krishna P, Gloor G. (2001).** The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress and chaperones* 6, 238-246.
- **Liang P. and MacRae T. H. (1997).** Molecular chaperones and the cytoskeleton, *Journal of Cell Science* 110, 1431-1440
- **Lindquist S. and Craig E.A. (1988).** The heat shock proteins, *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-77
- **Martín Frigerio, David Alabadi, José Pérez-Goómez, Laura García-Cárcel, Andrew L. Phillips, Mathias Schuetz, Rebecca Smith and Brian Ellis (2012).** Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 1, pp. 11–31
- **Mayer M.P and Bukau B. (1999).** Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr. Biol.* 9, R322-R325.
- **Me´lanie Mauriat and Thomas Moritz\* (2009).** Analyses of GA20ox- and GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *The Plant Journal* 58, 989–1003
- **Mele G., Ori N., Sato Y. and Hake S.(2003).** The knotted1-like homeobox genes BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation metabolic pathways. *Genes and development*, 2088-2093.
- **Miernyk A. Jan. (1999).** Protein Folding in the Plant Cell, *Plant Physiology*, Vol. 121, pp. 695–703
- **Milioni Dimitra and Hatzopoulos Polydefkis. 1997.** Genomic organization of hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 35: 955–961
- **Morimoto. R.I. (1998).** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperons and negative regulators. *Genes and Development* 12: 3788-3796.
- **Nobutaka Mitsuda, Akira Iwase, Hiroyuki Yamamoto, Masato Yoshida, Motoaki Seki, Norma Fűbregas, Marta Ibapes, and Ana I. Capo-Delgado (2010).** A systems biology approach to dissect the contribution of brassinosteroid and auxin hormones to vascular patterning in the shoot of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 5:7, 903-906
- **Nover L, Scharf K.D, Gagliardi D, Vergne P, Czarnicka-Verner E and Gurley WB. (1996).** The Hsf world: Classification properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chap.1:* 215-223.
- **Nover L. (1991).** Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton (Fd).
- **P. Achard and P. Genschik(2008).** Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 4, pp. 1085–1092
- **Parsell D.A and Lindquist S. (1993).** The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
- **Picard D. (2002).** Heat shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1640-1648.
- **Pineau Christophe, Amandine Freydier, Philippe Ranocha, Alain Jauneau, Simon Turner, Gaetan Lemonnier, Jean-Pierre Renou, Petr Tarkowski, Goran Sandberg, Lise Jouanin, Bjorn Sundberg, Alain-Michel Boudet, Deborah Goffner and Magalie**

- Pichon (2005).** hca: an Arabidopsis mutant exhibiting unusual cambial activity and altered vascular patterning. *The Plant Journal* 44, 271–289
- **Prasinos Constantinos, Krampis Konstantinos, Samakovli Despina and Hatzopoulos Polydefkis. 2004.** Tight regulation of expression of two Arabidopsis cytosolic Hsp90 genes during embryo development. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, 633–644.
  - **Prasinos Constantinos, Haralampidis Kosmas, Milioni Dimitra, Samakovli Despina, Krambis Konstantinos, Hatzopoulos Polydefkis. 2008.** Complexity of Hsp90 in organelle targeting. *Plant Mol Biol*,
  - **Pratt W.B and Toft D.O. (2003).** Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery, *Experimental Biology and Medicine review*.
  - **Pratt WB, Krishna P, Olsen LJ. (2001).** Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci* 6:54–58
  - **Queitsch C, Sangster T.A and Lindquist S. (2002).** Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417, 618-624.
  - **Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E., and Lindquist, S. (2000).** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 479–492.
  - **Ragni Laura, Kaisa Nieminen, David Pacheco-Villalobos, Richard Sibout, Claus Schwechheimer, Lewin B. (2004).** Genes VIII. Published by Pearson Education Inc. Upper Saddle River, NJ 07458.
  - **Richter K. and Buchner, J. (2001).** Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.*, 188:281–290.
  - **Rogers A.L. and Campbell M. M. (2004 ).** The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist* 164: 17–30
  - **Ruiqin Zhong and Zheng-Hua Ye (2004).** *amphivasal vascular bundle 1*, a Gain-of-Function Mutation of the *IFL1/REV* Gene, Is Associated with Alterations in the Polarity of Leaves, Stems and Carpels. *Plant Cell Physiol.* 45(4): 369–385
  - **Rutherford S.L & Lindquist S. (1998).** Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-342.
  - **Saibil R. Helen (2008).** Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology*, 18:35–42
  - **Salathia N & Queitsch C. (2007).** Molecular mechanisms of canalization: Hsp90 and beyond. *J. Biosci.* 32: 457–463.
  - **Samakovli Despina, Thanou Aggeliki, Valmas Charalampos and Hatzopoulos Polydefkis. 2007.** Hsp90 canalizes developmental perturbation. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, 3513–3524
  - **Sangster T. A, Salathia N, Undurraga S, Milo R , Schellenberg K, Lindquist S & Queitsch C. (2008).** HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *PNAS* 105: 2963–2968
  - **Sangster T.A, Queitsch C. (2005).** The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current opinion in Plant Biology* 8, 86-92.
  - **Scheibel T, Siegmund HI, Jaenicke R, Ganz P, Lilie H, Buchner J. (1999).** The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1297–1302.

- **Schirmer E., Glover J., Singer M., Lindquist S. (1996).** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol 21, 289-296
- **Schoffl F, Prandl R, Reindl A. (1998).** Regulation of the heat shock response, *Plant Physiology* 117, 1135-1141.
- **Schoffl F, Prandl R. (1999).** Derepression of the heat shock protein synthesis in transgenic plants. In: Smallwood M, Calvert C, Bowles D, eds. Plant responses to environmental stress. *Oxford: Bios Scientific Publishers Limited* 65-73.
- **Scott J. Douglas, George Chuck, Ronald E. Dengler, Lakshmi Pelecanda, and C. Daniel Riggs (2002).** *KNAT1 and ERECTA Regulate Inflorescence Architecture in Arabidopsis.* *The Plant Cell*, Vol. 14, 547–558
- **Simon Bjo" rklund, Henrik Antti, Ida Uddestrand, Thomas Moritz and Bjo" rn Sundberg (2007).** Cross-talk between gibberellin and auxin in development of Populus wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *The Plant Journal* 52, 499–511
- **Tai-ping Sun (2008).** Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*
- **Tai-ping Sun (2011).** The Molecular Mechanism and Evolution of the GA–GID1–DELLA Signaling Module in Plants, *Current Biology* 21, R338–R345
- **Turner S. and Sieburth L.E. (2003).** Vascular Patterning. *The Arabidopsis Book*. 10.119/0073
- **Vale' rie Lefebvre, Marie-Noe" lle Fortabat, Aloi" se Ducamp, Helen M. North, Alessandra Maia-Grondard, Jacques Trouverie, Yann Boursiac, Gregory Mouille, Myle` ne Durand-Tardif (2011).** ESKIMO1 Disruption in Arabidopsis Alters Vascular Tissue and Impairs Water Transport. *PLoS ONE* 6(2): e16645
- **Veit B. (2009).** Hormone mediated regulation of the shoot apical Meristem. *Plant Mol Biol* 69:397-408.
- **Vierling E. (1991).** The roles of heat shock proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:579-620
- **Waddington C H. (1953)** Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7: 118–126.
- **Waddington C H. (1956)** Genetic assimilation of the bithorax phenotype. *Evolution* 10: 1–13.
- **Walter Michael, Christina Chaban, Katia Schu" tze, Oliver Batistic, Katrin Weckermann, Christian Na" ke2, Dragica Blazevic Christopher Grefen2, Karin Schumacher3, Claudia Oecking3, Klaus Harter2, and Jo" rg Kudla(2004).** Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* 40, 428–438
- **Wang Wangxia, Vinocur Basia, Shoseyov, Oded Altman Arie. (2004).** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, Vol.9 No.5
- **Waterhouse P.M, Wang M.B and Lough T. (2001).** Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- **Waters E, Lee G, Veirling E. (1996).** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Biol.* 47:325–338.

- **Yong Guo, Genji Qin, Hongya Gu, and Li-Jia Qu (2009).** Dof5.6/HCA2, a Dof Transcription Factor Gene, Regulates Interfascicular Cambium Formation and Vascular Tissue Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 21: 3518–3534
- **Young J. C, Moarefi I & Hartl F.U. (2001).** Hsp90 : a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* 154: 267-274.
- **Zentella Rodolfo, Zhong-Lin Zhang, Meheba Park, Stephen G. Thomas, Akira Endo, Kohji Murase, Christine M. Fleet, Yusuke Jikumaru, b Eiji Nambara, Yuji Kamiya, and Tai-ping Sun (2007).** Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 19: 3037–3057
- **Zhang Xiaodong, Beuron Fabienne and Freemont S. Paul (2002).** Machinery of protein folding and unfolding, *Current Opinion in Structural Biology*, 12:231–238
- **Zheng-Hua Ye (2002).** Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. 53:183–202
- **Zhongda Liu, Jeremy Duguay, Fengshan Ma, Tzann-Wei Wang, Ruth Tshin, Marianne T. Hopkins, Linda McNamara and John E. Thompson (2008).** Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 4, pp. 939–950
- **Αϊβαλάκης Γ., Καραμπουρνιώτης Γ., Φασσέας Κ. (2005).** Γενική Βοτανική. Αθήνα : Εκδόσεις Έμβρυο.
- **Δημοπούλου Α. (2011).** Εμπλοκή των HSP90 στην ανάπτυξη του βλαστού. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γ.Π.Α, Εργ. Μοριακής Βιολογίας
- **Μαργαριτοπούλου Θ. (2007).** Η κυτταρική τοποθέτηση της Hsp90. Πτυχιακή μελέτη. Γ.Π.Α, Εργ. Μοριακής Βιολογίας.
- **Μαργαριτοπούλου Θ. (2012).** Η δυναμική των HSP90 στον έλεγχο ανάπτυξης στα φυτά. Διδακτορική διατριβή. Γ.Π.Α, Εργ. Μοριακής Βιολογίας.
- **Φλεμετάκης Ε. και Κατινάκης Π. (2006).** Σημειώσεις στην τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA. Γ.Π.Α
- **Χαραλαμπίδης Κ.** Αναπτυξιακή Μοριακή Βιολογία Φυτών. Αθήνα : Εκδόσεις Έμβρυο.
- **Χατζόπουλος Π. (2004).** Βιοτεχνολογία φυτών. Αθήνα : Εκδόσεις Έμβρυο.