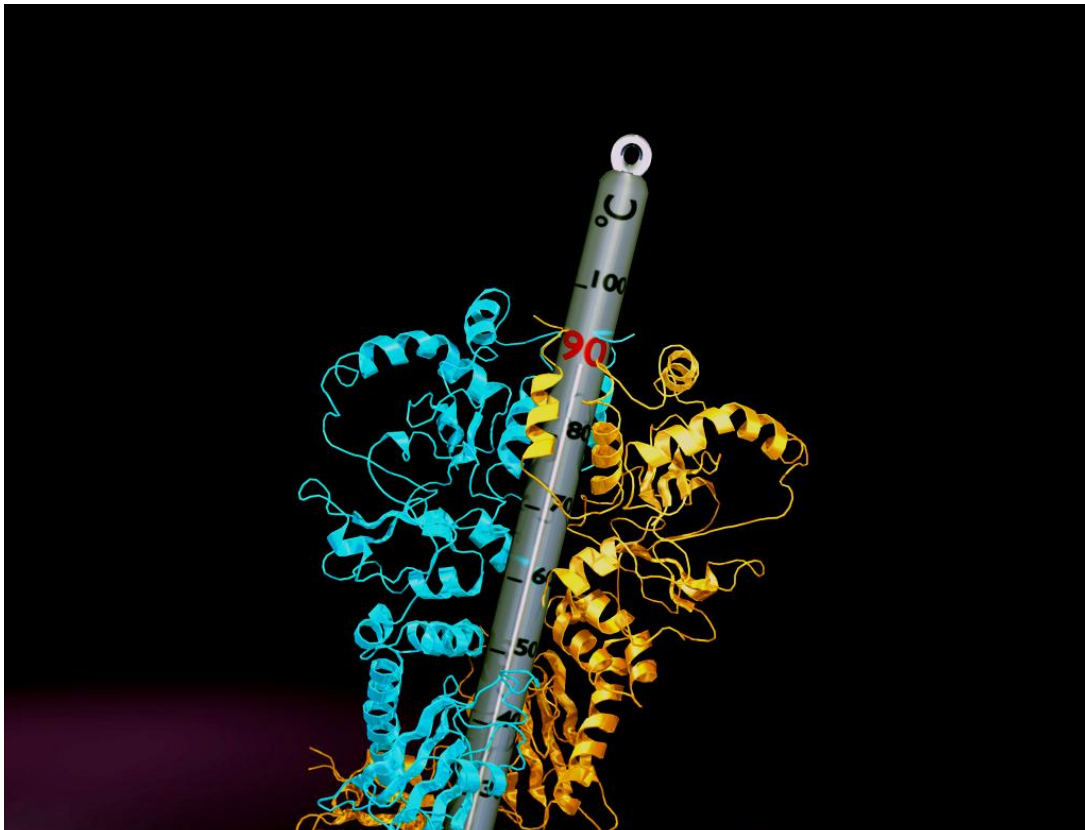


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ
ΛΥΡΙΩΤΑΚΗ
ΑΝΤΩΝΙΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ Hsp90 ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ
ΜΠΡΑΣΣΙΝΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ
ΓΙΒΒΕΡΕΛΛΙΝΩΝ.**

Αθήνα 2014

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ολοκλήρωση της φοίτησής μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα με τίτλο «Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές στη Γεωπονία». Με την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επικ. Καθηγήτρια Δήμητρα Μηλιώνη και τον διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλο για τα πολύτιμα σχόλια και τις συμβουλές που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας μου. Δε θα παραλείψω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για το περιβάλλον συναδελφικότητας και συντροφικότητας που αναπτύσσουν στο χώρο του Εργαστηρίου. Ευχαριστώ επίσης τις μεταδιδάκτορες Θεώνη Μαργαριτοπούλου και Δέσποινα Σαμακόβλη για την πολύτιμη βοήθεια τους από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα θέλω να ευχαριστήσω τη Θεώνη για τις πολύτιμες εμπειρίες που μου μετέδωσε σχετικά με τη μέθοδο Y2H, η οποία αποτέλεσε τη βασική μέθοδο για τη διερεύνηση του αντικειμένου της παρούσας εργασίας. Αξιοσημείωτη ήταν η βοήθεια που είχα και από τη Δέσποινα καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, το οποίο αποτέλεσε ένα μόνο κομμάτι από την ευρύτερη ερευνητική δουλειά της ίδιας. Συγκεκριμένα θέλω να την ευχαριστήσω για την καθοριστική συνεισφορά της σε ένα αρκετά δύσκολο πρωτόκολλο όπως είναι αυτό του SPLIT-GFP σε πρωτοπλάστες.

Από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσα να παραλείψω τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες και φίλες μου, Γιώτα Μέγκουλα και Κατερίνα Σκουφά, για την καθημερινή και αδιάκοπη συμπαράστασή τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του φιλικού και οικογενειακού μου περιβάλλοντος για την υπομονή και ανεκτικότητα που έδειξαν στις δύσκολες στιγμές. Χωρίς την ηθική τους υποστήριξη δε θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

Τέλος, ευχαριστίες οφείλω και στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για την υποτροφία που μου προσέφερε. Χωρίς την οικονομική βοήθεια από το ΙΚΥ δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Περίληψη

Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών είναι ευρέως διαδεδομένη από τους κατώτερους ευκαρυώτες μέχρι την κορυφή της ιεραρχίας, τον άνθρωπο. Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών είναι μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τόσο σε συνθήκες καταπόνησης όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες. Οι HSP90 πρωτεΐνες κατατάσσονται στην οικογένεια των μοριακών συνοδών και είναι υπεύθυνες τόσο για τη διατήρηση των λειτουργικών διαμορφώσεων των πρωτεϊνών-στόχων τους, όσο και για τη μεταφορά τους στα οργανίδια. Αυτό που τις ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα συστήματα μοριακών συνοδών είναι το γεγονός ότι συσχετίζονται με πρωτεΐνες-κλειδιά που είναι ικανές να επάγουν μονοπάτια ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των οργανισμών.

Ως μόρια σινιάλα, οι ορμόνες μεταφέρουν πληροφορίες από κύτταρο σε κύτταρο και οδηγούν ομάδες κυττάρων να υιοθετήσουν συγκεκριμένα αναπτυξιακά πρότυπα. Οι γιββερελλίνες (GA) είναι μια κατηγορία τετρακυκλικών διτερπενικών ορμονών οι οποίες ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, ενώ τα μπρασισινοστεροειδή (BR) είναι μια οικογένεια στεροειδών ορμονών, οι οποίες ανήκουν στην ομάδα των ενδογενών σημάτων και είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών και την οργανογένεση. Πιθανή είναι η από κοινού δράση των μονοπατιών των BR και GA ορμονών για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης.

Βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασισινοστεροειδών (BR) και γιββερελλινών (GA) ορμονών. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν σε πρωτεϊνικό επίπεδο οι αλληλεπιδράσεις των HSP90 πρωτεϊνών με βασικές πρωτεΐνες των μονοπατιών των BR και GA ορμονών. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης με το σύστημα SPLIT-GFP, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RGA. Ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα από το σύστημα yeast-2-hybrid έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν και με άλλα σημαντικά μόρια των μονοπατιών των BR και GA ορμονών. Τα αποτελέσματα των τεχνολογικών προσεγγίσεων των BiFC και yeast-2-hybrid αποτελούν μια ισχυρή ένδειξη για τον εξέχοντα ρόλο που διαδραματίζει το Hsp90 σύστημα στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μονοπατιών.

Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η εμπλοκή του Hsp90 συστήματος στον ομο-διμερισμό του υποδοχέα των μπρασισινοστεροειδών ορμονών (BRI1). Ο διμερισμός του υποδοχέα BRI1 είναι ένα κομβικό σημείο για τη μεταφορά ή μη των ορμονικών σινιάλων μέσα στο κύτταρο. Έτσι αποφασίστηκε να ελεγχθεί αν όντως το Hsp90 σύστημα εμπλέκεται στον ομο-διμερισμό του.

Abstract

The HSP90 protein family is widely spread among all organisms, from the lower eukaryotes until the top of the hierarchy, the humans. It is one of the largest groups of proteins in eukaryotes that appear both under normal conditions and under stressful ones. The HSP90 proteins are part of the molecular chaperons' family; they are responsible for preserving the operating modes of the target proteins, and for transporting them to other molecular structures. Due to the fact that they correlate with other key-proteins which are capable of inducing vital pathways concerning the growth of organisms, the HSP90 proteins stand out from the rest of the molecular chaperons.

All hormones can be characterized as signal molecules as they transfer information from cell to cell and lead to the adaptation of specific development standards from cell groups. The gibberellins (GA) are a group of tetracyclic diterpenoid hormones that regulate many developmental processes, whereas the brassinosteroids (BR) is a family of steroid hormones, which belong to the group of endogenous signals and are essential for plant growth and organogenesis. The joint action of the paths of BR and GA hormones in order to control cell growth is also a possibility.

This study aims to investigate the role that the Hsp90 proteins play in the signaling pathways of brassinosteroid (BR) and gibberellin (GA) hormones, and also in the interaction between them. In order to achieve that, it was considered appropriate to study the interactions between the HSP90 proteins and some key proteins of the BR and GA hormone pathways, at a protein level. After using the SPLIT-GFP system, the results showed that the HSP90.1 and HSP90.3 proteins do in fact interact with the RGA protein. In the mean time, the results of the yeast-2-hybrid system showed that the HSP90.1 and HSP90.3 proteins also interact with other molecules which are important for the BR and GA hormone pathways. These two technological approaches, both the BiFC and the yeast-2-hybrid system, strongly indicated the prominent role played by the Hsp90 protein system, in the interaction between these two pathways.

Finally, we investigated the involvement of the Hsp90 protein system in the homo-dimerization of the brassinosteroid hormone receptor (BRI1). The dimerization of the BRI1 receptor is crucial for the transportation of hormonal signals within the cell. Thus, it was decided to study whereas the Hsp90 protein system is indeed involved in its homo-dimerization.

Key words: proteins HSP90, protein interactions, gibberellin (GA) signaling pathway, brassinosteroid (BR) pathway

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	9
1. Μοριακοί Συνοδοί (Molecular Chaperons)	10
2. Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins).....	10
2.1 Ο ρόλος των HSP ως μοριακών συνοδών.....	13
2.1.1 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ – HSP100.....	14
2.1.2 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 – HSP90.....	15
2.1.3 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 – HSP70.....	16
2.1.4 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 - HSP60.....	17
2.1.5 Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (sHSPs)	17
2.2 Το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού	18
2.2.1 Δομή και λειτουργίες των HSP90 πρωτεϊνών	18
2.2.2 Ο ρόλος των HSP90 στην ανάπτυξη των οργανισμών	21
2.2.3 HSP90 πρωτεΐνες και φαινότυπος	25
3. Μοριακά σινιάλα στην ανάπτυξη των φυτών	28
3.1 Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των γιββερελλινών ορμονών (Gibberelins signaling network)	29
3.1.1 Οι υποδοχείς των GA ορμονών, GID1 (Gibberellin Insensitive Dwarf)	31
3.1.2 Οι πρωτεΐνες DELLA.....	33
3.1.3 Ο αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού των γιββερελλινών - SPINDLY (SPY)	36
3.2 Το μονοπάτι των μπρασινωστεροειδών ορμονών (Brassinosteroids pathway)	38
3.2.1 Οι υποδοχείς των BR ορμονών - BRI1 (Brassinosteroid Insensitive-1) και BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase-1)	40
3.2.2 Οι μεταγραφικοί παράγοντες του BR μονοπατιού – BZR1 (Brassinazole-Resistant-1) και BES1 (BRI1-EMS-Suppressor-1)	43
3.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων των μονοπατιών μεταγωγής σήματος BR και GA	45
Υλικά και Μέθοδοι	47
1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	48
1.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS.....	48
1.2 Καλλιέργεια σπορόφυτων <i>Nicotiana benthamiana</i> σε στερεό θρεπτικό μέσο	48
1.3 Θρεπτικά Διαλύματα Φυτών.....	49
2. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	49
2.1 <i>Escherichia coli</i>	49
2.1.1 Προετοιμασία “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων για μετασηματισμό	50

2.1.2 Μετασχηματισμός “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA	50
2.2 Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασχηματισμού (Transform efficiency)	51
2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
2.3.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> για μετασχηματισμό.....	51
2.3.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>Agrobacterium tumefaciens</i> με τη μέθοδο freeze-thaw.....	52
2.4 Διαλύματα καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων.....	52
2.5 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα.....	53
2.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με Αλκαλική Λύση	53
2.7 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	54
2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	55
2.9 Απομόνωση και Καθαρισμός Κλασμάτων DNA από Πηκτή Αγαρόζης.....	56
2.10 Ενοποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα	56
3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ (YEAST2HYBRID).....	57
3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	57
3.2 Διαλύματα καλλιέργειας κυττάρων ζύμης.....	58
4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - PCR	59
4.1 PCR αποικιών (colony PCR)	60
5. BiFC (BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION) - SPLIT GFP ΣΕ <i>Nicotiana Benthamiana</i> ...	61
5.1 Παροδική Έκφραση σε Φύλλα Καπνού	62
5.2 Απομόνωση πρωτοπλαστών	63
5.3 Πλασμιδιακοί φορείς (SPYNE – SPYCE vectors)	63
Αποτελέσματα.....	65
1. Μελέτη του ρόλου του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών και γιββερελλινών ορμονών	66
2. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών <i>in planta</i>	66
2.1 Δημιουργία κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών RGA και SPY με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 με το σύστημα SPLIT-GFP	67
2.2 Κλωνοποίηση των γονιδίων RGA και SPY στο φορέα pSPYNE.....	69
2.3 Αποτελέσματα SPLIT-GFP μεταξύ της πρωτεΐνης RGA και των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3	71
3. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης.....	76
3.1 Μετασχηματισμοί κυττάρων ζύμης <i>Saccharomyces cerevisiae</i> για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και πρωτεϊνών του μονοπατιού των GA ορμονών	77

3.2 Μετασχηματισμοί κυττάρων ζύμης <i>Saccharomyces cerevisiae</i> για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και πρωτεϊνών του μονοπατιού των BR ορμονών.....	81
4. Εμπλοκή των HSP90 στο διμερισμό του υποδοχέα των BR ορμονών, BRI1	84
4.1 Δημιουργία κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για τον έλεγχο της εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό του υποδοχέα BRI1 με το σύστημα SPLIT-GFP.....	85
4.2 Κλωνοποίηση των περιοχών BRI1a και BRI1b του γονιδίου <i>BRI1</i> στο φορέα pSPYCE	89
4.3 Αποτελέσματα SPLIT-GFP σε πρωτοπλάστες	91
Συζήτηση	95
1. Θεωρητικό υπόβαθρο δράσης του Hsp90 συστήματος.....	96
2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών και γιββερελλινών ορμονών	97
2.1 Οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κομβικά μόρια του μονοπατιού των GA ορμονών	97
2.2 Οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κομβικά μόρια του μονοπατιού των BR ορμονών	100
2.3 Ο ρόλος του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών (BR) και γιββερελλινών (GA) ορμονών.....	102
3. Θεωρητικό υπόβαθρο της λειτουργίας του υποδοχέα των BR ορμονών, BRI1	104
3.1 Ο ρόλος του HSP90 συστήματος στο διμερισμό του υποδοχέα των BR ορμονών, BRI1.....	106
Βιβλιογραφία	108
Παράρτημα.....	123

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μοριακοί Συνοδοί (Molecular Chaperons)

Οι πληροφορίες για την τελική τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών εμπεριέχονται μέσα στα γραμμικά πολυπεπίδια που συντίθενται από το mRNA στα ριβοσώματα. Η απόκτηση της τεταρτοταγούς δομής μπορεί να γίνεται χωρίς βοήθεια *in vitro*, όμως στα ζωντανά κύτταρα η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη. Προκειμένου τα κύτταρα να αποφύγουν τον κίνδυνο της συσσωμάτωσης και κατακρήμνισης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών τους, έχουν αναπτύξει ένα σύνθετο σύστημα μοριακών συνοδών, το οποίο βοηθά στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων καθώς αυτά βγαίνουν από το ριβόσωμα. Οι μοριακοί συνοδοί δεσμεύονται πάνω στα νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια, εμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους και σε μερικές περιπτώσεις βοηθούν ενεργά στην αναδίπλωσή τους (Morimoto, 1994; Young et al., 2004).

Ως **μοριακός συνοδός** χαρακτηρίζεται μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται και σταθεροποιεί μια πρωτεΐνη που διαφορετικά θα ήταν ασταθής, μέσω ελεγχόμενης δέσμευσης και αποδέσμευσης της πρωτεΐνης υποστρώματος (Liang & MacRae, 1997).

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

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

2. Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins)

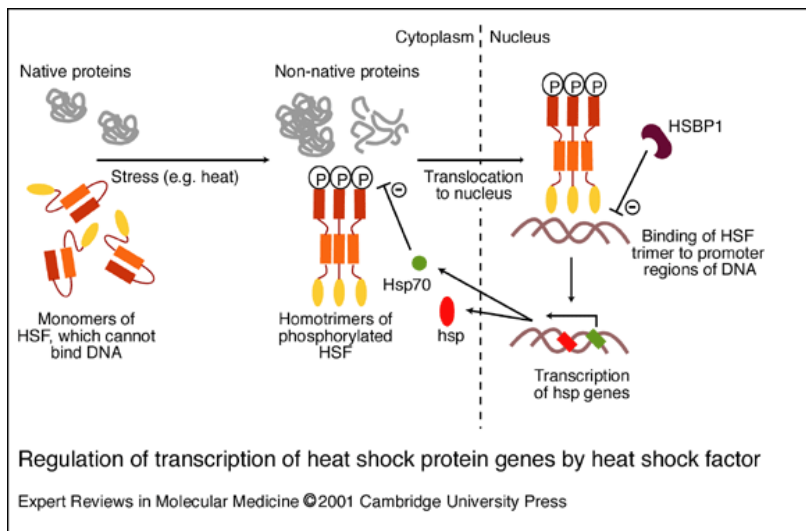
Όλοι οι οργανισμοί, είτε ευκαρυωτικοί είτε προκαρυωτικοί όταν βρίσκονται υπό συνθήκες πίεσεως αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής. Οι πιέσεις αυτές αφορούν τόσο αβιοτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η αύξηση της θερμοκρασίας, η υψηλή αλατότητα, η έλλειψη ύδατος και η παρουσία βαρέων μετάλλων όσο και βιοτικούς όπως μολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς. Από

αυτούς οι πιο σημαντικοί είναι οι αβιοτικοί παράγοντες διότι έχουν ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της δομής και την δυσλειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών (Wang et al., 2004).

Η σημαντικότερη περιβαλλοντική καταπόνηση που έχει περισσότερο μελετηθεί είναι οι αυξημένες θερμοκρασίες. Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε μια γρήγορη αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων και στη βιοσύνθεση μιας σειράς νέων πρωτεϊνών. Αυτή η αλλαγή επιτυγχάνεται, εν μέρει, με μια γενική αναστολή της μεταγραφής, ταυτόχρονα όμως παρατηρείται μια αύξηση στη σύνθεση μιας μικρής ομάδας πρωτεϊνών οι οποίες ονομάζονται «πρωτεΐνες θερμικού σοκ» (heat shock proteins, hsp) που όπως είναι ευρύτερα γνωστό ανήκουν στην ομάδα των «μοριακών συνοδών» (molecular chaperons) (Ellis R.J and S.M van der Vies, 1991). Η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών από τα κύτταρα έχει παρατηρηθεί όχι μόνο σε συνθήκες θερμικού σοκ αλλά και σε διάφορες άλλες συνθήκες καταπόνησης, όπως είναι η υποξία, η ανοξία και οι υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, οι οποίες δημιουργούν στρεσογόνες συνθήκες για τα κύτταρα και τους οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής κυτταρικής ομοιόστασης σε συνθήκες πίεσης παρεμποδίζοντας έτσι την καταστροφή του κυττάρου και σώζοντας τον οργανισμό από το θάνατο (Morimoto R.I, 1998). Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν εντοπιστεί μέλη της οικογένειας των hsp πρωτεϊνών έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες είτε εκφράζονται συνέχεια στα κύτταρα, είτε επάγονται έπειτα από την επίδραση κάποιου στρεσογόνου παράγοντα (Morimoto R.I, 1998). Βέβαια, αυτό δε σημαίνει ότι η μέγιστη παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών είναι και η ιδανικότερη για το κύτταρο και τον οργανισμό, αντίθετα η αλόγιστη παραγωγή τους μπορεί να γίνει τοξική. Έτσι, υπάρχει πάντα μια αυτορρύθμιση στους οργανισμούς για την παραγόμενη ποσότητα των πρωτεϊνών «πίεσης» (Kalmar B and Greensmith L, 2009).

Ένα άλλο δεδομένο που επιβεβαιώνει την άποψη ότι οι πρωτεΐνες αυτές συναντώνται κυρίως σε καταστάσεις στρες για να προστατέψουν τους οργανισμούς από το θάνατο είναι ότι η επαγωγή τους μετά το θερμικό σοκ είναι άμεση και ταχύτατη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του θερμικού σοκ διατάσσονται σε μια ανοικτή δομή χρωματίνης με υπερευαίσθητες θέσεις στο 5' άκρο. Με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ μπορούν να έχουν μια πλήρη επαγωγή σε μερικά μόνο λεπτά (Morimoto R.I, 1998). Όταν αναφερόμαστε σε κατάσταση θερμικού σοκ εννοούμε θερμοκρασίες οι οποίες είναι αυξημένες συγκριτικά με την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του οργανισμού. Οι οργανισμοί επάγουν τη σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών σε θερμοκρασίες που είναι ανώτερες από τη συνηθισμένη (Feder M and Hofmann G, 1999). Οι οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν τις hsp πρωτεΐνες αποκτούν μια ανθεκτικότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τις φυσιολογικές. Αυτή η θερμοανθεκτικότητα προστατεύει τους οργανισμούς από το θάνατο σε ένα αναπάντεχο θερμικό σοκ. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, αυτές οι πρωτεΐνες προσδίδουν ανθεκτικότητα στους οργανισμούς όχι μόνο στις υψηλές θερμοκρασίες αλλά και σε άλλες μορφές στρες όπως είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, αλάτων και αιθανόλης, η έλλειψη νερού κ.α.

Η ενεργοποίηση των hsp πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς γίνεται με τον εξής μηχανισμό: η RNA πολυμεράση στις κανονικές συνθήκες φαίνεται να είναι δεσμευμένη στα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του θερμικού σοκ, η επιμήκυνση όμως αναστέλλεται από έναν αρνητικό ρυθμιστικό μηχανισμό όχι πλήρως κατανοητό. Η ανάπτυξη του οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες εξουδετερώνει το μηχανισμό αναστολής και η μεταγραφή γίνεται κανονικά. Συγχρόνως, ένας προϋπάρχων μεταγραφικός ενεργοποιητής, ο οποίος ονομάζεται «παράγων θερμικού σοκ» (Heat Shock Factor, HSF) ενεργοποιείται προωθώντας εξαιρετικά μεγάλες ταχύτητες μεταγραφής. Η επαγωγή είναι εξαιρετικά γρήγορη και τα νέα μεταγραφήματα εμφανίζονται εντός λεπτού μετά το πρώτο επαγωγικό ερέθισμα (Pirkkala L et al., 2001). Οι HSFs λειτουργούν στην περιοχή του προαγωγέα των Hsp γονιδίων μέσω ενός καλά προσδιορισμένου και υψηλά συντηρημένου στοιχείου θερμικού σοκ (Heat Shock Element, HSE) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ρύθμιση της επαγωγής των hsp γονιδίων από τους θερμοεπαγόμενους παράγοντες HSF.

Ο HSF βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως ένα λανθάνον μονομερές μόριο το οποίο είναι ανίκανο να δεσμευτεί στο DNA. Υπό συνθήκες καταπόνησης, η ροή μη φυσιολογικών πρωτεϊνών (οι οποίες είναι μη λειτουργικές, επιρρεπείς στη δημιουργία συσσωματωμάτων, ευαίσθητες στις πρωτεάσες και συνδέονται με μόρια-συνοδούς) οδηγεί σε φωσφορυλίωση και τριμερισμό του HSF. Στη συνέχεια, τα τριμερή μετατοπίζονται στον πυρήνα και δεσμεύονται στον υποκινητή των hsp γονιδίων για να ακολουθήσει η μεταγραφή αυτών των γονιδίων. Η δράση του τριμερούς HSF ρυθμίζεται επίσης από τη συγκέντρωση τόσο των hsps (π.χ hsp70) όσο και της θερμοεπαγόμενης πρωτεΐνης δέσμευσης (heat shock binding protein 1, HSBP1) στον πυρήνα (Pirkkala L et al., 2001).

Οι πρωτεΐνες HSP συνήθως είναι οργανωμένες σε τσαπερόνια η ενεργοποίηση των οποίων απαιτεί κάποιο εξωτερικό ερέθισμα. Τα ερεθίσματα αυτά μπορεί να είναι : α) αλλαγές του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του περιβάλλοντος του κυττάρου, β) αλλαγές του επιπέδου συγκέντρωσης ορισμένων ιόντων, γ) παρουσία μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, δ) αναπτυξιακά σιγνάλα (για τις θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες που εκφράζονται στην κανονική ανάπτυξη του οργανισμού) (Walter S and Buchner J, 2002).

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες έχουν δύο μηχανισμούς προστασίας των κυττάρων. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, πρωτελύουν ή οδηγούν για πρωτεόλυση τις μη φυσιολογικές πρωτεΐνες, αν και έχει δειχθεί ότι σε μερικές περιπτώσεις έχουν την ικανότητα να επαναφέρουν κατεστραμμένες πρωτεΐνες στη λειτουργική τους μορφή (Parsell D.A and Lindquist S, 1993). Ο δεύτερος μηχανισμός στηρίζεται στο ρόλο τους ως μοριακοί συνοδοί. Οι πρωτεΐνες HSP έχουν τη δυνατότητα να προάγουν τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών εμποδίζοντας ταυτόχρονα την κατακρήμνιση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Ellis R.J and S.M van der Vies, 1991).

2.1 Ο ρόλος των HSP ως μοριακών συνοδών

Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 20 διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών με την ιδιότητα του μοριακού συνοδού, οι οποίες είναι συντηρημένες σε όλο το σύνολο των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Μείζονος σημασίας αποτελούν οι οικογένειες μοριακών συνοδών που επάγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης και κυρίως θερμικής καταπόνησης. Ονομάζονται «θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες» (HSPs) και είναι υπεύθυνες τόσο για τη διατήρηση των ανωτέρων δομών άλλων πρωτεϊνών, όσο και για τη σωστή διαμόρφωσή τους κατά τη βιοσύνθεσή και τη μεταφορά τους στα οργανίδια (Camberg J.L et al., 2013). Η δράση τους ως μοριακοί συνοδοί οφείλεται στην ικανότητα τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών οι οποίες, είτε κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσής τους, είτε λόγω άλλων παραγόντων, βρίσκονται εκτεθειμένες (Ellis and S.M van der Vies, 1991).

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

Όσον αφορά την κυτταρική τοποθέτηση των HSP τσαπερονίνων, φαίνεται ότι τοποθετούνται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου όπως στο πυρήνα, το μιτοχόνδριο, το

χλωροπλάστη και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Wang et al., 2004). Ο πίνακας 1 δείχνει αναλυτικά που βρίσκεται κάθε HSP οικογένεια και ποιές διεργασίες επιτελεί.

Οικογένεια (Μοριακό Βάρος)	Κυτταρική τοποθέτηση	Κύριες λειτουργίες
Hsp100 (100 KDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο και κυτταρόπλασμα	Αποτρέπει τη συσσώρευση πρωτεϊνών και την λανθασμένη αναδίπλωση
Hsp90 (90 KDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα	Διευκολύνει την ωρίμανση μορίων σινάλιων
Hsp70 (70 KDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα	Αποτρέπουν την συσσωμάτωση, βοηθούν στην αναδίπλωση, μετακίνηση πρωτεϊνών
Hsp60 (60 KDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο και κυτταρόπλασμα	Αποτρέπουν τη συσσωμάτωση, βοηθούν στην αναδίπλωση, μετακίνηση πρωτεϊνών
Hsp40 (40 KDa)	Κυτταρόπλασμα	Συν-τσαπερόνιο της Hsp70
Small Hsp	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο, κυτταρόπλασμα	Αποτρέπει τη συσσώρευση και σταθεροποιεί τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των Hsps με βάση το μοριακό τους βάρος.

2.1.1 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ – HSP100

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των μελών αυτής της οικογένειας είναι η παρουσία δύο συντηρημένων περιοχών μεγέθους 200 περίπου αμινοξέων οι οποίες περιβάλλουν μια θέση δέσμευσης για το ATP. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 78 και 100 KDa, ανάλογα με το μέγεθος του τμήματος που συνδέει τις συντηρημένες περιοχές καθώς και των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων τους (Nover and Scharf, 1997). Τα μέλη της οικογένειας HSP100 απαντώνται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα υποκυτταρικά οργανίδια του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και των φυτών που έχουν μελετηθεί, ενώ ομόλογά τους δεν έχουν βρεθεί στη *Drosophila*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής σχηματίζουν δακτυλιοειδή-εξαμερή, αποτελούν μοριακούς συνοδούς και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί ότι αντικαθιστούν το σύστημα των HSP70/HSP40 πρωτεϊνών (Wickner et al., 1994).

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

2.1.2 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 – HSP90

Πρόκειται για μία πολύ συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών, με παρόμοια δομή και με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 80kDa μέχρι και 90kDa. Η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών αποτελείται από αρκετά μέλη (ανάλογα τον οργανισμό), τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικοί ρυθμιστές της αύξησης και της ανάπτυξης και γι' αυτό είναι μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ακόμα και σε συνθήκες απουσίας παράγοντα καταπόνησης. Όμως, ακόμα και σε συνθήκες καταπόνησης όλα τα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν στο ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα του οργανισμού (Sangster et al., 2004).

Οι αντιδράσεις σε ποικίλους στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες έχει παρατηρηθεί ότι είναι κοινές σε μια πληθώρα οργανισμών, η οποία εκτείνεται από τα αρχαιοβακτήρια έως τον άνθρωπο. Ακόμα, είναι γνωστό ότι η ομολογία αυτών των πρωτεϊνών μεταξύ των ευκαρυωτών οργανισμών είναι αυξημένη όπως είναι και μεταξύ των προκαρυωτών. Το ποσοστό της ομολογίας μεταξύ ευκαρυωτών και προκαρυωτών αγγίζει το 50%. Τα παραπάνω στοιχεία συνηγορούν στην άποψη ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες αυτές έχουν μια αρκετά συντηρημένη ακολουθία που παρουσιάζεται μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων οργανισμών.

Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες HSP70, η οικογένεια των HSP90 δεν εμπλέκεται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών στα αρχικά τους στάδια (Nathan et al., 1997). Οι HSP90 διακρίνονται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες-συνοδούς γιατί τα περισσότερα υποστρώματά τους είναι πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, όπως είναι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών και οι πρωτεΐνες τύπου κινασών (Picard et al., 1990; Xu and Lindquist, 1993). Οι HSP90 είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της δραστηριότητας πολλών πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή των σημάτων μεταξύ των κυττάρων. Σε μοριακό επίπεδο, οι HSP90 προσδένονται σε πρωτεΐνες που βρίσκονται σε ένα προχωρημένο στάδιο της αναδίπλωσής τους και είναι έτοιμες για ενεργοποίηση ή αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες (Jakob et al., 1995). Εκτελώντας το ρόλο τους, οι HSP90 λειτουργούν ως μέρος ενός μηχανισμού πολύ-τσαπερονίου (multichaperone) στο κυτταρόπλασμα, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες HSP70, ισομεράσες (peptidyl-prolyl isomerases) και άλλα τσαπερόνια (cochaperones) (Freeman et al., 1996).

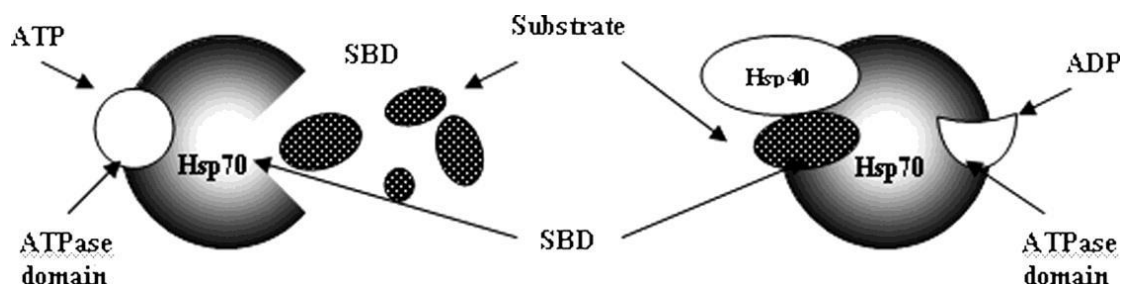
2.1.3 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 – HSP70

Η ομάδα πρωτεϊνών θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 70 KDa είναι από τις πλέον σημαντικές ομάδες πρωτεϊνών θερμικού σοκ στους περισσότερους οργανισμούς. Μέλη της οικογένειας HSP70 έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς και θεωρούνται από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες στη φύση. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών αποτελούν πολυγονιδιακές οικογένειες των οποίων τα διάφορα μέλη εκφράζονται είτε σε φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε συνθήκες στρες (Tang et al., 2000; Wu et al., 2001).

Οι HSP70 περιλαμβάνουν δύο διακριτές περιοχές, μια πολύ συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή 450 περίπου αμινοξέων στην οποία υπάρχει μια θέση δέσμευσης για ATP και έχει ασθενή ενεργότητα ATPάσης και μια λιγότερο συντηρημένη καρβόξυ-τελική περιοχή μέσω της οποίας οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματά τους. Μερικές από τις HSP70 μπορεί να έχουν στα άκρα τους αλληλουχίες σύνδεσης με τα μιτοχόνδρια ή το ενδοπλασματικό δίκτυο (Schlesinger M.J, 1990).

Οι πρωτεΐνες που συγκροτούν την ομάδα αυτή βρίσκονται πρακτικά σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα. Έτσι, διακριτές πρωτεΐνες θερμικού σοκ εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες των φυτών και στον πυρήνα. Άλλες από τις πρωτεΐνες αυτές είναι αποκλειστικά συστατικά του οργανιδίου του πυρήνα, ενώ άλλες κατανέμονται μεταξύ οργανιδίων και κυτταροπλάσματος. Στις λειτουργίες των HSP70 πρωτεϊνών συμπεριλαμβάνονται η παρεμπόδιση συσσωμάτωσης πρωτεϊνών, η μεταφορά των πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα, η συγκρότηση των ριβοσωμάτων και η βοήθεια στο σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών. Επομένως, δρουν και ως «μοριακοί συνοδοί» σε ποικίλες διαδικασίες όπως είναι η μετάφραση, η μετατόπιση, το δίπλωμα και ο ποιοτικός έλεγχος κάτω από φυσιολογικές και στρεσογόνες συνθήκες (Becker and Craig, 1994; Schlesinger M.J, 1990).

Όταν η HSP70 δεσμεύει ATP, προσδέεται και αποδεσμεύεται από τα υποστρώματα με μεγάλη ταχύτητα. Αντίθετα, όταν στη θέση του ATP είναι δεσμευμένο ADP οι αντιδράσεις είναι αργές (Εικόνα 2). Η ανακύκλωση μεταξύ των δύο καταστάσεων ρυθμίζεται από δύο άλλες πρωτεΐνες, τις Hsp40 (DnaJ) και GrpE (Lewin B. 2004).



Εικόνα 2. Η δέσμευση του υποστρώματος από την πρωτεΐνη HSP70 εξαρτάται από τα ATP/ADP.

Η δέσμευση του ATP στην πρωτεΐνη (αριστερά) μειώνει τη συγγενεία της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος (substrate binding domain's, SBD's) με το υπόστρωμα, οδηγώντας την πρωτεΐνη σε απελευθέρωσή του υποστρώματος. Ενώ όταν υπάρχει δέσμευση του ADP στην πρωτεΐνη (δεξιά) η δέσμευση του υποστρώματος διατηρείται. Η ύπαρξη υποστρώματος και πρωτεΐνης HSP40 διεγείρει την υδρόλυση του ATP ενεργοποιώντας την SBD (Brierley-Hobson S, 2008).

2.1.4 Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 - HSP60

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει δύο ομάδες μορίων: Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες GroEL/GroES (HSP60/HSP10), οι οποίες απαντώνται στα βακτήρια και στα κυτταρικά οργανίδια των θηλαστικών. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις TRiC/CCT πρωτεΐνες οι οποίες απαντώνται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών οργανισμών και εμπλέκονται στις διαδικασίες αναδίπλωσης πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη και η τουμπουλίνη. Οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας απαντώνται με τη μορφή συμπλόκων ομοπολυμερών και παρουσιάζουν ενεργότητα ATPάσης, η οποία είναι απαραίτητη για τη δράση τους ως μοριακοί συνοδοί (Nover and Scharf, 1997).

2.1.5 Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (sHSPs)

Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 15-40 KDa. Μέλη αυτής της οικογένειας έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί, από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο (de Jong et al., 1998).

Το βασικό χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των μελών της οικογένειας αυτής είναι η ύπαρξη μιας περιοχής μήκους 100 περίπου αμινοξέων στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους, η οποία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την α-κρυσταλλίνη, αν και υπάρχουν ορισμένα μέλη της οικογένειας στα οποία απουσιάζει τελείως αυτή η περιοχή (Orlandi et al., 1996; Praekelt and Meacock, 1990). Η ομολογία των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών με την α-κρυσταλλίνη αποτελούσε για αρκετά χρόνια αίνιγμα για τους ερευνητές, μέχρι που ανακαλύφθηκε ότι η σύνθεση της κρυσταλλίνης επάγεται από τι θερμικό στρες και από άλλους παράγοντες που επάγουν τη σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Klemenz et al., 1985).

Όλες οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής απαντώνται με τη μορφή πολυμερών. Τα πολυμερή αυτά συγκροτούνται από 9-40 μονομερή, ανάλογα με τον οργανισμό και έχουν μοριακό βάρος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 149 και 800 KDa. Το ακραίο καρβόξυ-τελικό τμήμα των sHSPs φαίνεται να είναι σημαντικό για τη δράση τους ως μοριακοί συνοδοί καθώς μεταλλαγμένες μορφές που στερούνται της περιοχής αυτής παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα. Ο ρόλος του αμινο-τελικού τμήματος των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι ξεκάθαρος αλλά πιστεύεται ότι συμμετέχει στο σχηματισμό πολυμερών και στη δέσμευση των υδρόφοβων περιοχών πρωτεϊνών που δεν έχουν την κανονική τους διαμόρφωση (Smulders et al., 1998).

2.2 Το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού

Οι HSP90 πρωτεΐνες απαντώνται σε πολύ μεγάλη αφθονία στα κύτταρα των οργανισμών, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, καθώς αποτελούν το 1-2% των συνολικών διαλυτών κυτταρικών πρωτεϊνών (Lai et al 1984). Στους περισσότερους, αν όχι σε όλους, τους οργανισμούς και κυτταρικούς τύπους, οι HSP90 βρίσκονται σε εξαιρετική αφθονία και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, με την επαγωγή τους να μην ξεπερνά σε αύξηση μερικές τάξεις μεγέθους. Έχει εκτιμηθεί ότι οι HSP90 αποτελούν περίπου το 1% του πρωτεώματος μη καταπονημένων κυττάρων, το οποίο τις κατατάσσει μέσα στις πιο άφθονες πρωτεΐνες των οργανισμών (Lai et al 1984).

Οι HSP90 πρωτεΐνες είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ φυλογενετικά απομακρυσμένων οργανισμών όπως τα θηλαστικά, οι ζύμες, η *Drosophila*, τα βακτήρια και τα φυτά. Σε επίπεδο αμινοξέων το ποσοστό ομοιότητας είναι της τάξης του 70% μεταξύ των ευκαρυωτικών μελών και της τάξης του 40% μεταξύ του προκαρυωτικού μέλους και των αντίστοιχων ευκαρυωτικών. Γονίδια των Hsp90 έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά όπως η τομάτα, το καλαμπόκι, η ελαιοκράμβη, η σίκαλη, το *Catharanthus* και η *Arabidopsis*. Συγκρίσεις μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών των φυτικών HSP90 και ακολουθιών προερχόμενων από ομόλογα ζύμης ή ζώων, έδειξαν ομοιότητες που κυμαίνονταν μεταξύ 63-71%, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων φυτικών HSP90 ανέδειξαν 88-93% ομοιότητα (Krishna and Gloor, 2001).

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η πολυγονιδιακή οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά μέλη. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει: α) Τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη (Hsp90.1, Hsp90.2, Hsp90.3 και Hsp90.4) τα οποία παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας της τάξης του 85% σε αμινοξικό επίπεδο, β) ένα χλωροπλαστικό (Hsp90-5), γ) ένα μιτοχονδριακό (Hsp90-6) και δ) ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Hsp90-7).

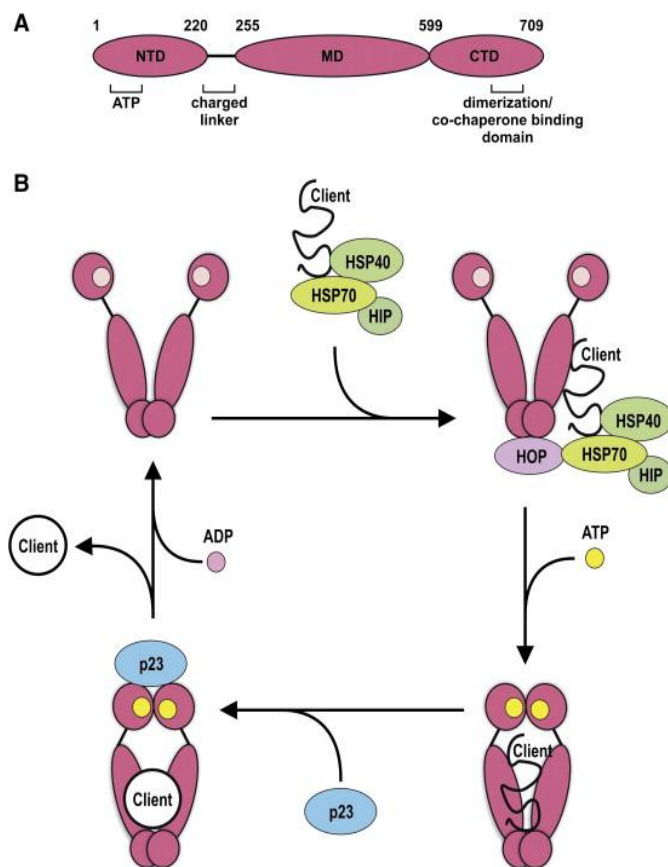
Παρ' όλα αυτά όμως, οι HSP90 θεωρούνται ένα άκρως εξειδικευμένο σύστημα μοριακών συνοδών. Αυτό που τις ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα συστήματα είναι το γεγονός ότι συσχετίζονται με πρωτεΐνες-κλειδιά που είναι ικανές να επάγουν μονοπάτια ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των οργανισμών. Το εύρος των πρωτεϊνών-στόχων των HSP90 περιλαμβάνει υποδοχείς στεροειδών ορμονών, πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια μετάδοσης μηνυμάτων και αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες (Calderwood et al., 2006).

2.2.1 Δομή και λειτουργίες των HSP90 πρωτεϊνών

Η HSP90 αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: μια υψηλά συντηρημένη αμινοτελική περιοχή με ενεργότητα ATPάσης, μια ενδιάμεση περιοχή και μια καρβοξυτελική περιοχή διμερισμού (Εικόνα 3Α) (Caplan, 1999; Pearl and Prodromou, 2000; Centenera M.M et al., 2013).

Το αμινοτελικό άκρο, εκτός από την ενεργότητα ATPάσης και την ανταγωνιστική δέσμευση αντιβιοτικών, έχει συνδεθεί και με τη δέσμευση άλλων υποστρωμάτων (Prodromou et al., 1997; Young J.C

et al., 1997). Η αμινοτελική περιοχή συνδέεται με το υπόλοιπο της πρωτεΐνης μέσω μιας ισχυρά φορτισμένης και ευαίσθητης σε πρωτεάσες περιοχή, η οποία ποικίλλει σε μέγεθος και σύσταση ανάμεσα στα διάφορα είδη, αλλά και ανάμεσα στις διαφορετικές ισομορφές του ίδιου είδους. Η καρβοξυτελική περιοχή που έχει μέγεθος περίπου 12 kDa, περιέχει στο άκρο της το πενταπεπτίδιο MEEVD, που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με βοηθητικά συνοδά μόρια που έχουν TPR μοτίβα, όπως η HOP (Εικόνα 3B) (Chen and Smith, 1998; Chen et al., 1998; Young et al., 1998).



Εικόνα 3. Η δομή της πρωτεΐνης HSP90 και ο κύκλος της ΑΤΡάσης.

A. Σχηματικό διάγραμμα της δομής της πρωτεΐνης HSP90. Η αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain, NTD) είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του ATP και για τη σύνδεση της με την ενδιάμεση περιοχή (Middle domain, MD) μέσω μιας ισχυρά φορτισμένης περιοχής (charged linker). Η καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal domain, CTD) είναι απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό του μορίου καθώς και για την πρόσδεση συγκεκριμένων βοηθητικών συνοδών μορίων (co-chaperons). Η HSP90 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες –πελάτες μέσα από τις MD και CTD περιοχές.

B. Στην «ανοιχτή» διαμόρφωση της πρωτεΐνης όπου έχει δεσμευτεί το ADP, η HSP90 κατά προτίμηση δεσμεύεται από το HOP, ένα βοηθητικό συνοδό μόριο το οποίο μεταφέρει μερικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στην HSP90 μέσω του Hsp70/40/HIP συμπλόκου. Όταν η HSP90 περάσει στο στάδιο δέσμευση του ATP απελευθερώνει τα βοηθητικά συνοδά μόρια και οδηγείται στην «κλειστή» διαμόρφωση της. Η πρόσδεση του p23 σταθεροποιεί την HSP90 στη δομή που απαιτείται για τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης –πελάτη. Αφού απελευθερωθεί η πρωτεΐνη-πελάτης η HSP90 παίρνει πάλι την αρχική της διαμόρφωση, όντας διαθέσιμη για τον επόμενο κύκλο (Centenera M.M et al., 2013).

Οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι HSP90, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα βοηθητικά συνοδά μόρια (cochaperones) και στα υποστρώματα (clients). Τα βοηθητικά συνοδά μόρια μπορεί να περιέχουν TPR μοτίβα (Scheufler et al., 2000) και να αλληλεπιδρούν με την HSP90 σε μία από τις δύο χαρακτηρισμένες θέσεις δέσμευσης με TPR περιοχές. Οι πρωτεΐνες-υποστρώματα ποικίλλουν και μπορεί να είναι κινάσες, όπως οι Raf (Grammatikakis et al., 1999), μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών και η p53 (Whitesell et al., 1998) και τέλος ένζυμα ή συστατικά του

κυτταροσκελετού (Zuehlke A and Johnson J.L, 2010). Τα βοηθητικά συνοδά μόρια φαίνεται να ανταγωνίζονται τόσο για την HSP90 όσο και για τα υποστρώματα, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα (Zuehlke A and Johnson J.L, 2010).

Η διάσπαση του ATP από την HSP90 εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδρασή της με βοηθητικά συνοδά μόρια (co-chaperones), ένα φαινόμενο που παρατηρείται κυρίως στους ευκαρυώτες. Με αυτόν τον τρόπο τα βοηθητικά συνοδά μόρια καθορίζουν τη διαμόρφωση της HSP90, ενώ παράλληλα καθορίζουν και τις αλληλεπιδράσεις της HSP90 με τα υποστρώματά της. Παράδειγμα συνοδού μορίου που ενεργοποιεί την ενεργότητα ATPάσης της HSP90 είναι η πρωτεΐνη AHA1, ενώ άλλοι παράγοντες, όπως η p50, η Hop και η p23, την μπλοκάρουν (Krukenberg et al., 2011). Η αμινοτελική περιοχή της AHA1 αλληλεπιδρά με την ενδιάμεση περιοχή της HSP90 (Meyer et al., 2004), ενώ δεν λείπουν οι αλληλεπιδράσεις της AHA1 και με τις αμινοτελικές περιοχές του ομοδιμερισμένου HSP90 (Retzlaff et al. 2010). Σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία φιλτραρίσματος από gel (gel filtration chromatography) φάνηκε ότι η AHA1 ανταγωνίζεται την Hop και την p23 στην πρόσδεσή τους με την HSP90 (Harst et al., 2005). Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι η AHA1 μπορεί να αντικαθιστά την Hop στα πρώιμα σύμπλοκα με την HSP90, ενώ παράλληλα μπορεί να αντικαθιστά την p23 στα ύστερα σύμπλοκα με την ίδια πρωτεΐνη, ενεργοποιώντας την ενεργότητα ATPάσης, με αποτέλεσμα να συνεχίζεται ο κύκλος της HSP90 (Krukenberg et al. 2011).

Η ώριμη λειτουργική HSP90 πρωτεΐνη είναι ένα διμερές, το οποίο δημιουργείται από την σύνδεση των καρβόξυ-τελικών άκρων των δυο HSP90 πολυπεπτιδίων σχηματίζοντας έτσι ένα επίμηκες μόριο. Τα αμινοτελικά άκρα βρίσκονται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Εικάζεται ότι η θερμική καταπόνηση προκαλεί την προσέγγιση των αμινο-τελικών άκρων με αποτέλεσμα την δημιουργία τριγωνικών δομών. (Buchner J, 1999).

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι HSP90 υπάρχουν κυρίως με την μορφή διμερών μορίων, με την περιοχή του διμερισμού να τοποθετείται στα 200 καρβόξυ-τελικά (C-terminal) κατάλοιπα. Ένα μεταλλαγμένο μόριο πρωτεΐνης HSP90 στο οποίο είχε αφαιρεθεί το καρβόξυ-τελικό του άκρο και δεν μπορούσε να διμεριστεί ήταν ανίκανο να σώσει το στέλεχος της ζύμης στο οποίο είχαν αφαιρεθεί και τα δύο HSP90 γονίδια (Minami Y et al., 1994). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι ο διμερισμός του μορίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιολογική δράση του μορίου. Η παρατήρηση της εγγενούς κατάστασης των HSP90 πρωτεϊνών σε πηκτή ηλεκτροφόρησης χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (nondenaturing) έδειξε ότι η HSP90 υπάρχει ως μονομερές, διμερές και ως μια σύνθεση υψηλού μοριακού βάρους σε παρασκευάσματα από φύλλα σπανακιού, σπορόφυτα *B. parvus* και φυτό σιταριού, με την μονομερή μορφή της να κυριαρχεί (Krishna P et al., 1997).

2.2.2 Ο ρόλος των HSP90 στην ανάπτυξη των οργανισμών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες, αν και θερμοεπαγόμενες, είναι από τις πλέον άφθονες πρωτεΐνες στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες και φτάνουν το 1-2% των συνολικών πρωτεϊνών (Buchner, 1999; Morimoto, 1998). Αυτή η αφθονία καθώς και το γεγονός ότι στους περισσότερους οργανισμούς είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητά τους, υποδηλώνουν το σημαντικό βιολογικό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών. Οι HSP90 πρωτεΐνες εμπλέκονται στην ωρίμανση και στη διατήρηση της ορθής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών-στόχων, οι οποίες δυσκολεύονται να αποκτήσουν τη σωστή στερεοδιαμόρφωση. Σε κανονικές συνθήκες οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με πλήθος ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών όπως κινάσες, καλμοντουλίνη, ακτίνη, σωληνίνη, υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Η απουσία των HSP90 πρωτεϊνών οδηγεί σε μη λειτουργικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών, αλλά ακόμα και στο θάνατο του οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες (Miloni D and Hantzopoulos P, 1997).

Τα τσαπερόνια των HSP90 πρωτεϊνών είναι απαραίτητα για την εύρυθμη λειτουργία μιας ποικιλίας βασικών ρυθμιστών της αύξησης, της ανάπτυξης και της άμυνας των οργανισμών (Sangster T.A and Queitsch C, 2005; Picard D, 2002). Η HSP90 πρωτεΐνη βρίσκεται στην τομή μεταξύ της ανάπτυξης του οργανισμού και της περιβαλλοντικής απόκρισης. Ποικίλες αναφορές στη βιβλιογραφία παραθέτουν ότι η HSP90 πρωτεΐνη είναι ικανή να ρυθμίζει το φαινοτυπικό πρότυπο των οργανισμών. Η ικανότητα της ρύθμισης μειώνεται κάτω από συνθήκες στρες, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται φαινοτυπικές αποκλίσεις στους οργανισμούς, οι οποίες κάτω από κανονικές συνθήκες ανάπτυξης δεν παρουσιάζονταν (Queitsch C et al., 2002; Rutherford S.L and Lindquist S, 1998; Sangster T.A et al., 2004). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι υψηλής ειδίκευσης HSP90 αναστολείς εκκρίνονται από μερικούς μύκητες και βακτήρια στα φυσικά περιβάλλοντα και δυνητικά επηρεάζουν τη ρυθμιστική ικανότητα των HSP90 στους γύρω οργανισμούς (McLellan C.A et al., 2007).

Η HSP90 πρωτεΐνη στο *Escherichia coli*

Η ομόλογη πρωτεΐνη στο *E. Coli* ονομάζεται htpG. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες, αλλά η έκφρασή της επάγεται περισσότερο έπειτα από θερμικό σοκ ή έκθεση του κυττάρου σε στρεσογόνες συνθήκες. Η έλλειψη του γονιδίου δεν επηρεάζει την ανάπτυξη σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά προκαλεί ελάχιστη πτώση της ταχύτητας ανάπτυξης σε υψηλές θερμοκρασίες (Mason C.A et al., 1999).

Η HSP90 πρωτεΐνη στο *Saccharomyces cerevisiae*

Στο απλοειδές γένωμα του *S. cerevisiae* υπάρχουν δύο γονίδια σε αυτήν την οικογένεια: το *HSC82* που εκφράζεται συνεχώς και το *HSP82* που έχει χαμηλό επίπεδο έκφρασης σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ μετά από θερμικό σοκ η έκφρασή του αυξάνεται κατά 10-15 φορές.

Σε αντίθεση με το *E.coli* που η παρουσία της HSP90 πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση, στο *S. cerevisiae* τα διπλά μεταλλάγματα είναι θανατηφόρα. Μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια είναι βιώσιμες και παρουσιάζουν πολύ ενδιαφέροντες φαινοτύπους (Nathan et al., 1997).

Η HSP90 πρωτεΐνη στη *Drosophila melanogaster*

Στη *D. melanogaster* έχει απομονωθεί ένα μόνο γονίδιο *HSP83*. Το γονίδιο *hsp83* είναι ένα από τα δύο θερμοεπαγόμενα γονίδια της *D. melanogaster* και των εντόμων γενικότερα, το οποίο περιέχει παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες (introns) (Hackett R.W and Lis J.T, 1983; Holmgren R et al., 1981). Από μελέτες στη *D. melanogaster* έχουν προκύψει δύο πολύ ενδιαφέρουσες θεωρίες σχετικά με τις λειτουργίες των πρωτεϊνών της οικογένειας HSP90. Οι ομόζυγες μεταλλάξεις του *hsp83* γονιδίου στη *Drosophila* είναι θνησιγόνες, έτσι μεταλλάξεις του διατηρούνται μόνο σε ετερόζυγη κατάσταση. Μεταλλάξεις του γονιδίου σε ετερόλογη κατάσταση προκαλούν ποικίλες μορφολογικές ανωμαλίες στα έντομα. Γενετική ανάλυση έδειξε ότι αυτά τα μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να κληρονομηθούν (Rutherford and Lindquist, 1998).

Η δεύτερη σημαντική ανακάλυψη σχετίζεται με ένα στέλεχος της *D. melanogaster* που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τη νόσο του Πάρκινσον. Όπως και στους ανθρώπους, η *D. melanogaster* χάνει νευρώνες όταν εκφραστεί η α -συνουκλείνη (α -synuclein), μία πρωτεΐνη που ενέχεται στην έναρξη της ασθένειας και στα δύο είδη. Οι Bonini και Auluck χορήγησαν μέσω της τροφής στις μύγες το αντιβιοτικό γελνταναμυκίνη και είδαν ότι αν και κανονικά μέσα σε 20 μέρες οι μύγες θα έπρεπε να έχουν χάσει το 50% των ντοπαμινεργικών νευρώνων τους, ο αριθμός των νευρώνων παρέμενε φυσιολογικός (Auluck P.K and Bonini N.M, 2002; Auluck P.K et al., 2002).

Η HSP90 πρωτεΐνη στους ζωικούς οργανισμούς και τον άνθρωπο

Η HSP90 πρωτεΐνη είναι μια από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες σε μη στρεσαρισμένα κύτταρα και επιτελεί βασικές λειτουργίες για την αύξηση και ανάπτυξη του οργανισμού όπως είναι η σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η διακίνησή τους μέσα στο κύτταρο. Η HSP90 πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, αλλά έχει επίσης βρεθεί να τοποθετείται στον εξωκυττάριο και στον ενδοπυρηνικό χώρο. Σημαντικό παράδειγμα της πυρηνικής τοποθέτησης της HSP90 πρωτεΐνης, στα ζωικά συστήματα, αποτελεί το σύστημα των μοριακών συνοδών HSP90/HSC70. Το σύστημα αυτό έχει μελετηθεί πολύ αναλυτικά στη διαδικασία ωρίμανσης των υποδοχέων στεροειδών ορμονών των ζωικών οργανισμών

με έμφαση στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και στον υποδοχέα της προγεστερόνης των θηλαστικών. Σε αυτό το μονοπάτι, η HSC70 δρα στο αρχικό στάδιο προσδεδεμένη στη θέση δέσμευσης της ορμόνης, ενώ η HSP90 λειτουργεί στο τελικό στάδιο, επιτρέποντας στον υποδοχέα να δεσμεύσει το υπόστρωμά του (Pratt W.B and Toft D.O, 2003; Riggs D.L et al., 2003). Το σύστημα μοριακών συνοδών HSC70/HSP90 μπορεί ακόμα, με τη βοήθεια συγκεκριμένων βοηθητικών συνοδών μορίων, να οδηγήσει ορισμένες πρωτεΐνες σε υποκυτταρικά οργανίδια ή στο πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση (Cyr D.M et al., 2002; Hohfeld J et al., 2001; Young J.C et al., 2003). Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες συντίθενται ως πρόδρομα πολυπεπτίδια στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως μεταφέρονται μέσα στο οργανίδιο (Truscott K.N et al., 2003). Στα θηλαστικά, οι HSC70/HSP90 βρέθηκαν να σταθεροποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης όσο οι τελευταίες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, αλλά και να μεσολαβούν στη μεταφορά τους στον υποδοχέα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, TOM70. Τόσο στα θηλαστικά όσο και στη ζύμη ο υποδοχέας TOM70 αναγνωρίζει τα συνοδά μόρια και το πρόδρομο πολυπεπτίδιο που μεταφέρουν και τα προσδένει με τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά των πολυπεπτιδίων στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου (Young J.C et al., 2003). Τόσο η HSC70 όσο και η HSP90 συνδέονται και με την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Μια πρωτεΐνη που πρέπει να αποικοδομηθεί, επισημαίνεται μέσω κατάλληλου μηχανισμού με πολυμερή ουμπικουιλίνης, που αποτελούν το σήμα για τη μεταφορά της στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Αυτό το σύστημα είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με λανθασμένη διαμόρφωση, αλλά και για την καταστροφή σωστά διαμορφωμένων πρωτεϊνών σε μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία (Glickman M.H and Ciechanover A, 2002).

Στον άνθρωπο, εκτός από το κυτταρόπλασμα, όπου η HSP90 βρίσκεται σε δύο ισομορφές, ομόλογες πρωτεΐνες υπάρχουν και σε υποκυτταρικά οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (Grp94/Grp96) (Sorger P.K and Pelham H.R, 1987) και τα μιτοχόνδρια (Trap1 ή Hsp75) (Felts et al., 2000). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το τσαπερόνιο της HSP90 εμπλέκεται στη διαδικασία σταθεροποίηση και ωρίμανσης πολλών σηματοδοτών πρωτεϊνών, οι οποίες απορρυθμίζονται στους καρκίνους. Παρεμπόδιση των HSP90 πρωτεϊνών προκάλεσε αποικοδόμηση των πρωτεϊνών-πελατών στο πρωτεάσωμα και οδήγησε σε ισχυρή δράση κατά των όγκων. Συγκεκριμένα, οι HSP90 μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του καρκίνου καθώς έχουν την ιδιότητα να συμπλοκοποιούνται με τις ογκοπρωτεΐνες προσφέροντας ταυτόχρονα μια θέση υψηλής συγγένειας σε φάρμακα-καταστολείς τα οποία συσσωρεύονται στα καρκινικά κύτταρα (Kamal A et al., 2004).

Η HSP90 πρωτεΐνη στους φυτικούς οργανισμούς

Τα μέλη της οικογένειας των προκαρυωτικών HSP90 πρωτεϊνών, HtpG, εμφανίζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κυττάρου, η έκφρασή τους όμως αυξάνεται δραματικά σε συνθήκες θερμικού σοκ ή από άλλους παράγοντες καταπόνησης (Mason C.A et al., 1999). Αντίθετα, η

έκφραση των HSP90 είναι συνεχής και υψηλή σε κύτταρα θηλαστικών και αυξάνεται ελάχιστα υπό την επίδραση παραγόντων καταπόνησης (Buchner J, 1999). Η έκφραση των HSP90 στα φυτικά κύτταρα ρυθμίζεται αναπτυξιακά (Koning A.J et al., 1992; Marrs K.A et al., 1993; Krishna P et al., 1995) και ενεργοποιείται από το στρες των χαμηλών θερμοκρασιών (Krishna P et al., 1995) και τις μεταβάσεις από το φως στο σκοτάδι (Felsheim R.F and Das A, 1992). Χειρισμός των φυτών με το ρυθμιστή ανάπτυξης 24-epibrassinolide (brassinosteroid) οδήγησε σε αύξηση τόσο τον αριθμό των μεταγραφημάτων όσο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Wilens R.W et al., 1995; Dhaubhadel S et al., 1999).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας HSP90 που έχουν απομονωθεί στο φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι επτά. Οι επτά αυτές πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες βάση της ανάλυσης που έγινε στο αμινοτελικό τους άκρο. Έτσι έχουμε τα κυτταροπλασματικά μέλη, τα οποία αποτελούνται από τις HSP90.1, HSP90.2, HSP90.3, HSP90.4 και τα οργανιδιακά μέλη, τα οποία αποτελούνται από τις HSP90.5, HSP90.6 και HSP90.7. Οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες αποτελούνται από λίγα ιντρόνια, ενώ οι οργανιδιακές αποτελούνται από 18-19 ιντρόνια. Η ανάλυση στην ακολουθία αυτών των πρωτεϊνών έδειξε ότι υπάρχει υψηλή ομολογία, η οποία φτάνει το 85% σε αμινοξικό επίπεδο, μεταξύ των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, ενώ η αναλογία μεταξύ των οργανιδιακών πρωτεϊνών εμφανίζεται μειωμένη σε ποσοστό 45%. Η έκφραση των γονιδίων *HSP90* είναι μειωμένη σε κανονικές θερμοκρασίες αλλά αυξάνεται αισθητά σε συνθήκες θερμικού σοκ. Μια παρόμοια αύξηση στην έκφραση αυτών των πρωτεϊνών παρατηρείται και σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης αρσενικού (Milionis D and Hatzopoulos P, 1997).

Μια σύγκριση της λειτουργικής ικανότητας στα μέλη των HSP90 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* αποκάλυψε την παρουσία μιας ATP εξαρτώμενης περιοχής δέσμησης σε όλα τα μέλη. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η φυτική HSP90 πρωτεΐνη μπορεί να δεσμεύσει τον ανθρώπινο παράγοντα p23 και ότι η δέσμηση αυτή μπορεί να ανασταλεί από την τζελνταμικίνη με θερμο-εξαρτώμενο τρόπο (Owens-Grillo G.K et al., 1996). Η ύπαρξη της θερμο-εξαρτώμενης θέσης δέσμησης της τζελνταμικίνης στις φυτικές HSP90 πρωτεΐνες μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των μικρών διαφορών που υπάρχουν στις θέσεις δέσμησης του ATP μεταξύ των φυτικών και ζωικών HSP90 πρωτεϊνών (Cadepond F et al., 1994).

Μελέτη της έκφρασης των *HSP90* γονιδίων υπέδειξε ότι ορισμένα μέλη εκφράζονται μόνο κάτω από συνθήκες καταπόνησης (θερμική καταπόνηση, επίδραση με βαρέα μέταλλα κλπ.) (Milionis D and Hatzopoulos P, 1997). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι η έκφραση των *HSP90* μπορεί να ρυθμίζεται και αναπτυξιακά. Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι έκφραση των *HSP90* έχει ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Marrs K.A et al., 1993), κατά το φύτευμα σπόρου (Reddy R et al., 1998), στις μεριστωματικές ζώνες βλαστού και ρίζας (Koning A.J et al., 1992), στα άνθη (Krishna P et al., 1995) και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της γύρης (Haralampidis K et al., 2002).

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έχουν βρεθεί 4 κυτταροπλασματικές ισομορφές της HSP90 και από μία σε ενδοπλασματικό δίκτυο, μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες (Krishna P and Gloor G, 2001). Μεταγραφήματα από την AtHsp90-1 υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να ανιχνευθούν μόνο στις ρίζες του *Arabidopsis thaliana*, έπειτα όμως από θερμικό σοκ ή από χειρισμό με βαρέα μέταλλα τα μεταγραφήματα αυτά εντοπίζονται σε αφθονία σε όλα τα όργανα του φυτού. Τα μεταγραφήματα των AtHsp90-2 και AtHsp90-3 μπορούν να ανιχνευθούν σε όλα τα όργανα του φυτού αλλά σε αφθονία βρίσκονται μόνο στις ρίζες και τα άνθη (Yabe N et al., 1994). Τα επίπεδα των μεταγραφημάτων AtHsp90-2 και AtHsp90-3 αυξάνονται ελάχιστα έπειτα από θερμικό σοκ αλλά η αύξησή τους γίνεται σημαντική έπειτα από χειρισμό των φυτών με ινδολοξικό οξύ (indoleacetic acid), μια από τις σημαντικότερες ενδογενείς ορμόνες, 0.1M χλωριούχο νάτριο ή βαρέα μέταλλα. Ανάλυση της έκφρασης των μεταγραφημάτων AtHsp90-5 και AtHsp90-6 έδειξε ότι τα πρώτα αυξάνονται ελαφρώς, ενώ τα δεύτερα αυξάνονται ελάχιστα από το θερμικό σοκ.

Είναι ήδη γνωστό ότι οι τέσσερις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες είναι παρόμοιες μεταξύ τους αν και οι τρεις από αυτές έχουν την υψηλότερη ομολογία στην αμινοξιδελική ακολουθία και τη δομή των γονιδίων (Milionis D and Hatzopoulos P, 1997). Ως εκ τούτου, η επικάλυψη των λειτουργιών είναι πιθανή. Δεδομένου ότι υπάρχουν τέσσερα *Hsp90* γονίδια, κάθε μετάλλαξη σε ένα από αυτά τα γονίδια δεν επιφέρει θανατηφόρο φαινότυπο, όπως γίνεται σε άλλους οργανισμούς που περιέχουν ένα μόνο γονίδιο (Rutherford S.L and Lindquist S, 1998). Εάν αυτή η επικάλυψη στην έκφραση ή τη λειτουργία ήταν πλήρης, μια μετάλλαξη σε οποιοδήποτε μέλος της οικογένειας των κυτταροπλασματικών HSP90 πρωτεϊνών δε θα ήταν κατ' ανάγκη αισθητή. Ωστόσο, μεταλλάξεις σε ένα μεμονωμένο μέλος των κυτταροπλασματικών HSP90 πρωτεϊνών προσδίδουν ευαισθησία στο φυτό σε παθογόνους οργανισμούς (Hubert D.A et al., 2003; Takahashi A et al., 2003).

Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα οι HSP90 πρωτεΐνες είναι καθοριστικοί παράγοντες στη μορφογένεση και τον τρόπο δημιουργίας του εμβρύου (Samakoni D et al., 2007), όπως έχει ήδη παρατηρηθεί στη *Drosophilla melanogaster* και το *Zebra fish* (Ding D et al., 1993; Krone P.H et al., 2003).

2.2.3 HSP90 πρωτεΐνες και φαινότυπος

Στη φύση, ένας οργανισμός αγρίου-τύπου που αναπτύσσεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, λόγω της έμφυτης γενετικής του παραλλακτικότητας, έχει την ικανότητα να παράγει φαινοτύπους που να μην επηρεάζονται από περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές. Παρόλα αυτά όμως, κατά την πορεία της εξελικτικής διαδικασίας των οργανισμών, έρχονται στο φως φαινότυποι που αποκλίνουν αρκετά από το φαινοτυπικό μέσο όρο του κάθε οργανισμού. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, οι ποικιλομορφίες των μορφολογιών και των λειτουργιών αποτυπώνονται στις γενετικές διαφορές μεταξύ ατόμων και πληθυσμών. Όμως, οι φαινότυποι των ειδών πρέπει γενικά να είναι ελαστικοί στη γενετική ποικιλότητα

και την περιβαλλοντική αλλαγή και γι' αυτό απαιτούν ρυθμιστικά συστήματα για την εξασφάλιση κανονικής ανάπτυξης (Queitsch C et al, 2002). Τα συστήματα αυτά επηρεάζονται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις που λαμβάνουν χώρα με αποτέλεσμα να αποκαλύπτουν γενετικές ποικιλομορφίες.

Πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν ότι το HSP90 τσαπερόνιο λειτουργεί ως ρυθμιστής της γενετικής ποικιλομορφίας στη *Drosophila melanogaster*. Κατά τη δυσλειτουργία της HSP90 φαίνεται να εκφράζεται μία κρυφή γενετική ποικιλομορφία περισσότερο από ότι φυσιολογικά (Rutherford S.L και Lindquist S, 1998). Όμως, πρόσφατες έρευνες από την Specchia και τους συναδέλφους της έδειξαν ότι λειτουργικές μεταβολές της HSP90 πρωτεΐνης στη *Drosophila melanogaster* επηρεάζουν τον μηχανισμό αποσιώπησης του ριRNA (μικρά RNAs που η λειτουργία τους εξειδικεύεται στη γαμετική σειρά) οδηγώντας στην ενεργοποίηση μεταθετών στοιχείων και στην επαγωγή μορφολογικών μεταλλάξεων. Αυτό υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις των HSP90 πρωτεϊνών μπορούν να δημιουργήσουν νέα ποικιλομορφία χαρακτηριστικών μέσω της αυξημένης δράσης των μεταθετών στοιχείων, τα οποία επάγουν τις «κανονικές» μεταλλάξεις (Specchia V et al., 2010).

Πολλά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών λειτουργιών και επηρεάζουν πολλές πτυχές της μορφογένεσης των οργανισμών σε μεγάλο αριθμό σταδίων. Η παρατήρηση ενός πλήρως αυτογονιμοποιούμενου πληθυσμού, όπως είναι το φυτό *Arabidopsis thaliana*, δείχνει ότι παρόλο που τα άτομα του πληθυσμού είναι ισογονικά μεταξύ τους, παρουσιάζουν διαφορές που κυμαίνονται σε ένα φυσιολογικό και αναμενόμενο εύρος. Τα όρια που θέτονται στην εμφάνιση των φαινοτύπων αυτών εξαρτώνται από τη λειτουργία του HSP90 συστήματος μοριακού συνοδού. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στην άποψη ότι το HSP90 σύστημα μοριακού συνοδού είναι υπεύθυνο όχι μόνο για τη διατήρηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας των οργανισμών αλλά και για την εμφάνιση νέων φαινοτύπων με ιδιαίτερα ή τροποποιημένα χαρακτηριστικά (Samakovli D et al., 2007). Συγκεκριμένα στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, οι μεταβολές στο φαινότυπο υποδεικνύουν το ρόλο των HSP90 στην ομαλή ανάπτυξη του φυτού μέσω της «καναλοποίησης» (canalization) (Rutherford S.L and Lindquist S, 1998) όσο και στην αντοχή του οργανισμού έναντι ασθενειών (Sangster T.A and Queitsch C, 2005).

Ο όρος «canalization» χρησιμοποιήθηκε από τον Waddington το 1953 για να περιγράψει το φαινόμενο της κυριαρχίας συγκεκριμένων φαινοτύπων έναντι άλλων στον οργανισμό αγρίου τύπου. Ωστόσο η ικανότητα σταθεροποίησης των χαρακτηριστικών μπορεί να διαταραχθεί από διάφορους περιβαλλοντικούς, γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες δημιουργώντας ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων το οποίο παρεκκλίνει του «κανονικού». (Waddington D.H, 1953, 1956; McLaren A, 1999). Στην προσπάθειά του ο Waddington να εξηγήσει την προφανή κληρονομηση των χαρακτηριστικών αυτών, που παρουσιάστηκαν αρχικά λόγω περιβαλλοντικών διαταράξεων, πρότεινε την παρακάτω υπόθεση. Τα χαρακτηριστικά που εμφανίζονται κάτω από ειδικές συνθήκες βρίσκονται υπό διαρκή έλεγχο εναντίον των

ποικίλων περιβαλλοντικών διαταραχών και εσωτερικών γενετικών πολυμορφισμών και κυμαίνονται σε ανεκτά επίπεδα για τον οργανισμό. Η υπόθεση αυτή ονομάστηκε «καναλοποίηση» (canalization). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η «καναλοποίηση» μέσω της φυσικής επιλογής σταθεροποιεί τους φαινότυπους και μειώνει την ποικιλομορφία τους. Η κατάσταση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της έκφρασης αρκετών χαρακτηριστικών, κατορθώνοντας έτσι η καναλοποίηση να διατηρεί τις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης για τον οργανισμό παρ' όλες τις περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές. Όταν όμως διαταράσσεται η ρυθμιστική ικανότητα των οργανισμών λόγω ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών, τότε μπορεί να αλλοιωθεί ο «καναλοποιημένος» φαινότυπος και να αποκαλυφθούν φαινότυποι που δεν εμφανίζονταν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα χαρακτηριστικά που αποκαλύπτονται είναι κληρονομήσιμα και αφομοιώνονται γενετικά ακόμα και όταν δεν υπάρχει γενετική βάση πίσω από την εμφάνισή τους (Waddington D.H, 1953, 1956; Sato K και Siomi H, 2010). Σύμφωνα με την έρευνα των Rutherford και Lindquist το τσαπερόνιο των HSP90 φαίνεται να αποτελεί πιθανό μοριακό μηχανισμό για το φαινόμενο του «canalization» αλλά και της γενετικής αφομοίωσης καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως ρυθμίζει περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές. Αυτό συμβαίνει διότι όπως έχει ήδη αναφερθεί οι HSP90 πρωτεΐνες εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια στην ανάπτυξη των οργανισμών, αφού συμμετέχουν στην ωρίμανση και την σταθεροποίηση πολλών ασταθών πρωτεϊνών, όπως κινάσες και ρυθμιστικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν πολλά και διάφορα βιολογικά συστήματα (Picard D, 2002).

Μεταλλάγματα των κυτταροπλασματικών *Hsp90* γονιδίων (*AtHsp90.1-4*) του φυτού *Arabidopsis thaliana* έδωσαν ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Ο πολυμορφισμός που χαρακτηρίζει τα μεταλλάγματα αυτά έδωσε και άλλες πληροφορίες εκτός από την ανάμιξη των HSP90 πρωτεϊνών στην αναπτυξιακή πλαστικότητα. Το φαινόμενο της απόκλισης των φαινοτύπων που παρουσιάζεται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των μεταλλαγμάτων είναι στοχαστικό, δηλαδή είναι το αποτέλεσμα τυχαίων διαδικασιών (Yarchuk O et al., 1992). Οι στοχαστικοί μηχανισμοί είναι ικανοί να επιφέρουν αλλαγές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με σινιάλα και μονοπάτια των διαδικασιών ανάπτυξης. Οι HSP90 πρωτεΐνες στην περίπτωση αυτή θέτουν τα όρια μεταξύ των οποίων κυμαίνεται ο φαινότυπος. Όταν επέλθει μείωση των επιπέδων των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, τότε τα όρια καταργούνται/ελαστικοποιούνται και ενεργοποιούνται οι στοχαστικοί μηχανισμοί δημιουργώντας την φαινοτυπική ποικιλομορφία. Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο *Arabidopsis thaliana* και στη *Drosophila melanogaster* έχουν δείξει ότι όταν αλλοιωθεί η έκφραση των *HSP90* γονιδίων, είτε με φαρμακολογική καταστολή είτε με μετάλλαξη, τότε παρατηρείται διεύρυνση του εύρους των ορίων αυτών σε βαθμό που μπορεί να προκαλέσει ακόμα και το θάνατο του οργανισμού (Samakovli D et al., 2007).

Συνοψίζοντας, γίνεται φανερό ότι το σύστημα των HSP90 μοριακών συνοδών επηρεάζει την πιθανότητα με την οποία ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό θα μπορούσε να εμφανιστεί, με αποτέλεσμα

την αύξηση ή τη μείωση του πολυμορφισμού ενός οργανισμού. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι οι HSP90 ρυθμίζουν την πλαστικότητα, ενώ η μείωση τους δίνει τη δυνατότητα στους οργανισμούς να εξελίσουν διαφορετικές φαινοτυπικές μορφές. Τέλος, είναι πλέον προφανές, ότι οι HSP90 πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των αναπτυξιακών μονοπατιών, εξασφαλίζοντας την πλαστικότητα των φαινοτύπων μέσα από την επαγωγή ή καταστολή των στοχαστικών μηχανισμών.

3. Μοριακά σινιάλα στην ανάπτυξη των φυτών

Γνωρίζουμε ότι οι φυτικοί οργανισμοί συγκριτικά με τους ζωικούς δεν έχουν ευκαιρίες επιλογής του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται και ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο. Αυτό έχει ως φυσικό επακόλουθο και την έλλειψη δυνατοτήτων εύρεσης νέων πηγών ενέργειας. Έτσι, το φυτό είναι υποχρεωμένο να ακολουθήσει το καλύτερο δυνατό αναπτυξιακό πρόγραμμα ώστε να μπορέσει να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο. Η ανάγκη αυτή οδήγησε τους φυτικούς οργανισμούς στην ανάπτυξη και τελειοποίηση των μηχανισμών ανίχνευσης και των μονοπατιών μεταγωγής σήματος (signaling transduction pathways), ώστε να είναι ικανοί να ανταπεξέλθουν σε τυχόν διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών. Οι φυτικές ορμόνες παίζουν καθοριστικό ρόλο σε αυτό καθώς ρυθμίζουν πολλές, αν όχι όλες, τις αναπτυξιακές και προσαρμοστικές αποκρίσεις των φυτών (Jaillais Y and Chory J, 2010; Alabadi D et al., 2009).

Οι φυτορμόνες (phytohormones) αναγνωρίστηκαν αρχικά ως ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από τα φυτά. Δρουν εξειδικευμένα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (10^{-6} - 10^{-8} M), επάγοντας την έκφραση γονιδίων, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν μια πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών. Από τότε που ανακαλύφθηκαν οι πρώτες φυτορμόνες (αυξίνες) τη δεκαετία του 1930, οι επιστήμονες ανά τον κόσμο επιδόθηκαν σε μια ατέλειωτη αναζήτηση για την εύρεση παρόμοιων μορίων. Οι πέντε πιο «κλασικές» ομάδες φυτορμονών είναι οι αυξίνες (auxins), οι γιββερελλίνες (gibberellins), οι κυτοκινίνες (cytokinins), το αψισικό οξύ (abscisic acid) και το αιθυλένιο (ethylene) (Vernoux T and Benfey P.N, 2005). Οι φυτορμόνες δεν απαντώνται μέσα στο φυτό σε ελεύθερη μορφή, αλλά σχηματίζουν συνήθως σύμπλοκα με σάκχαρα ή αμιδικές ομάδες. Κατ' αυτόν τον τρόπο, λοιπόν, η συγκέντρωση της δραστικής μορφής της ορμόνης δεν εξαρτάται μόνο από το ρυθμό βιοσύνθεσης και αποικοδόμησής της, αλλά και από το ισοζύγιο της διαθέσιμης συγκέντρωσης ελεύθερης και συζευγμένης μορφής (Jaillais Y and Chory J, 2010).

Εκτός από τις πέντε «κλασικές» κατηγορίες φυτοορμονών, σήμερα είναι γνωστές και τέσσερις άλλες ομάδες μορίων, οι οποίες δρουν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των φυτικών ιστών και οργάνων. Αυτές είναι τα οκταδεκανοειδή-γιασμονικά (octacanooids-jasmonates), ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες (oligosaccharides), τα μπρασινωστεροειδή (brassinosteroids) και οι πεπτιδικές ορμόνες (peptide hormones). Ο βιοχημικός, γενετικός και φυσιολογικός χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών έχει

αποδείξει ότι πληρούν όλες τις προϋποθέσεις προκειμένου να ενταχθούν στη γενικότερη κατηγορία των φυτοορμονών (Χαραλαμπίδης Κ, 2009).

Οι φυτορμόνες έχουν την ικανότητα να συνδέονται σε εξειδικευμένους υποδοχείς και να μεταφέρονται από ένα σημείο του φυτού σε άλλο. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους αποτελεί το γεγονός ότι δεν υφίστανται καμία χημική τροποποίηση κατά τη διάρκεια της δράσης τους. Οι φυτορμόνες δηλαδή δρουν ως μεταφορείς μηνυμάτων, επιτρέποντας την ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ οργάνων και ιστών. Πολλές φορές επιτελούν ρόλο τοπικού μεταφορέα σινιάλων κατά τη διάρκεια βιοτικών και αβιοτικών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Ως μόρια σινιάλα, οι ορμόνες μεταφέρουν πληροφορίες από κύτταρο σε κύτταρο και οδηγούν ομάδες κυττάρων να υιοθετήσουν συγκεκριμένα αναπτυξιακά πρότυπα. Τα φυτά ρυθμίζουν την απόκριση των μονοπατιών στις ορμόνες σε πολλά επίπεδα, τα οποία περιλαμβάνουν τη βιοσύνθεση, το μεταβολισμό, την αντίληψη και τη σηματοδότηση των ορμονών. Στην περίπτωση της αυξίνης, έρευνες έχουν δείξει ότι η ρύθμιση της κατανομής της γίνεται μέσα από τη δράση ειδικών μεταφορέων οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού (Blilou I et al., 2005; Vanneste S and Friml J, 2009). Πρόσφατα πειράματα απομόνωσης και άλλων ορμονικών μεταφορέων (Kretschmar T et al., 2012; Kanno Y et al., 2012) δείχνουν ότι η κατανομή στο χώρο αυτών των στοιχείων μπορεί να ρυθμιστεί από το φυτό.

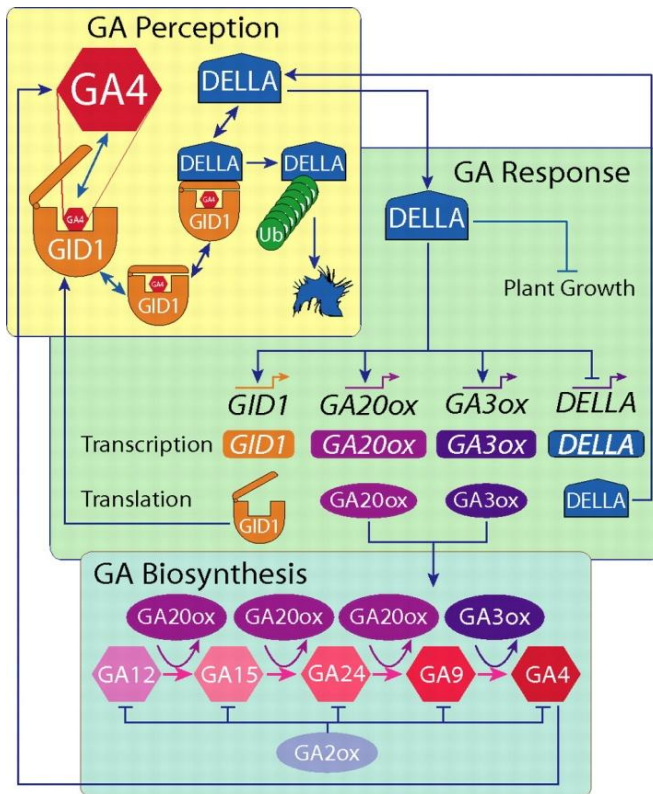
3.1 Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των γιββερελλινών ορμονών (Gibberelins signaling network)

Οι γιββερελλίνες (GA) είναι μια κατηγορία τετρακυκλικών διτερπενικών ορμονών οι οποίες ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες (Brian P.W, 1959) όπως είναι η βλάστηση των σπόρων (Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009), η επιμήκυνση του υποκοτυλίου και ο σχηματισμός του γάντζου (Djakovic-Petrovic et al., 2007), η συγκέντρωση χλωροφύλλης και ανθοκυανινών (Cheminant et al., 2011), η επαγωγή και ο καθορισμός του χρόνου άνθησης (Achard et al., 2007) και η σχηματοποίηση των καρπών του φυτού (Giacomelli L et al., 2013). Πιο πρόσφατες έρευνες έχουν προσδιορίσει λιγότερο εμφανείς ρόλους των γιββερελλινών ορμονών στις αναπτυξιακές διαδικασίες του φυτού όπως είναι ο ρόλος τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Achard et al., 2009), στην επιμήκυνση της ρίζας (Fleet C.M and Sun T.P, 2005; Shani E et al., 2013), στην επέκταση του ξύλου στο υποκοτύλιο (Ragni et al., 2011) καθώς και στην απόκριση του φυτού σε παθογόνους οργανισμούς (Navarro et al., 2008).

Όλα αυτά τα χρόνια έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 130 GA ορμόνες μόνο μερικές από τις οποίες, όπως οι GA1, GA3, και GA4, είναι βιολογικά ενεργές (Yamaguchi S, 2008). Πολλά πειραματικά δεδομένα συνηγορούν στην άποψη ότι τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως είναι το φως και η θερμοκρασία, έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τις βιολογικές διεργασίες του φυτού είτε αλλάζοντας τις συγκεντρώσεις των GA ορμονών, είτε τροποποιώντας τη δυνατότητα απόκρισης του οργανισμού στις GA ορμόνες (Olszewski N et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι ενώ αρχικά η βιοσύνθεση των

GA ορμονών γίνεται στο μερίστωμα του φυτού καθώς και στα κύτταρα του φλοιού και της επιδερμίδας, στη συνέχεια οι ορμόνες αυτές μεταφέρονται σε κύτταρα και ιστούς που βρίσκονται στη φάση της ανάπτυξης και της αύξησης προκειμένου να ρυθμίσουν αυτές τις διαδικασίες. Εκτενής αναφορά σε αυτή τη μετακίνηση των GA ορμονών γίνεται στην περίπτωση επιμήκυνσης των κυττάρων της ρίζας όπου η συγκεκριμένη ορμόνη συγκεντρώνεται στην ενδοδερμίδα της ζώνης επιμήκυνσης της ρίζας προκειμένου να ρυθμίσει την επιμήκυνση του οργάνου αυτού (Shani E et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εκτενής μελέτη και γενετικός χαρακτηρισμός των μονοπατιών βιοσύνθεσης και μεταγωγής σήματος των γιββερελλινών ορμονών χρησιμοποιώντας τα φυτά-μοντέλα *Arabidopsis thaliana* και *Oryza sativa* (ρύζι). Συγκεκριμένα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η ορμόνη GA4 (η κύρια βιοενεργή μορφή των γιββερελλινών) δεσμεύεται σε έναν από τους υποδοχείς της [Gibberellin Insensitive Dwarf (GID)1a–c] (Griffiths J et al., 2006; Nakajima M et al., 2006) προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση του συμπλόκου GA4–GID1 επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη δέσμευση των DELLA πρωτεϊνών (Willige B.C et al., 2007), οι οποίες εν συνεχεία σημαίνονται από την ουμπικουιτίνη και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα 26S για αποδιάταξη (Dill A et al., 2004; Wang F and Deng X.W, 2011) (Εικόνα 4, GA perception). Από παλιότερες έρευνες είχε γίνει ήδη γνωστό ότι οι DELLA πρωτεΐνες λειτουργούν ως καταστολείς των διαδικασιών ανάπτυξης που εξαρτώνται από το μονοπάτι των γιββερελλινών (Dill A and Sun T, 2001; King K.E et al., 2001; Richards D.E et al., 2001). Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των GA ορμονών περιλαμβάνει τη μετατροπή του πρόδρομου μορίου (geranylgeranyldiphosphate) στη βιοενεργή μορφή της GA4 ορμόνης μέσα από μια σειρά αντιδράσεων μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος (Hedden P and Phillips A.L, 2000). Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης των γιββερελλινών συμβαίνει κυρίως στα μεταγενέστερα στάδια του μονοπατιού, στα οποία τα αρμόδια ένζυμα είναι μέλη των GA 20-oxidase (GA20ox) και GA 3-oxidase (GA3ox) οικογενειών που μετατρέπουν το μόριο GA12 σε GA4 (Εικόνα 4, GA biosynthesis). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αυξάνοντας τη δραστικότητα των ενζύμων τα οποία δρουν νωρίτερα στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης δεν παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στη συγκέντρωση της GA4 ορμόνης (Fleet C.M et al., 2003). Οι γιββερελλίνες απενεργοποιούνται από μέλη της οικογένειας GA2ox, πέντε μέλη εκ των οποίων απενεργοποιούν τις βιοενεργές C19 γιββερελλίνες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Rieu I et al., 2008). Όπως πρόσφατες μελέτες αναφέρουν υπάρχουν γονίδια τα οποία ενεργοποιούνται από τις γιββερελλίνες κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπόρων (Yamaguchi S, 2008; Cao D et al., 2006) και της άνθησης (Cao D et al., 2006). Ένα υποσύνολο από αυτά τα γονίδια είναι ήδη γνωστό ότι ανήκει στους άμεσους στόχους των DELLA πρωτεϊνών (Zentella R et al., 2007).



Εικόνα 4. Το σηματοδοτικό δίκτυο (signaling network) των γιββερελλινών αποτελείται από τρεις ενότητες.

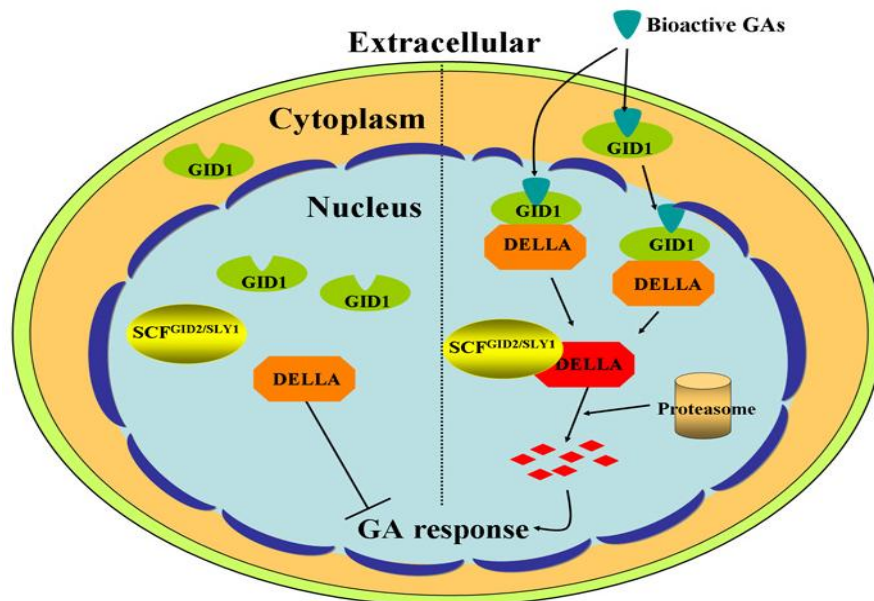
Perception: Οι γιββερελλίνες (GA4) δεσμεύονται από τον υποδοχέα GID1 και το σύμπλοκο αυτό με τη σειρά του προσδένεται στις πρωτεΐνες DELLA. Το σύμπλοκο GA-GID1 προάγει την ουμπικουιτίνωση των DELLA πρωτεϊνών.

Response: Οι πρωτεΐνες DELLA προωθούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *GID1*, *GA3ox* και *GA20ox* και την καταστολή των DELLA μεταγραφημάτων.

Biosynthesis: Το ένζυμο GA20ox μετατρέπει το μόριο GA12 στο GA15 και στη συνέχεια στο GA24 και GA9, το οποίο τελικά μετατρέπεται στην ορμόνη GA4 με τη βοήθεια του ενζύμου GA3ox. Έτσι, η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού διεγείρει το σχηματισμό της GA4 ορμόνης (υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει επαρκής ποσότητα GA12)(Middleton A.M et al., 2013).

3.1.1 Οι υποδοχείς των GA ορμονών, GID1 (Gibberellin Insensitive Dwarf)

Η ανακάλυψη του υποδοχέα των GA ορμονών με βάση το μετάλλαγμα του ρυζιού *gibberellin insensitive dwarf1 (gid1)* το 2005 αποτέλεσε μια σημαντική εξέλιξη στην κατανόηση του σηματοδοτικού μονοπατιού αυτής της οικογένειας ορμονών (Ueguchi-Tanaka M et al., 2005). Παρόλο που το γονίδιο *GID1* κωδικοποιεί για μια διαλυτή πρωτεΐνη που παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την αντίστοιχη λιπάση [hormone-sensitive lipase (HPL)] στα θηλασικά, δε μοιάζει να δρα όπως η λιπάση αυτή. Ενώ η πρωτεΐνη GID1 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου, μπορεί ωστόσο να ανιχνευτεί και στο κυτταρόπλασμα. Ο υποδοχέας GID1 παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με τις βιοενεργές μορφές της GA ορμόνης (GA3, GA4 και GA1) και χαμηλή συγγένεια με τις αδρανείς μορφές της. Μόλις ο υποδοχέας GID1 δεσμεύσει ένα βιοενεργό μόριο GA ταυτόχρονα επιτρέπεται η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τις πρωτεΐνες DELLA. Στη συνέχεια, φαίνεται πως με κάποιο τρόπο η αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα GID1 και των πρωτεϊνών DELLA πυροδοτεί την ουμπικουιτίνωση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αυτών με τη βοήθεια του συμπλόκου SCF^{GID2/SLY1} (Εικόνα 5) (Ariizumi T and Steber C.M, 2006). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η ορμόνη GA ενεργοποιεί την ουμπικουιτίνωση των πρωτεϊνών DELLA μέσω του συμπλόκου SCF^{GID2/SLY1} δεν είναι ακόμα γνωστός. Αν και προηγούμενα μοντέλα προτείνουν ότι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών DELLA είναι μια απαραίτητα διαδικασία για την αναγνώριση τους από το σύμπλοκο SCF^{GID2/SLY1} (Fu X et al., 2004; Gomi K et al., 2004), πιο πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει (Hussain A et al., 2005; Itoh H et al., 2005).

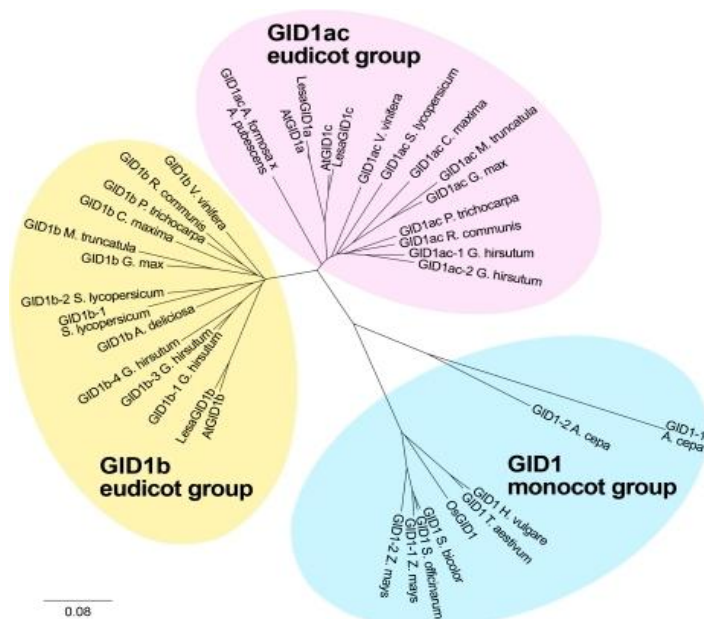


Εικόνα 5. Το μοντέλο μεταγωγής σήματος του μονοπατιού των GA ορμονών στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Αριστερή πλευρά. Απουσία βιοενεργής GA ορμόνης το σύμπλοκο SCF^{GID2/SLY1} δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DELLA. Έτσι, οι πρωτεΐνες DELLA παραμένουν στο κύτταρο και καταστέλλουν τις αντιδράσεις του οργανισμού στις GA ορμόνες, όπως είναι το φύτευμα του σπόρου, η επιμήκυνση του στελέχους και η ανθοφορία. .

Δεξιά πλευρά. Παρουσία βιοενεργής GA ορμόνης ο υποδοχέας GID1 συνδέεται με το GA μόριο στον πυρήνα και/ή στο κυτταρόπλασμα. Εάν η πρόσδεση συμβεί στο κυτταρόπλασμα το σύμπλοκο GID1-GA μεταφέρεται στον πυρήνα για να προσδεθεί στις πυρηνικά εντοπισμένες πρωτεΐνες DELLA. Όταν οι πρωτεΐνες DELLA προσδεθούν στο σύμπλοκο GID1-GA, το σύμπλοκο SCF τις αναγνωρίζει και τις σημαδεύει με την ουμπικουιλίνη. Οι πρωτεΐνες DELLA που έχουν σημανθεί με την ουμπικουιλίνη αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα 26S, επιτρέποντας στο κύτταρο να ανταποκριθεί στα σιγνάλα των GA ορμονών (Ariizumi T and Steber C.M, 2006).

Στο ρύζι έχει εντοπιστεί ένα μόνο γονίδιο *GID1*, ενώ στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν εντοπιστεί τρία λειτουργικά ορθόλογα γονίδια *GID1*, των οποίων η ταυτόχρονη απώλεια είναι απαραίτητη για την απενεργοποίηση της απόκρισης του φυτού στις GA ορμόνες (Griffiths J et al., 2006; Willige B.C et al., 2007). Οι τρεις αυτοί υποδοχείς που εντοπίστηκαν στο φυτό *Arabidopsis thaliana* είναι πλέον γνωστοί ως GID1a, GID1b και GID1c. Μοριακή φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων *GID1* στα αγειόσπερμα φυτά αποκαλύπτει την ομαδοποίηση των γονιδίων αυτών σε δύο ομάδες (*GID1ac* και *GID1b*) στα δικότυλα φυτά και σε μια στα μονοκότυλα. Στα δικότυλα εντοπίζεται τουλάχιστον ένα γονίδιο από κάθε μια από τις δύο ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι διαφορετικοί GID1 υποδοχείς έχουν ξεχωριστούς ρόλους κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του φυτού (Eικόνα 6)(Voegelé A et al., 2011).



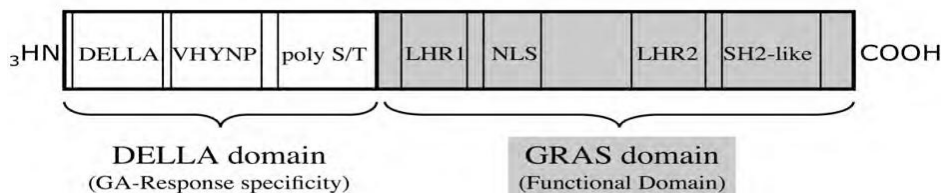
Εικόνα 6. Μοριακή φυλογενετική ανάλυση της οικογένειας των υποδοχέων GID1 στα αγγειόσπερμα φυτά.

Η μοριακή αυτή ανάλυση αποκαλύπτει την επιμέρους ομαδοποίηση του γονιδίου αυτό σε τρεις ομάδες: GID1ac των δικότυλων, GID1b των δικότυλων και GID1 των μονοκότυλων.

Στην εικόνα παρουσιάζεται ένα φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζες, το οποίο προέκυψε από την ευθυγράμμιση των μεταφραζόμενων περιοχών των πρωτεϊνών GID1 που απομονώθηκαν από 37 φυτικά είδη (Voegelé A et al., 2011).

3.1.2 Οι πρωτεΐνες DELLA

Οι πρωτεΐνες DELLA είναι μια υπό-ομάδα της οικογένειας των δυνητικών μεταγραφικών παραγόντων GRAS (GAI, RGA και SCARECROW). Όπως όλες οι πρωτεΐνες GRAS, οι πρωτεΐνες DELLA έχουν μια υψηλά συντηρημένη καρβόξυ-τελική περιοχή η οποία εμπλέκεται στη μεταγραφική τους ρύθμιση και αποτελείται από δύο επαναλαμβανόμενες επτάδες λευκίνης (LHR1 και LHR2) και τρία υψηλά συντηρημένα μοτίβα (VH1ID, PFYRE και SAW) (Pysh L.D et al., 1999; Bolle C, 2004). Οι πρωτεΐνες DELLA διακρίνονται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας GRAS λόγω μιας πολύ συγκεκριμένης αμινο-τελικής ακολουθίας, η οποία περιέχει τρεις υψηλά συντηρημένες περιοχές: την «περιοχή DELLA» (η οποία έδωσε το όνομα της σε αυτή την ομάδα), την «περιοχή VHYNP» και μια περιοχή πολυμερών σερίνης/θρεονίνης (poly S/T) (Εικόνα 7) (Peng J et al., 1999). Η αμινο-τελική αυτή περιοχή υπάρχει μόνο σε αυτή την υπό-οικογένεια των πρωτεϊνών GRAS και φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη σηματοδότηση των γιββερελλινών.



Εικόνα 7. Η δομή των πρωτεϊνών DELLA.

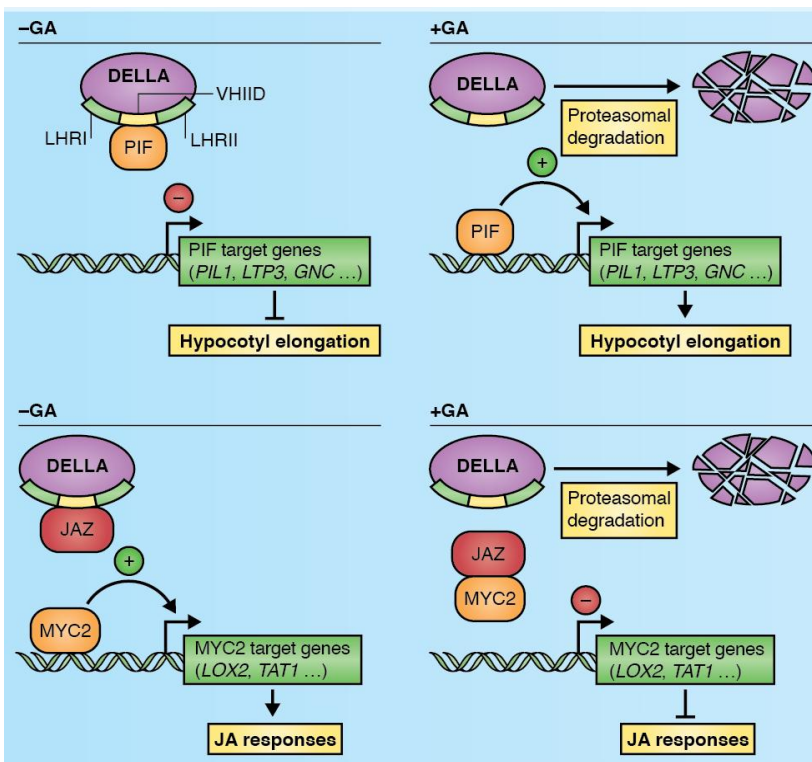
Το καρβόξυ-τελικό άκρο συνίσταται από την περιοχή GRAS η οποία εμπεριέχει μια επαναλαμβανόμενη επτάδα λευκίνης (LHR) και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS).

Η αμινο-τελική περιοχή περιλαμβάνει υψηλά συντηρημένα μοτίβα όπως είναι οι περιοχές DELLA, VHYNP και polyS/T. Η «περιοχή DELLA» προσδίδει στο μόριο εξειδικευμένη ανταπόκριση στο σήμα των γιββερελλινών, ενώ η «περιοχή GRAS» είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Sun T-p, 2004).

Οι πρωτεΐνες DELLA είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων του ρυζιού, κριθαριού, καλαμποκιού και του *Arabidopsis* (Ikeda A et al., 2001; Chandler P.M et al., 2002). Το γονιδίωμα του *A. thaliana* κωδικοποιεί για πέντε πρωτεΐνες DELLA (GA-INSENSITIVE, GAI; REPRESSOR OF GA1-3, RGA; RGA-LIKE1, RGL1; RGL2 και RGL3 (Thomas S.G et al., 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ των αλληλουχιών τους, λόγω κάποιων υψηλά συντηρημένων περιοχών τους όπως είναι η «περιοχή DELLA» και η GRAS λειτουργική περιοχή. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ταυτόχρονα αλληλεπικαλυπτόμενους καθώς και ανεξάρτητους ρόλους στην καταστολή της απόκρισης των ιστών στις γιββερελλίνες. Οι φυσιολογικές λειτουργίες κάθε μεμονωμένης πρωτεΐνης DELLA έχουν μελετηθεί κυρίως με την εφαρμογή λειτουργικών μεταλλάξεων (loss-of-function mutations). Από τα πέντε γονίδια DELLA στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έχει βρεθεί ότι τα γονίδια *Rga* και *Gai* έχουν κυρίαρχο ρόλο στην επιμήκυνση του στελέχους και στην έναρξη της άνθησης (Dill A and Sun T-p, 2001; King et al., 2001), το γονίδιο *RGL2* αναστέλλει τη βλάστηση των σπόρων (Lee S et al., 2002), τα γονίδια *RGA*, *RGL1*, και *RGL2* μαζί ρυθμίζουν την ανθική ανάπτυξη (Cheng H et al., 2004; Tyler L et al., 2004) και το γονίδιο *RGL3* συμβάλλει στην αντοχή του φυτού σε καταστάσεις περιβαλλοντικού στρες (Achard P et al., 2008; Wild M et al., 2012).

Οι πρωτεΐνες DELLA δρουν ως καταστολείς των σινιάλων των GA ορμονών ελλείψει βιοενεργών μορφών GA (Fleet C.M and Sun T-p, 2005). Τα μεταλλάγματα στα οποία είχε χαθεί η λειτουργικότητα των πρωτεϊνών DELLA οδηγούνταν σε διαρκεί μεταφορά σήματος από τις ορμόνες GA, προωθώντας την επιμήκυνση του στελέχους ανεξάρτητα από την παρουσία/απουσία ορμονών GA και μειώνοντας τα επίπεδα των GA3ox1 μεταγραφημάτων (Dill A and Sun T-p, 2001; Gubler F et al., 2002; Thomas S.G et al., 2005). Αντίθετα, τα μεταλλάγματα στα οποία είχε ενισχυθεί η λειτουργικότητα των πρωτεϊνών DELLA οδηγούνταν σε διαρκεί παρεμπόδιση στη μεταφορά σήματος από τις ορμόνες GA και παρήγαγαν νάνους φαινοτύπους που δεν επηρεάζονταν από την παρουσία/απουσία ορμονών GA (Dill A et al., 2001; Gubler F et al., 2002). Ο μηχανισμός με τον οποίο οι πρωτεΐνες DELLA καταστέλλουν την απόκριση του φυτού σε σινιάλα των GA ορμονών παραμένει μέχρι και σήμερα ασαφής. Μια σημαντική λειτουργία των πρωτεϊνών DELLA είναι ότι αλληλεπιδρούν με ποικίλες κατηγορίες ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες DELLA ρυθμίζουν την επιμήκυνση του υποκοτυλίου αλληλεπιδρώντας με τους μεταγραφικούς παράγοντες PIFs (Phytochrome Interacting Factors) (Gallego-Bartolomé J et al., 2010) καθώς και με τον μεταγραφικό παράγοντα BZR1 (Brassinazole Resistant 1) (Bai M.Y et al., 2012; Gallego-Bartolomé J et al., 2012) και συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες JAZ (Jasmonate Zim-Domain) (Εικόνα 8)(Yang D.L et al., 2012; Wild M et al., 2012). Μέσα από αυτές τις αλληλεπιδράσεις οι

πρωτεΐνες DELLA ενισχύουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA των μεταγραφικών παραγόντων (όπως συμβαίνει με τους PIFs) (Feng S et al., 2008) ή αναστέλλουν τη δραστηριότητα των μεταγραφικών ρυθμιστών (όπως συμβαίνει με τους JAZs) (Hou X et al., 2010). Παράλληλα, η ορμόνη GA απαλλάσσει τον οργανισμό από την καταστολή των πρωτεϊνών DELLA προωθώντας την αποικοδόμησή τους μέσω του πρωτεασώματος 26S. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες DELLA αλληλεπιδρούν με πολλούς μεταγραφικούς ρυθμιστές αναστέλλοντας τη δραστηριότητά τους (Εικόνα 8)(Hong G.J et al., 2012; An F et al., 2012). Με αυτόν τον τρόπο, τα GA σινιάλα ελέγχουν την έκφραση ενός πλήθους γονιδίων-στόχων που λειτουργούν σε διακριτά μονοπάτια.



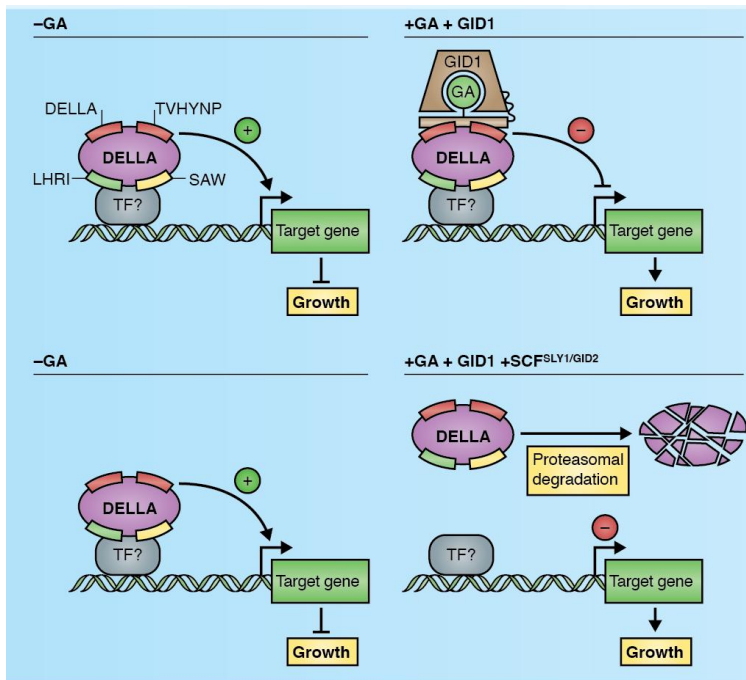
Εικόνα 8. Δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων/ρυθμιστών από τις πρωτεΐνες DELLA.

Απουσία της ορμόνης GA, οι πρωτεΐνες DELLA αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ PIFs, πάνω εικόνα) ή μεταγραφικούς ρυθμιστές (π.χ JAZ, κάτω εικόνα) και τους δεσμεύουν σε ανενεργά σύμπλοκα καθιστώντας τους ανίκανους να προσδεθούν στο DNA ή σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ MYC2).

Παρουσία της ορμόνης GA, προωθείται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών DELLA και απελευθερώνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες/ρυθμιστές, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων (Daviere J-M and Achard P, 2013).

Όπως ήδη γνωρίζουμε, οι πρωτεΐνες DELLA είναι πυρηνικά εντοπισμένοι καταστολείς οι οποίοι μπορεί να δρουν και ως μεταγραφικοί παράγοντες (Ogawa M et al., 2000). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα πρόσφατα ευρήματα ότι η πρωτεΐνη RGA είναι σε θέση να συνδεθεί με το DNA (Zentella R et al., 2007; Zhang Z.L et al., 2011). Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των υποκινητών-στόχων καθώς και η έλλειψη μιας περιοχής πρόσδεσης με το DNA στο μόριο των πρωτεϊνών DELLA υποδηλώνουν ότι η πρόσδεση των πρωτεϊνών DELLA με τους υποκινητές των γονιδίων προϋποθέτει την ύπαρξη επιπλέον παραγόντων. Περεταίρω πρόοδος στην κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο οι πρωτεΐνες DELLA ασκούν τη μεταγραφική δραστηριότητά τους προήλθε από πρόσφατες μελέτες στο ρύζι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες DELLA δρουν ως παράγοντες διενεργοποίησης (transactivation factors) και ότι οι ορμόνες

GA καταστέλλουν τη δράση τους με διπλό τρόπο. Απουσία του συμπλόκου SCF^{SLY1/GID2} το σύμπλοκο GA-GID1 δεσμεύεται στις πρωτεΐνες DELLA και καταστέλλει τη μεταγραφική τους δραστηριότητα, ενώ η παρουσία του συμπλόκου SCF^{SLY1/GID2} υποκινεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών DELLA (Εικόνα 9)(Daviere J-M and Achard P, 2013).



Εικόνα 9. Μεταγραφική δράση (transactivation activity) των πρωτεϊνών DELLA.

Οι πρωτεΐνες DELLA δρουν επίσης ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές και οι ορμόνες GA καταστέλλουν αυτή τους τη δράση με δύο τρόπους:

Απουσία του συμπλόκου SCF^{SLY1/GID2}: το σύμπλοκο GA-GID1 παρεμποδίζει τη μεταγραφική δράση των πρωτεϊνών DELLA (πάνω εικόνα).

Παρουσία του συμπλόκου SCF^{SLY1/GID2}: το σύμπλοκο GA-GID1 υποκινεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών DELLA (κάτω εικόνα) (Daviere J-M and Achard P, 2013).

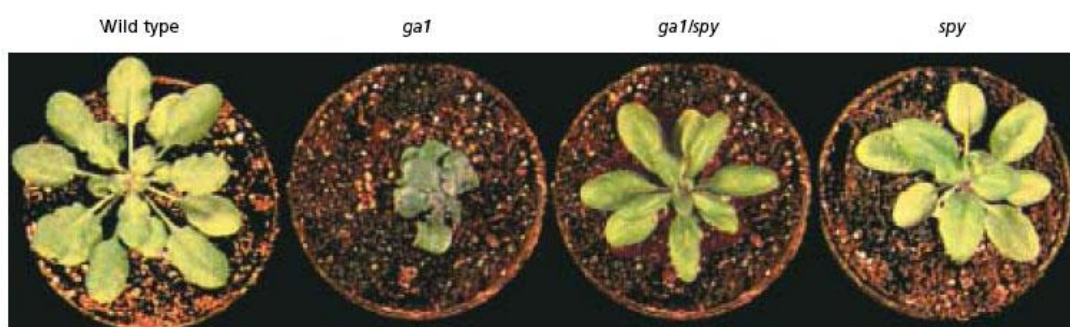
3.1.3 Ο αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού των γιββερελλινών - SPINDLY (SPY)

Παραπάνω έγινε εκτενής αναφορά στις πρωτεΐνες DELLA και στο ρόλο τους ως αρνητικοί ρυθμιστές στα σινιάλα των ορμονών GA στο φυτό *Arabidopsis thaliana* καθώς και σε ομόλογες πρωτεΐνες στο ρύζι και σε άλλα καλλιεργούμενα φυτά. Το γονίδιο *Spindly (SPY)* κωδικοποιεί για ένα διαφορετικό είδος αρνητικού ρυθμιστή στο σηματοδοτικό μονοπάτι των γιββερελλινών. Η αλληλουχία του γονιδίου του περιέχει 18 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 914 αμινοξέα. Το γονίδιο *SPY* κωδικοποιεί για μια (O-linked N-acetylglucosamine) GlcNAc τρανσφεράση (Jacobsen S et al., 1996) η οποία έχει παρόμοια δομή και λειτουργία με την OGT (O-linked b-N-acetylglucosamine) τρανσφεράση των ζώων και του ανθρώπου (Roos M.D and Hanover J.A, 2000). Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να καταλύει την μετα-μεταφραστική προσθήκη μιας ομάδας GlcNAc σε μια περιοχή της πρωτεΐνης-υποστρώματος που είναι πλούσια σε σερίνη/θρεονίνη (Wells L et al., 2001). Σύμφωνα με αυτή την ανακάλυψη, ότι η πρωτεΐνη *SPY* έχει παρόμοια λειτουργία με την τρανσφεράση OGT, τα μεταλλάγματα *spr* αναμένεται να παρουσιάζουν αλλαγές στη γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών τους. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό ποιες πρωτεΐνες στο μονοπάτι το γιββερελλινών αποτελούν στόχους της πρωτεΐνης *SPY*. Ο ρόλος του εντοπίζεται στα πρώιμα στάδια του μονοπατιού των γιββερελλινών, καθώς ομόζυγες υπολειπόμενες μεταλλάξεις σε αγρίου-τυπου

υπόβαθρο μπορούν να βλαστήσουν παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων του παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης των γιββερελλινών, paclobutrazol (Sponsel V, 2006).

Στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών RGA και GAI (πρωτεΐνες DELLA) έχει εντοπιστεί μια περιοχή πλούσια σε σερίνη/θρεονίνη που τις καθιστά ενδεχόμενους στόχους της πρωτεΐνης SPY. Μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών είναι ότι η πρωτεΐνη SPY ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες RGA και GAI μεταφέροντας στο μόριό τους μια GlcNAc ομάδα. Το σηματοδοτικό GA μονοπάτι, με τη σειρά του, απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες RGA και GAI εξαλείφοντας τις GlcNAc ομάδες. Έτσι, ενδέχεται η δράση του γονιδίου *SPY* ως αρνητικού ρυθμιστή στο μονοπάτι των γιββερελλινών να οφείλεται στην ενεργοποίηση/σταθεροποίηση των πρωτεϊνών RGA και GAI μέσω της γλυκοζυλίωσής τους από την πρωτεΐνη SPY. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμα αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη SPY αλληλεπιδρά με καμία από τις δύο αυτές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη SPY εντοπίζεται σε μικρές συγκεντρώσεις στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, όπου και δρα. Το γονίδιο *SPY* εκφράζεται σε ολόκληρο το φυτό, όμως η έκφρασή του είναι αυξημένη στο κορυφαίο μερίστωμα, στα άνθη, στα σπορόφυτα καθώς και στις άκρες της ρίζας. Τα επίπεδα έκφρασής του είναι σταθερά στα βλαστητικά όργανα αλλά μειώνονται με την ηλικία (Swain S et al., 2002).

Σε σχέση με τα φυτά αγρίου-τύπου, τα μεταλλάγματα *spy* παρουσιάζουν φύλλα με πιο ελαφρύ πράσινο χρωματισμό, πρόωρη άνθηση, μερική αρρενοστεριότητα και «ψηλόλιγνο» φαινότυπο («spindly»), υποδηλώνοντας ότι ο παράγοντας SPY δρα ως αρνητικός ρυθμιστή στα φυτά καταστέλλοντας την απόκριση τους στα σινιάλα των ορμονών GA. Ακόμα, φαίνεται ότι τα μεταλλάγματα *spy* μπορούν να καταστείλουν τους φαινοτύπους που προκύπτουν από τα μεταλλάγματα *ga1* (έλλειψη GA) και *gai* (αυξημένες συγκεντρώσεις GA)(Εικόνα 10)(Silverstone A.L et al., 2007).

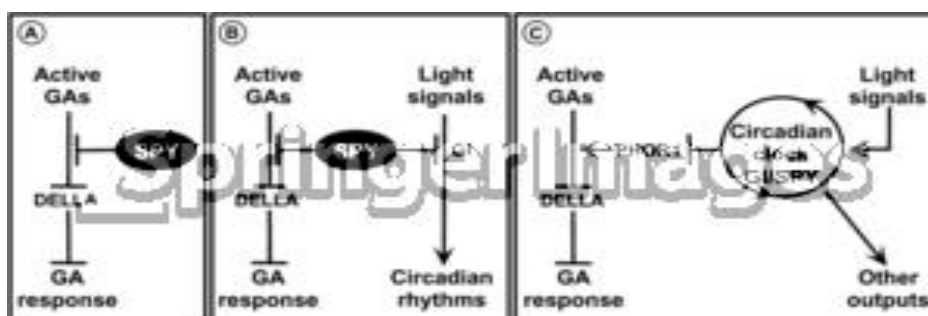


Εικόνα 10. Φαινότυποι μεταλλαγμάτων *spy* στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Η μετάλλαξη του γονιδίου *SPY* στο φυτό *Arabidopsis thaliana* οδηγεί στην παρεμπόδιση του καταστολέα της ανάπτυξης (SPY), έτσι τα φυτά συμπεριφέρονται σα να είχαν χειριστεί με την ορμόνη GA.

Από τα αριστερά προς τα δεξιά: αγρίου τύπου φυτό (wild type), μετάλλαγμα *ga1* (ανεπάρκεια GA), διπλό μετάλλαγμα *ga/spy* και μετάλλαγμα *spy* (Sponsel V, 2006).

Ωστόσο, κάποιοι φαινότυποι που παρατηρούνται στα μεταλλάγματα *spy* δε σχετίζονται με την απόκριση του φυτού στα σινιάλα των GA ορμονών. Παράδειγμα τέτοιων φαινοτύπων είναι μεταλλάγματα με αλλοιωμένο μέγεθος ροζέτας και αυξημένα μεσογονάτια διαστήματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονίδιο *spy* επηρεάζει και άλλα ρυθμιστικά μονοπάτια εκτός από το μονοπάτι των γιββερελλινών (Εικόνα 11)(Tseng T.S et al., 2004). Συγκεκριμένα, στα μεταλλάγματα *spy* εκτός από τους φαινοτύπους που προκαλούνται από τροποποιήσεις στο μονοπάτι των γιββερελλινών έγινε και καταγραφή φαινοτύπων οι οποίοι παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε συνθήκες ξηρασίας και αυξημένης αλατότητας. Βρέθηκε, ακόμα, ότι η έκφραση του γονιδίου *SPY* επάγεται από την ξηρασία, ενώ είναι ελαφρώς αυξημένη σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας (Qin F et al., 2011). Επιπρόσθετα, στα μεταλλάγματα *spy* παρατηρούνται διαταραχές στο ρυθμό διαπνοής του φυτού (Sothorn R.B et al., 2002) καθώς και στην κίνηση των κοτυληδόνων (Tseng T.S et al., 2004).



Εικόνα 11. Μοντέλα δράσης του γονιδίου *SPY* στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

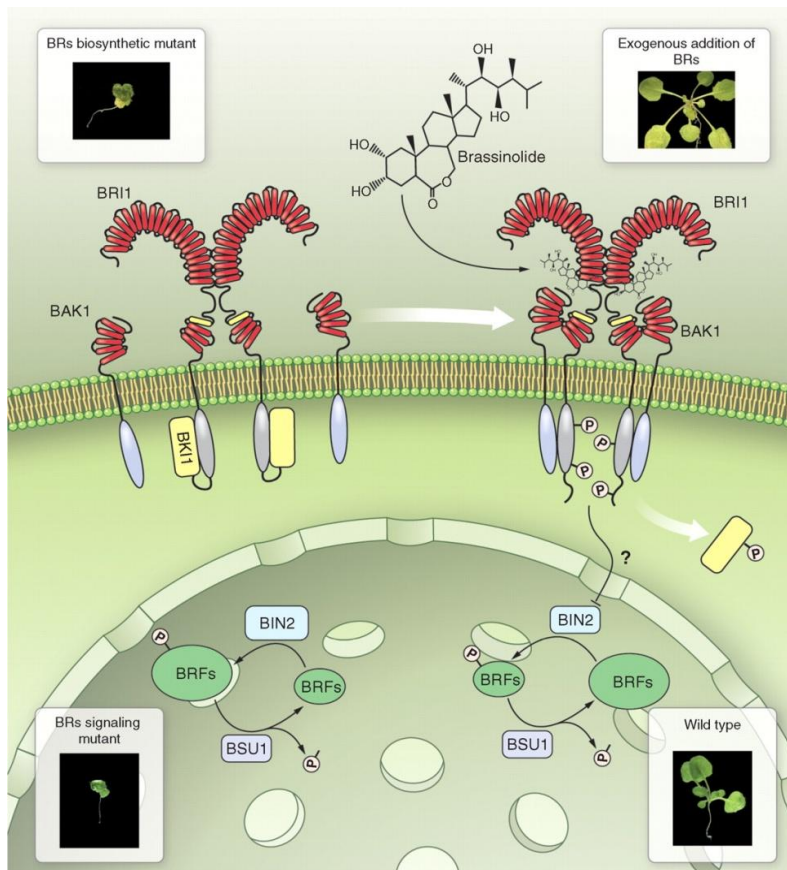
Πιθανόν να απαιτείται η ύπαρξη περισσότερο πολύπλοκων μοντέλων για την ερμηνεία των φαινοτύπων κάποιων μεταλλαγμάτων *spy*. Όπως είναι ήδη γνωστό, οι πρωτεΐνες DELLA εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανταπόκρισης του φυτού στα σινιάλα των GA ορμονών. Πιθανόν, ο παράγοντας SPY σε αυτό το μονοπάτι να δρα νωρίτερα (downstream) από τις πρωτεΐνες DELLA. **A.** Ο παράγοντας SPY δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην ανταπόκριση του φυτού στις ορμόνες GA κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπόρων. **B.** Ο παράγοντας SPY δρα ταυτόχρονα σε δύο μη συνδεδεμένα μονοπάτια (μονοπάτι GA και κίρκαδικό ρολόι). **C.** Ο παράγοντας SPY δρα στο κίρκαδικό ρολόι, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει τα σινιάλα των GA ορμονών (Filardo F.F and Swain S.M, 2002).

3.2 Το μονοπάτι των μπρασισινοστεροειδών ορμονών (Brassinosteroids pathway)

Τα μπρασισινοστεροειδή (BR) είναι μια οικογένεια στεροειδών ορμονών, οι οποίες ανήκουν στην ομάδα των ενδογενών σημάτων και είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών και την οργανογένεση. Τα μπρασισινοστεροειδή εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς του φυτικού βασιλείου και παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες των φυτών, όπως είναι η βλάστηση, η κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση, η φωτομορφογένεση, το γήρας και η άμυνα εναντίον παθογόνων

(Clouse S.D, 1996; Krishna P, 2003). Κατά συνέπεια, μεταλλάγματα στα οποία έχει διαταραχθεί η ομαλή λειτουργία του μονοπατιού των BR ορμονών παρουσιάζουν φυτά με μικρότερο μήκος υποκοτυλίου, βλαστού και μίσχων λόγω ελαττωματικής επιμήκυνσης των κυττάρων σε αυτά τα όργανα, πιο σκούρα πράσινα φύλλα, μειωμένη κυριαρχία κορυφής, καθυστερημένη γήρανση, αρρενοστεριότητα καθώς και αλλοιώσεις στο σχηματισμό του αγγειακού ιστού (Εικόνα 12)(Clouse S.D et al., 1996; Haubrick L.L and Assmann S.M, 2006; Nemhauser J.L and Chory J, 2004). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι ορμόνες BR ενισχύουν την άμυνα του φυτικού οργανισμού εναντίον βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Müssig C et al., 2006). Οι ορμόνες αυτές έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την ανοσοαπόκριση του οργανισμού όταν εφαρμόζονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις και στο σωστό στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Η απόκριση του φυτού σε συνθήκες καταπόνησης που ρυθμίζεται από το μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών ορμονών είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης σειράς βιοχημικών αντιδράσεων όπως είναι η επαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών, η ενεργοποίηση ή η καταστολή βασικών ενζυμικών αντιδράσεων και η παραγωγή μιας ποικιλίας αμυντικών χημικών ενώσεων (Bajguz A and Hayat S, 2009). Ακόμα, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο χειρισμός με ένα από τα μόρια των μπρασσινοστεροειδών ορμονών (epibrassinolide) ενισχύει την ανθεκτικότητα του οργανισμού σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης αυξάνοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και τη συσσώρευση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (heat sock proteins) καθώς και την παραγωγή μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της μετάφρασης σε σπορόφυτα του φυτού *B. napus* (Dhaubhadel S et al., 2002).

Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από τις BR ορμόνες πιστεύεται ότι είναι πολύπλοκα και πολυδιακλαδισμένα. Οι ορμόνες BL (Brassinolide) αποτελούν τα περισσότερο βιο-ενεργά μέλη της οικογένειας των φυτικών μπρασσινοστεροειδών ορμονών και είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση πολλών αναπτυξιακών διαδικασιών στο φυτικό οργανισμό (Clouse S.D et al., 1996). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η μεταγωγή σήματος από τις BL ορμόνες γίνεται με την εμπλοκή διαφόρων σηματοδοτικών στοιχείων (Εικόνα 12). Τα στοιχεία αυτά περιλαμβάνουν: α) τους υποδοχείς που εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη BRI1 (Brassinosteroid Insensitive-1) και BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase-1), οι οποίοι αντιλαμβάνονται το σήμα των BR ορμονών και ξεκινούν τη διαδοχική μεταγωγή του, β) τις πυρηνικές πρωτεΐνες BES1 (BRI1-EMS-Suppressor-1), την ομόλογή της BZR2 (Brassinazole-Resistant-2) και την πρωτεΐνη BZR1 (Brassinazole-Resistant-1), οι οποίες ενεργοποιούν την απόκριση του οργανισμού στα ερεθίσματα με σκοπό την ανάπτυξη του καθώς αποφωσφορυλιώνονται και σταθεροποιούνται από την BR ορμόνη, γ) την κινάση BIN2 (Brassinosteroid Insensitive-2), η οποία ρυθμίζει αρνητικά την απόκριση του φυτού στις BR ορμόνες μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών BZR1 και BES1/BZR2 και δ) τη φωσφατάση BSU1 (BRI1 Suppressor Protein-1), η οποία ρυθμίζει θετικά την απόκριση του φυτού στις BR ορμόνες αποφωσφορυλιώνοντας και σταθεροποιώντας τις πρωτεΐνες BZR2 και BES1 (Wang Z.Y and He J.X, 2004; Vert G and Chory J, 2006; Kim T.W and Wang Z.Y, 2010).



Εικόνα 12. Το μοντέλο μεταγωγής σήματος του μονοπατιού των BR ορμονών στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Οι γενετικά τροποποιημένες σειρές του φυτού *Arabidopsis thaliana* που δεν παράγουν την BL (brassinolide) ορμόνη παρουσιάζουν νανισμό (φωτογραφία πάνω αριστερά), έχουν όμως την ευκαιρία να αναπτυχθούν κανονικά έπειτα από εξωγενή προσθήκη ορμόνης BL (φωτογραφία πάνω δεξιά). Αντίθετα, τα μεταλλάγματα στα οποία έχει διαταραχθεί το μονοπάτι των BR ορμονών (φωτογραφία κάτω αριστερά) δεν μπορούν να επανέλθουν έπειτα από χορήγηση ορμόνης BL.

Απουσία BR ορμονών, η περιοχή των κινάσων στο μόριο της ομοδιμερούς πρωτεΐνης BRI1 παρεμποδίζεται λόγω της αλληλεπίδρασης του μορίου με την πρωτεΐνη BKI αλλά και εξ' αιτίας της καρβοξυτελικής

περιοχής της ίδιας της πρωτεΐνης. Αυτό επιτρέπει στην πρωτεΐνη BIN2 να φωσφορυλιώσει και να απενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες (BRFs) BES1 και BZR1.

Άμεση πρόσδεση του BL στο ομοδιμερές BRI1, έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση της περιοχής της κινάσης που οδηγούν στις φωσφορυλιώσεις της πρωτεΐνης BKI και της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης BRI1, οδηγώντας στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης BRI1 από την αυτό-καταστολή της και στην εκτόπιση της πρωτεΐνης BKI μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στη σύνδεση της πρωτεΐνης BRI1 με την πρωτεΐνη BAK1 και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το ενεργό πλέον σύμπλοκο του υποδοχέα παρεμποδίζει τη δράση της πρωτεΐνης BIN2, επιτρέποντας την αποφωσφορυλίωση των BRFs από την πρωτεΐνη BSU1 και την ενεργοποίηση ή καταστολή των γονιδίων-στόχων με σκοπό τη βέλτιστη ανάπτυξη του φυτού (φωτογραφία κάτω δεξιά) (Belkhadir Y and Chory J, 2006).

3.2.1 Οι υποδοχείς των BR ορμονών - BRI1 (Brassinosteroid Insensitive-1) και BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase-1)

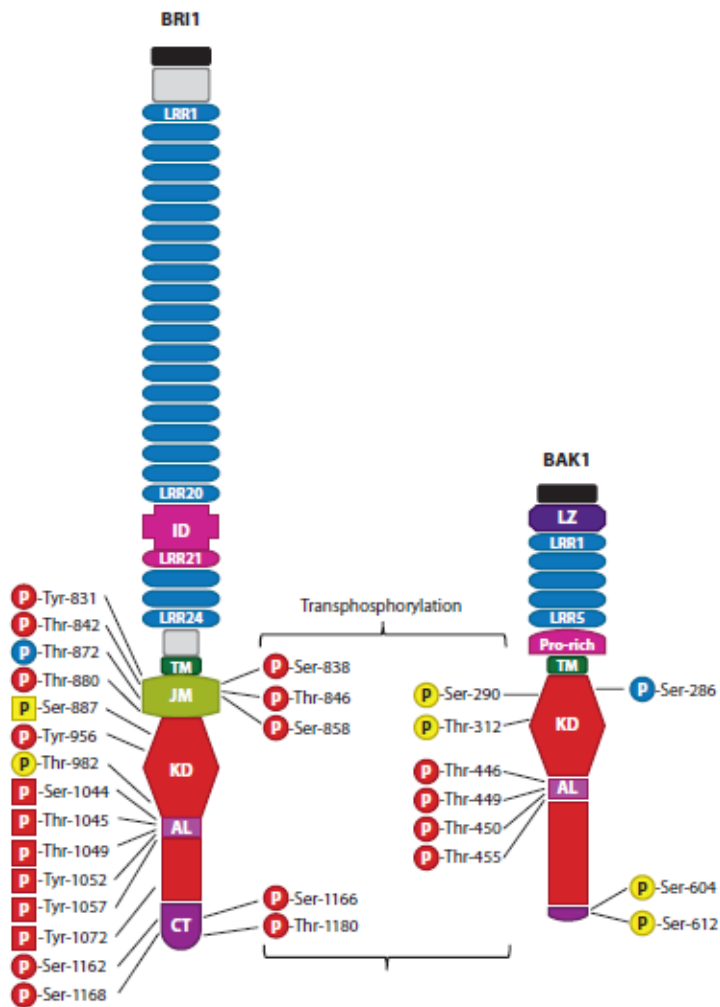
Τα σήματα των ορμονών BR γίνονται αντιληπτά από το κύτταρο μέσω δύο υποδοχέων, του BRI1 και του BAK1. Οι υποδοχείς αυτοί είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας φυτικών πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει στο μόριο της επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (leucine rich repeat receptor-like kinases, LRR RLKs) (Shiu S.H et al., 2004; Belkhadir Y and Chory J, 2006).

Ανάλυση των μεταλλαγμένων σειρών στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και σε άλλα καλλιεργούμενα φυτικά είδη έδειξαν ότι αλλοιώσεις στην εξωκυτταρική ή στην κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές αναπτυξιακές δυσμορφίες, όπως ακραίους νανισμούς,

αλλοιωμένη μορφολογία φύλλων και αγγειακών ιστών, καθυστέρηση στις διαδικασίες της γήρανσης και της άνθησης καθώς και αρρενοστειρότητα (Clouse S.D et al., 1996; Montoya T et al., 2002). Τα γενετικά αυτά δεδομένα επιβεβαιώνουν τη σημασία του ρόλου του υποδοχέα BRI1 στη μεταγωγή των αναπτυξιακών σιγνάλων από τις BR ορμόνες. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν σε εντατικότερες έρευνες για την εξακρίβωση της ακριβούς λειτουργίας της πρωτεΐνης BRI1 (Gendron J.M and Wang N.Y, 2007; Wang Z.Y et al., 2012).

Η πρωτεΐνη BRI1, όπως και άλλες φυτικές πρωτεΐνες με επαναλαμβανόμενες LRR RLKs περιοχές, έχει παρόμοια οργάνωση των λειτουργικών της περιοχών με αυτή που έχουν οι υποδοχείς της τυροσίνης στα θηλαστικά (mammalian receptor tyrosine kinases, RTKs) και οι υποδοχείς των μεταγραφικών παραγόντων ανάπτυξης (transforming growth factor- β , TGF- β) (Pawson T, 2004; Hubbard S.R and Miller W.T, 2007). Η δομή των μορίων αυτών περιλαμβάνει: α) μια εξωκυτταρική περιοχή (Extracellular Domain) που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της ορμόνης και για τον ολιγομερισμό του υποδοχέα, β) μια διαμεμβρανική αλληλουχία (Transmembrane Segment) και γ) μια κυτταροπλασματική περιοχή (Intracellular Domain), η οποία αποτελείται από την περιοχή της κινάσης (kinase domain, KD) και από την καρβοξυ-τελική περιοχή (C-terminal, CT) (Vert G et al., 2005). Πλέον είναι γνωστό ότι η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα BRI1 αποτελείται από πολλές διακριτές περιοχές οι οποίες περιλαμβάνουν: α) ένα αμινοτελικό πεπτίδιο σήματος (N-terminal Signal Peptide), ένα «φερμουάρ» λευκίνης (Leucine-Zipper motif), δύο ζευγάρια κυστεϊνικών υπολειμμάτων, τα οποία συνοδεύουν 25 LRRs, και μια ομάδα 70 αμινοξέων (Island Domain) που βρίσκεται μεταξύ των LRR21 και LRR22 (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010). Ο υποδοχέας BRI1 αντιλαμβάνεται το σήμα της ορμόνης BR μέσω της εξωκυτταρικής περιοχής του και στη συνέχεια ενεργοποιεί μια σειρά διαδοχικών διαδικασιών για τη μεταγωγή του σήματος μέσω της δράσης της κυτταροπλασματικής κινάσης (Εικόνα 13) (Zhou A et al., 2004; Osakabe Y et al., 2005).

Ο υποδοχέας BAK1, όπως και ο υποδοχέας BRI1, ανήκει στην οικογένεια των LRR RLKs πρωτεϊνών και δρα συνεργιστικά με τον υποδοχέα BRI1 για τη μεταγωγή του σήματος των ορμονών BR. Οι μόνες δομικές διαφορές που παρατηρούνται στο μόριο του υποδοχέα BAK1 είναι ότι αποτελείται από μια μικρότερη εξωκυτταρική περιοχή με πέντε μόνο LRRs καθώς και ότι από το μόριο του λείπει η ομάδα των 70 αμινοξέων (Εικόνα 13) (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010). Οι πρωτεΐνες BRI1 και BAK1 εκτός από το ότι παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης εντοπίζονται και οι δύο στην πλασματική μεμβράνη, άρα η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι πολύ πιθανή. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα μόρια των πρωτεϊνών BRI1 και BAK1 φωσφορυλιώνουν το ένα το άλλο καθώς και ότι η πρωτεΐνη BAK1 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης παρουσία της πρωτεΐνης BRI1 (Russeinova E et al., 2004).



Εικόνα 13. Οι δομές των πρωτεϊνών BRI1 και BAK1.

Η πρωτεΐνη BRI1 αποτελείται από 24 πλούσιες σε λευκίνη περιοχές (LRR), μια ομάδα 70 αμινοξέων (ID), μια διαμεμβρανική αλληλουχία (TM), μια παραμεμβρανική περιοχή (JM), μια περιοχή κινάσης (KD) και μια καρβοξυτελική περιοχή (CT).

Η πρωτεΐνη BAK1 αποτελείται από τέσσερα «φερμουάρ» λευκίνης (LZ), πέντε LRRs, μια περιοχή πλούσια σε προλίνη (Pro-rich), μια διαμεμβρανική αλληλουχία (TM), μια περιοχή κινάσης (KD) και μια καρβοξυτελική περιοχή (CT).

Οι περιοχές που δέχονται τα μηνύματα εμφανίζονται με μαύρο κουτί, ενώ οι ακαθόριστες περιοχές εμφανίζονται με γκρι κουτί. Η περιοχή ενεργοποίησης των κινασών συμβολίζεται με (AL). Οι επιβεβαιωμένες θέσεις φωσφορυλίωσης συμβολίζονται με κύκλους και το γράμμα P, ενώ οι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης συμβολίζονται με τετράγωνο και το γράμμα P. Οι ενεργοποιημένες θέσεις φωσφορυλίωσης εμφανίζονται με κόκκινο, οι κατασταλμένες θέσεις με μπλε ενώ θέσεις χωρίς σημαντική επίδραση στη δράση της κινάσης ή θέσεις που δεν έχουν μελετηθεί ακόμα εμφανίζονται με κίτρινο (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010).

Σήμερα είναι γνωστό ότι απουσία ορμονών BR ο υποδοχέας BRI1 εντοπίζεται με ομοδιμερή διαμόρφωση στην πλασματική μεμβράνη (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010; Jaillais Y et al., 2011a) εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εσφαλμένη μεταφορά σημάτων (Jaillais Y et al., 2011a; Wang Z.Y et al., 2012). Ο ανασταλτικός αυτός μηχανισμός περιλαμβάνει και τη δράση της κινάσης BKI (BRI1 Kinase Inhibitor 1), η οποία δεσμεύεται στην περιοχή της κινάσης του υποδοχέα BRI1 κρατώντας αδρανή την περιοχή LRR-RLK (Jaillais Y et al., 2011b). Πρόσδεση, όμως, της ορμόνης BR από την εξωκυτταρική LRR περιοχή του ομοδιμερούς BRI1 πιστεύεται ότι οδηγεί την πρωτεΐνη σε αλλαγή της διαμόρφωσής της ενεργοποιώντας τη δράση της ως κινάση και την αυτό-φωσφορυλίωσή της (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010; Jaillais Y et al., 2011a). Ακολούθως, η πρωτεΐνη BRI1 προκαλεί τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης BKI, προκαλώντας την αποδέσμευσή της πρωτεΐνης-καταστολέα και οδηγώντας τη στο κυτταρόπλασμα (Jaillais Y et al., 2011b). Η αποσύνδεση της πρωτεΐνης BKI οδηγεί τελικά στη σύνδεση των πρωτεϊνών BRI1 και BAK1 μεταξύ τους, δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο του υποδοχέα BRI1 (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010; Jaillais Y et al., 2011a, 2011b). Στη συνέχεια, μέσω διαδοχικών φωσφορυλίωσεων μεταξύ των πρωτεϊνών

BRI1 και BAK1, ο υποδοχέας BRI1 αποκτά ολοκληρωτικά ενεργότητα κινάσης και η μεταγωγή του σήματος ξεκινά (Bücherl C.A et al., 2013).

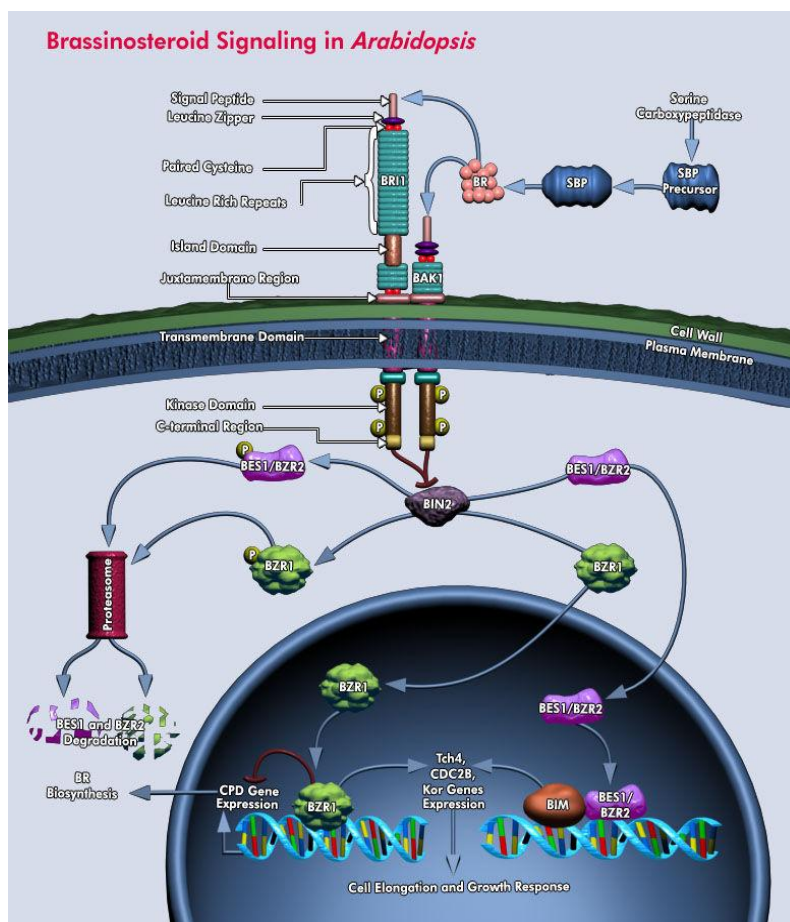
3.2.2 Οι μεταγραφικοί παράγοντες του BR μονοπατιού – BZR1 (Brassinazole-Resistant-1) και BES1 (BRI1-EMS-Suppressor-1)

Η μεταγωγή του σήματος των ορμονών BR από τους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης (BRI1 και BAK1) στα γονίδια-στόχους του πυρήνα γίνεται μέσω της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων BZR1 (Brassinazole-Resistant-1) και BES1 (BRI1-EMS-Suppressor-1), η οποία αποτελείται από έξι μέλη στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Yin Y et al., 2002; Zhao J et al., 2002).

Ο παράγοντας BES1, αρχικά, ταυτοποιήθηκε μέσω του (gain-of-function) μεταλλάγματος *bes1-D*. Το μετάλλαγμα αυτό καταστέλλει παντελώς το φαινότυπο του μεταλλάγματος *bri1*, ενώ φαίνεται να εμφανίζει μια διαρκή απόκριση στα σινιάλα των BR ορμονών προκαλώντας στο φυτό υπερβολική επιμήκυνση του βλαστού και ανθεκτικότητα στον παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης των BR ορμονών, brassinazole (BRZ) (Yin Y et al., 2002). Ο παράγοντας BZR1, αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκε μέσω μιας κυρίαρχης μεταλλαγής, *bzr1-D*. Το μετάλλαγμα αυτό παρουσίαζε υπερευαισθησία στον παρεμποδιστή BRZ σε συνθήκες φωτισμού, ενώ ήταν ανθεκτικό στο BRZ σε συνθήκες σκότους (Wang Z.Y et al., 2002).

Οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες (BES1 και BZR1), απουσία των ορμονών BR, φωσφορυλιώνονται από την κινάση BIN2, η οποία ρυθμίζει αρνητικά τη δράση τους μέσω διαφόρων μηχανισμών (Li J and Nam K.H, 2002; Pérez-Pérez J.M et al., 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες BZR1 και BES1/BZR2 παρουσιάζουν μειωμένη σταθερότητα (He J.X et al., 2002; Yin Y et al., 2002) και ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Gampala S.S et al., 2007; Vert G et al., 2005). Επιπροσθέτως, τα φωσφορυλιωμένα μόρια αυτών των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες 14-3-3, οι οποίες της κρατούν στο κυτταρόπλασμα και ως εκ τούτου εμποδίζουν την πυρηνική συσσώρευσή τους (Gampala S.S et al., 2007; Ryu H et al., 2007). Σήμερα είναι γνωστό ότι οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες BZR1 και BES1/BZR2 σημαίνονται με την συμπικουιτίνη ώστε να οδηγηθούν για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Ως αποτέλεσμα, κανένα σήμα από τις ορμόνες BR δε φτάνει στον πυρήνα και η επιμήκυνση των κυττάρων παρεμποδίζεται (Εικόνα 14). Αντίθετα, η πρόσδεση των ορμονών BR στους μεμβρανικούς υποδοχείς σταθεροποιεί ή προάγει το σχηματισμό του ετεροδιμερούς BRI1/BAK1 και οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινάσων των δύο υποδοχέων μέσω αμοιβαίων φωσφορυλιώσεων. Το σήμα των ορμονών BR μεταφέρεται στον πυρήνα μέσα από τις πρωτεΐνες BRI1, BSK1 και BSU1, οι οποίες παρεμποδίζουν της δράσης της κινάσης BIN2, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αποφωσφορυλίωση και τη συσσώρευση των πρωτεϊνών BZR1 και BES1/BZR2 στον πυρήνα. Ο μεταγραφικός παράγοντας BES1/BZR2 ενεργοποιεί γονίδια τα οποία επάγονται από τα σινιάλα των ορμονών BR, όπως είναι τα *TCH4*, *CDC2B* (*Cell Division Control Protein-2 homolog B*) και *KOR* (*Korrigan*), ενώ στη συνέχεια παρατηρείται

επιμήκυνση των κυττάρων καθώς και άλλες λειτουργικές αποκρίσεις στο σήμα των ορμονών BR. Η πρωτεΐνη BES1 δεν δρα μεμονωμένα αλλά συνεργάζεται με τις πρωτεΐνες BIM (BES1-Interacting Myc-like proteins), οι οποίες ανήκουν σε μια διαφορετική οικογένεια πρωτεϊνών που συνδέονται στο DNA. Η πρωτεΐνη BZR1 όπως και η πρωτεΐνη BES/BZR2 ενεργοποιεί τα γονίδια που επάγονται από τα σιγνάλα των ορμονών BR και προάγει την επιμήκυνση των κυττάρων. Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη αυτή καταστέλλει τα γονίδια βιοσύνθεσης των ορμονών BR, όπως το CPD, οδηγώντας σε καταστολή της ανατροφοδότησης της βιοσύνθεσης των ορμονών BR. Συνεπώς, οι μεταγραφικοί παράγοντες BZR1 και BES1/BZR2 ορίζουν την τύχη δύο επικαλυπτόμενων λειτουργιών στο μονοπάτι των ορμονών BR (Εικόνα 14)(He J.X et al., 2005).



Εικόνα 14. Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων BZR1 και BES1/BZR2 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των ορμονών BR.

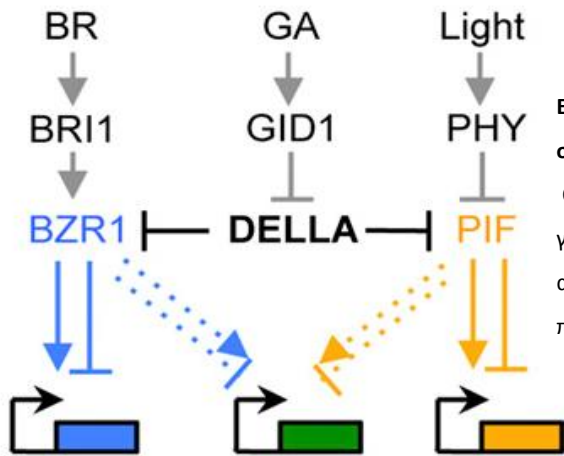
Απουσία των ορμονών BR, η πρωτεΐνη BIN2 φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες BZR1 και BES1/BZR2 και τις σημαίνει με την ουμπικουιτίνη ώστε να οδηγηθούν για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Έτσι, κανένα σήμα από τις ορμόνες BR δε φτάνει στον πυρήνα. Αντίθετα, πρόσδεση των ορμονών BR προάγει το σχηματισμό του ετεροδιμερούς BRI1/BAK1 και οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινάσων των δύο υποδοχέων. Οι ορμόνες BR είτε συνδέονται απ' ευθείας στον υποδοχέα BRI1, είτε πρώτα συμπλοκοποιούνται με τις πρωτεΐνες SBP (Steroid Binding Protein), οι οποίες πρώτα πρέπει να υποστούν επεξεργασία από την καρβοξυπεπτιδάση της σερίνης. Πρόσδεση των ορμονών BR στον υποδοχέα BRI1 οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης του BRI1 με

αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δράσης της κινάσης BIN2, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αποφωσφορυλίωση και τη συσσώρευση των πρωτεϊνών BZR1 και BES1/BZR2 στον πυρήνα. Ο μεταγραφικός παράγοντας BES1/BZR2 σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες BIM ενεργοποιεί γονίδια τα οποία επάγονται από τα σιγνάλα των ορμονών BR, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας BZR1 όχι μόνο ενεργοποιεί τα γονίδια που επάγονται από τα σιγνάλα των ορμονών BR αλλά καταστέλλει και τα γονίδια βιοσύνθεσης των ορμονών BR (CPD), οδηγώντας σε καταστολή της ανατροφοδότησης της βιοσύνθεσης των ορμονών BR (Gampala S.S et al., 2007).

3.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων των μονοπατιών μεταγωγής σήματος BR και GA

Η ανάπτυξη των φυτών διαμορφώνεται από τη σύγκλιση πολλών περιβαλλοντικών και ενδογενών σημάτων. Οι μηχανισμοί όμως που επιτρέπουν την ενοποίηση τέτοιων σηματοδοτικών μονοπατιών παραμένουν ακόμα άγνωστοι. Μια τέτοια περίπτωση είναι και η από κοινού δράση του μονοπατιού των BR ορμονών και του μονοπατιού των GA ορμονών για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης κατά τη φωτομορφογένεση. Πολλές μελέτες σε επίπεδο φυσιολογίας υποστηρίζουν τη συνεργασία μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών. Ενδιαφέρουσες ενδείξεις για αυτή την αλληλεπίδραση σε επίπεδο φυσιολογίας παρουσιάζονται από τη μελέτη μεταλλαγμάτων στα δύο αυτά μονοπάτια, όπου παρατηρούνται διάφοροι βαθμοί παρόμοιων φαινοτύπων, όπως είναι ο νανισμός, η μειωμένη βλάστηση των σπόρων καθώς και η καθυστέρηση στο χρόνο άνθησης των φυτών (Sun T.P, 2011; Clouse S.D. 2011; Jaillais Y and Chory J, 2010). Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι οι δύο αυτές ορμόνες δρουν συνεργιστικά για την επιμήκυνση του υποκοτυλίου σε σπορόφυτα *Arabidopsis thaliana* που καλλιεργούνται σε συνθήκες φωτός (Tanaka K et al., 2003). Όμως, παρά τις φυσιολογικές ενδείξεις για αλληλο-επικαλυπτόμενες δράσεις μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών, η σχέση των μονοπατιών αυτών σε μοριακό επίπεδο παραμένει ασαφής.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα από γενετικές, βιοχημικές και γονιδιωματικές αναλύσεις συνηγορούν στην άποψη ότι τα μονοπάτια των ορμονών GA και BR δρουν συνεργιστικά μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ βασικών στοιχείων του κάθε μονοπατιού. Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν εντοπιστεί μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα BZR1 του μονοπατιού BR και των πρωτεϊνών GAI (Gallego-Bartoloméa J et al., 2012) και RGA (Bai M.Y et al., 2012)(πρωτεΐνες DELLA) του μονοπατιού GA. Οι πρωτεΐνες RGA και GAI απενεργοποιούν τη μεταγραφική ενεργότητα του BZR1 εμποδίζοντάς το να συνδεθεί στους εκκινητές-στόχους. Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων έχει προταθεί ένας μοριακός μηχανισμός δράσης μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των ορμονών BR και GA και του μονοπατιού που επάγεται από το φως. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, όπως φαίνεται και στην εικόνα 15, η δράση μεταξύ των ορμονικών μονοπατιών GA και BR βασίζεται στην απενεργοποίηση του παράγοντα BZR1 από τις πρωτεΐνες DELLA. Τα παραπάνω αποτελέσματα, επίσης, προτείνουν την ύπαρξη μιας τρίτης ομάδας γονιδίων-στόχων των οποίων η έκφραση εξαρτάται τόσο από το BZR1 όσο και από τους παράγοντες PIFs (Gallego-Bartoloméa J et al., 2012).



Εικόνα 15. Μοντέλο απεικόνισης του μοριακού μηχανισμού σύνδεσης των τριών μονοπατιών.

Οι πρωτεΐνες DELLA ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μιας ομάδας γονιδίων, στο πλαίσιο της φωτομορφογένεσης, μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με το μεταγραφικό παράγοντα BZR1 και τις πρωτεΐνες PIFs (Gallego-Bartoloméa J et al., 2012).

Υλικά και Μέθοδοι

1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Το φυτικό είδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το *Nicotiana benthamiana*, καθώς η ανάπτυξη του στο εργαστήριο είναι εύκολη και γρήγορη και τα φύλλα του ενδείκνυνται για τους χειρισμούς που απαιτεί η παροδική έκφραση γονιδίων.

Για την ανάπτυξη των φυτών *Nicotiana benthamiana* κάτω από ασηπτικές συνθήκες χρησιμοποιείται ο θάλαμος νηματικής ροής (Laminair flow). Αρχικά, τα σπέρματα του φυτού ενυδατώνονται για 24h στους 40C και στη συνέχεια αποστειρώνονται σε διάλυμα 70% αιθανόλης ακολουθούμενο από διάλυμα 30% χλωρίνης. Έπειτα μεταφέρονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τριβλία που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, όπου «στρώνονται» σε σειρές (παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου). Τα τριβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22⁰C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 16ώρες φως/ 8ώρες σκοτάδι).

1.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS

- Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS με την ανάλογη σύσταση.
- Αποστείρωση του υποστρώματος για 20min στους 120⁰C.
- Γέμισμα των τριβλίων με περίπου 20ml θρεπτικού υποστρώματος μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminair flow) με τον οποίο επιτυγχάνονται αποστειρωμένες συνθήκες.
 - Τα τριβλία αφήνονται κλειστά μέσα στο θάλαμο ώστε να στερεοποιηθούν και στη συνέχεια ανοίγονται τα σκεπάσματα των τριβλίων για να εξατμιστούν οι υδρατμοί.
 - Τα τριβλία μπορεί να φυλαχθούν για περίπου 2 εβδομάδες στους 4⁰C.

1.2 Καλλιέργεια σπορόφυτων *Nicotiana benthamiana* σε στερεό θρεπτικό μέσο

- Η όλη διαδικασία γίνεται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος αρχικά έχει απολυμανθεί με αιθανόλη, για να εξασφαλιστούν οι ασηπτικές συνθήκες .
 - Η εκβλάστηση των σπερμάτων προϋποθέτει την επιτυχημένη έξοδό τους από την κατάσταση ληθάργου. Για να συμβεί αυτό, τα σπέρματα τοποθετούνται σε dH₂O ο/η στους 4⁰C.
 - Έπειτα γίνεται απολύμανση των σπερμάτων με 70% αιθανόλη για 15sec και αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη προστίθεται διάλυμα χλωρίνης 30% για 1-2min ανάλογα με την ποσότητα των σπερμάτων. Η όλη διαδικασία γίνεται μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος αρχικά έχει απολυμανθεί με αιθανόλη, για να εξασφαλιστούν οι ασηπτικές συνθήκες .
 - Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα της χλωρίνης γίνεται ξέπλυμα των σπερμάτων 5 φορές με ddH₂O για 1min τη φορά.

- Επίστρωση των σπορίων στην επιφάνεια υποστρώματος σε σειρές, σε στρογγυλά τριβλία Petri που περιέχουν στερεό θρεπτικό μέσο MS με τη βοήθεια πιπέτας Gilson.

- Τα τριβλία αφήνονται ανοιχτά να στεγνώσουν για περίπου 30min.

- Τέλος, τα τριβλία σφραγίζονται με ταινία parafilm και μεταφέρονται σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών (16h light/8h dark, 22°C).

- Τα σπόρια παρακολουθούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να διασφαλιστεί η πορεία της ανάπτυξής τους.

- Μετά από δύο εβδομάδες τα φυτά έχουν αναπτυχθεί αρκετά και έτσι μπορούν να μεταφερθούν σε γλαστράκια που περιέχουν χώμα. Για 3-4 μέρες μένουν καλυμμένα με διαφανή μεμβράνη προκειμένου να διατηρηθούν τα επίπεδα υγρασίας και τα φυτά να ξεπεράσουν το στρες της μεταφύτευσης. Όταν τα φυτά αναπτυχθούν αρκετά στηρίζονται με τη βοήθεια υποστηριγμάτων. Τα φυτά αναπτύσσονται στο θάλαμο μέχρι να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο και να γίνει η συλλογή σπερμάτων.

1.3 Θρεπτικά Διαλύματα Φυτών

MS (Murashige and Skoog medium)

- ✓ MS 0,44%

- ✓ Sucrose 2%

- ✓ MES 0,05%

- ✓ phytigel 0,3% ή agarose 0,6%

Η αγαρόζη χρησιμοποιείται ως στερεοποιητικός παράγοντας όταν προστίθεται αντιβιοτικό για την επιλογή μετασηματισμένων φυτών. Στα τριβλία που προορίζονται για την ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου Col χρησιμοποιείται ως στερεοποιητικός παράγοντας το phytigel .

2. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1 *Escherichia coli*

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση πλασμιδίων είναι το DH5a (*Escherichia coli*). Το στέλεχος αυτό έχει υψηλή ικανότητα μετασηματισμού (>2x10⁶ transformants/ μg of plasmid DNA). Ο γενότυπός τους χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της Δ(lacZ)M15 περιοχής που εκφράζει το καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την α-συμπληρωματικότητα με το lac a τμήμα που κωδικοποιείται από πολλούς πλασμιδιακούς φορείς. Έτσι είναι δυνατή η επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει X-gal και IPTG.

2.1.1 Προετοιμασία “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό

- Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους (DH5a) αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C.
- Μεταφορά 2ml από την αρχική καλλιέργεια σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB (αναλογία 1:100).
- Επώαση των κωνικών φιαλών στους 37°C (+shaker) μέχρι η οπτική πυκνότητα να γίνει $O.D._{550}=0.5$.
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο.
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε πλαστικό μπουκάλι και φυγοκέντριση για 5min στις 5000στροφές/λεπτό στους 4°C (πλήρης ισοζύγηση απαραίτητη). Κατακρήμιση των βακτηριακών κυττάρων.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο $CaCl_2$ 25mM. Προσθήκη όγκου ίσου με του μισού του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας.
- Επανάληψη ίδιου τρόπου κατακρήμισης.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος με παγωμένο $CaCl_2$ 75mM. Προσθήκη όγκου ίσου με το 1/15 του αρχικού όγκου της βακτηριακής καλλιέργειας.
- Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v. Απαιτείται πολύ καλή μίξη.
- Το δείγμα μοιράζεται σε φιαλίδια erpendorf και καταψύχεται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου.
- Αποθήκευση και διατήρηση των “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων στους -80°C.

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

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

2.2 Υπολογισμός αποδοτικότητας μετασηματισμού (Transform efficiency)

• Χωρίζουμε το τριβλίο σε τεταρτημόρια και μετράμε τις αποικίες σε ένα από αυτά. Έστω ότι έχουμε n αποικίες.

- Στο τριβλίο έχουμε: $4n=4n$ αποικίες.
- Έχουμε περίπου 10ng plasmid DNA. Οπότε:

$$\begin{array}{l} \text{στα 10ng έχουμε } 4n \text{ αποικίες} \\ \text{στα 1000ng} \quad \quad x? \\ x=400n \text{ αποικίες} \end{array}$$

Οι 400n αποικίες αντιστοιχούν στην ποσότητα που επιστρώθηκε. Έστω ότι επιστρώσαμε y μl από τα z μl που είχαμε αρχικά (στο erpendorf).

- Στα y μl που επιστρώσαμε έχουμε 400n αποικίες

$$\text{στα } z \text{ μl} \quad \quad \quad x?$$

$$x=400nz/y \text{ (αποικίες/}\mu\text{g πλασμιδιακού DNA)}.$$

• Για τον υπολογισμό transform efficiency των “δεκτικών” βακτηριακών κυττάρων: ικανοποιητικό εύρος αποδοτικότητας: $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ αποικίες/ μg πλασμιδιακού DNA.

2.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα Gram-αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους που ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae. Υπό φυσικές συνθήκες βρίσκεται στο έδαφος ή παρασιτεί στα φυτά (δικότυλα) προκαλώντας την ασθένεια του κορωνωτού κάλλου. Η παθογενετικότητά του εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη σε αυτό ενός μεγάλου πλασμιδίου μεγέθους 200-250Kb, το Ti- πλασμίδιο. Το Ti-πλασμίδιο διαθέτει γονίδια που επιτρέπουν την ενσωμάτωση ενός τμήματος του, γνωστό ως T-DNA, στο γονιδίωμα του φυτού-ξενιστή. Απομάκρυνση των γονιδίων παθογένειας με παράλληλη διατήρηση των γονιδίων μολυσματικότητας καθιστά το *A. tumefaciens* ιδανικό σύστημα μόνιμης ή παροδικής έκφρασης εξωγενών γονιδίων (ή DNA γενικότερα) σε φυτά μετά τη μόλυνσή τους με το βακτήριο.

2.3.1 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 CaCl₂. Διανομή 0.1ml ποσοτήτων σε προκρυωμένα φιαλίδια erpendorf.

- Αποθήκευση και διατήρηση των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων στους -80°C.

2.3.2 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium tumefaciens* με τη μέθοδο freeze-thaw

- Προσθήκη περίπου 1μg πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα.
- Πάγωμα των κυττάρων σε υγρό άζωτο*.
- 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 T1, όσο και του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα τα μετασηματισμένα κύτταρα επιστρώνονται σε τριβλίο LB/agar που περιέχει τα αντιβιοτικά. Ριφαμπικίνη (Rifampicin), Τζενταμικίνη (Gendamycin sulphate) και Καναμικίνη (Kanamycin) με τελικές συγκεντρώσεις 50μg/ml, 25μg/ml και 50μg/ml, αντίστοιχα.

- Επώαση στους 28°C.

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

2.4 Διαλύματα 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

Διαλύματα Αντιβιοτικών

✓ **Ampicillin:** 100mg/ml σε dH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C

- ✓ **Kanamycin:** 50mg/ml σε dH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C
- ✓ **Gentamicin sulphate:** 25mg/ml σε dH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C
- ✓ **Rifampicin:** 50mg/ml σε μεθανόλη. Φυλάσσεται στους -20°C

2.5 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

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

- Εμβολιάζουμε με μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους που θέλουμε να αποθηκεύσουμε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο (συνήθως LB ή TY) που περιέχει κάποιο αντιβιοτικό στο οποίο είναι ανθεκτικό το στέλεχος, με σκοπό να αποφύγουμε ενδεχόμενες μολύνσεις, και γίνεται επώαση στους 37°C με συνεχή ανάδευση για 12-16h.

- Στη συνέχεια, μεταφέρονται 700μl από την παραπάνω καλλιέργεια σε φιαλίδιο errendorf και προστίθονται 350μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%.

- Αναμιγνύουμε έντονα και ψύχουμε το φιαλίδιο με υγρό άζωτο.
- Τοποθετούμε τα κύτταρα στους -80°C όπου μπορούν να διατηρηθούν ζωντανά έως και 10 χρόνια.

2.6 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με Αλκαλική Λύση

- Μεταφορά 1.5ml από υγρή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε ο/η σε LB σε errendorf και φυγοκέντριση για 1min στις 13000r/min.

- Απομάκρυνση υπερκείμενου ώστε το ίζημα (pellet) να μείνει όσο πιο στεγνό γίνεται.
- Προσθήκη 0.2ml διαλύματος P1 και επαναδιάλυση του ιζήματος με πιπέτα

1ml διαλύματος P1:

- ✓ 920μl ddH₂O
- ✓ 50μl 1M Tris-HCl pH8
- ✓ 20μl 0.5M EDTA
- ✓ 10μl RNase 10mg/ml

- Προσθήκη 0.2ml διαλύματος P2, ελαφρά ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές και επώαση του errendorf με ανοιχτό καπάκι σε RT (θερμοκρασία δωματίου) για 4min.

1ml διαλύματος P2:

- ✓ 930μl ddH₂O
- ✓ 50μl 20% SDS
- ✓ 20μl 10N NaOH

- Προσθήκη 0.2ml παγωμένου διαλύματος 3M CH₃COOK/5M CH₃COOH και καλή ανάμιξη μέχρι να εμφανιστούν λευκά κομμάτια.

- Επώαση στον πάγο για 15min.
- Φυγοκέντριση για 20min στους 4°C στις 13000r/min.
- Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
- Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης Et-OH 70%(αιθανόλη) και καλή ανάμιξη.
- Επώαση για 10min σε RT.
- Φυγοκέντριση στις 13000r/min για 15min.
- Απομάκρυνση της Et-OH χωρίς τίναγμα και επώαση σε RT ανοιχτό για στέγνωμα.
- Προσθήκη 50ml dH₂O και επαναδιάλυση του ιζήματος.
- Αποθήκευση και διατήρηση στους -20°C.

2.7 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Για να δράσει ένα ένζυμο περιορισμού, δηλαδή να αναγνωρίσει και να “κόψει” μια νουκλεοτιδική αλληλουχία βάσεων, χρειάζεται κατάλληλες συνθήκες. Οι προϋποθέσεις, οι οποίες πρέπει να τηρούνται, είναι οι εξής:

Πρώτον, πρέπει να υπάρχει ένα υπόστρωμα που να περιέχει τουλάχιστον μια αλληλουχία έξι βάσεων, η οποία να αναγνωρίζεται από το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού. Το υπόστρωμα μπορεί να είναι πλασμιδιακό DNA, γενωματικό DNA ή DNA φάγου. Επίσης, 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 δρουν περιοριστικά στην απόδοση των ενζύμων.

Δεύτερον, η ποσότητα και η ποιότητα του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου (buffer) παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρέχονται συνήθως έτοιμα από την εταιρεία προέλευσης μαζί με το ένζυμο περιορισμού. 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 παράγοντας 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% του τελικού όγκου της αντίδρασης. Ο όγκος της αντίδρασης όπου λαμβάνει χώρα η πέψη κυμαίνεται μεταξύ 30-50μl.

Σε φιαλίδιο erpendorf προσθέτουμε:

- ✓ 10x ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): 10% του τελικού όγκου
- ✓ Δείγμα DNA: μέχρι 80% του τελικού όγκου
- ✓ Ένζυμο περιορισμού: μέχρι 10% του τελικού όγκου

- ✓ ddH₂O: μέχρι το 100% του τελικού όγκου

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

Ρυθμιστικά Διαλύματα Πέψεων

- ✓ **NEBuffer 1:** 10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, pH7.0 at 25°C
- ✓ **NEBuffer 3:** 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 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
- ✓ **10% BSA:** 10gr/ 100ml dH₂O. Αποθήκευση στους 40C

2.8 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.

Παρασκευή

- Σε διάλυμα 1xTAE προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα γίνει διαφανές.
- Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνουμε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα χρωστικής 5x dye.
- Μετά την πήξη απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται κατάλληλος όγκος 1xTAE, που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής που δημιουργήθηκαν από τη χτένα.
- Λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, που ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη. Τα δείγματα μεταναστεύουν από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο αφού είναι αρνητικά φορτισμένα.

- Αν θέλουμε να εκτιμήσουμε το μέγεθος των ζωνών του DNA (μετά από πέψη), ηλεκτροφορούμε δίπλα στα δείγματά μας δείκτες (ladders) οι οποίοι έχουν καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

	Πηκτή αγαρόζης 0.8% (100ml)	Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (1000ml)
dH ₂ O	98ml	980ml
TAE 50x	2ml	20ml
EtBr	5μl	50μl
Agarose	0.8gr	-

5x χρωστικό διάλυμα 10ml	6x χρωστικό διάλυμα 10ml
1.25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης (BPB)	2ml από 5x χρωστική
1.25% (w/v) κυανολοξυλένιο (XC)	Διαλυτοποίηση 5gr soucrose
dH ₂ O μέχρι τα 10ml	dH ₂ O μέχρι τα 10ml

2.9 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 με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Εφόσον ο διαχωρισμός του κλάσματος, που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα 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).

2.10 Ενοποίηση Τμημάτων DNA με Πλασμιδιακό Φορέα

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

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς, pSPYNE, pSPYCE, pGADT7 και pGBKT7. Η κάθε αντίδραση ενοποίησης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl.

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται:

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

$Αναλογία = \frac{μέγεθος\ φορέα\ (Kb) \times ng\ τμήματος\ DNA}{ng\ φορέα \times μέγεθος\ τμήματος\ DNA\ (Kb)}$.

Συνήθως χρησιμοποιείται αναλογία ίση με τη 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 (3 Weiss units).

✓ ddH₂O μέχρι συμπλήρωση του όγκου της αντίδρασης.

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

Διαλύματα

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

3. ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ (YEAST2HYBRID)

Ο έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Clontech: Yeast Protocol HandBook (PT3024-1).

3.1 Μετασηματισμός κυττάρων ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*)

Η δημιουργία δεκτικών κυττάρων ζύμης και ο μετασηματισμός τους βασίζεται στη χρήση του Lithium Acetate.

- Μεταφορά σε erpendorf 1,5ml υγρής καλλιέργεια κυττάρων ζύμης που αναπτύσσονται σε YPD στους 30°C. Η καλλιέργεια θα πρέπει να είναι φρέσκια και προσέχουμε να μην υπάρχουν μολύνσεις.

- Γίνεται φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 2.000 rpm για 1min.

- Ακολουθεί απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1ml ddH₂O με τη βοήθεια πιπέτας.

- Γίνεται και πάλι φυγοκέντρηση του εναιωρήματος στις 2.000 rpm για 1min και απομάκρυνση του υγρού με τη βοήθεια πιπέτας.

- Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1ml LiAc 100mM. Ακολουθεί επώασή του στους 30°C για 5min.

- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm για 1min. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται με τη βοήθεια μικροπιπέτας.

- Στο ίζημα κυττάρων ζύμης προστίθενται με τη σειρά:

- ✓ 240μl PEG (50% w/v)
- ✓ 36μl LiAc 1M
- ✓ 25μl carrier DNA
- ✓ 5μl πλασμιδιακό DNA (100μg -50μg)
- ✓ 45μl ddH₂O

- Το ίζημα των κυττάρων ζύμης αιωρείται στο μείγμα μετασχηματισμού (vortex) και ακολουθεί θερμική καταπόνηση στους 42⁰C για 20min.

- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 1min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό με μικροπιπέτα.

- Το ίζημα κυττάρων ζύμης αιωρείται σε 200-400μl θρεπτικού YPD και στρώνεται σε τριβλία ώστε να γίνει η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

3.2 Διαλύματα καλλιέργειας κυττάρων ζύμης

Θρεπτικό μέσο YPD :

- ✓ 1% (w/v) yeast extract
- ✓ 2% (w/v) D-glucose
- ✓ 2% (w/v) peptone

Για στερεό θρεπτικό μέσο προσθέτουμε και 2% agarose

Θρεπτικό μέσο SD-2 :

- ✓ 0,67% (w/v) yeast base
- ✓ 2% (w/v) D-glucose
- ✓ 0,14% (w/v) amino acids
- ✓ 20mg/L Histidine
- ✓ 20mg/L Uracil
- ✓ Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N

Για στερεό θρεπτικό μέσο προσθέτουμε και 1.4% agarose

Θρεπτικό μέσο SD-3 :

- ✓ 0,67% (w/v) yeast base
- ✓ 2% (w/v) D-glucose
- ✓ 0,14% (w/v) amino acids
- ✓ 20mg/L Uracil
- ✓ Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N

Για στερεό θρεπτικό μέσο προσθέτουμε και 1.4% agarose.

4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - PCR

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

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x	1x	5μl
dNTPs	10mM από καθένα	200μM	1μl
Άνω εκκινητής	10μM	200nM	1μl
Κάτω εκκινητής	10μM	200nM	1μl
DNA μήτρα	-	-	Ποικίλει
DNA πολυμεράση	5 u/μl	1u	0,2μl
sddH ₂ O	Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl		

Το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης άλλες φορές περιέχει MgCl₂ και άλλες όχι, οπότε παρέχεται ξεχωριστά ως πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 25mM. Η ικανοποιητικότερη και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τελική συγκέντρωση ιόντων Mg⁺² είναι 1.5mM.

Κάθε ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προσθέτονται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.5ml κατάλληλο για αντιδράσεις PCR που είναι τοποθετημένος στον πάγο. Στη συνέχεια αναμειγνύονται καλά, φυγοκεντρώνονται για λίγο ώστε να συγκεντρωθούν στην άκρη του σωλήνα και τοποθετούνται στην κεφαλή της συσκευής MJ Research PT200 που έχει ήδη προγραμματιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα. Η συσκευή διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι και γι' αυτό δεν χρειάζεται η προσθήκη λαδιού σε αντιδράσεις PCR.

Οι θερμοκύκλοι επιλέγονται με βάση το πρότυπο που παρουσιάζεται παρακάτω:

1x	α) Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 2min στους 94°C
25-40x	β) Αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στους 94°C για 30sec
	γ) Υβριδισμός εκκινητών συνήθως σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το T _m των εκκινητών για 30-40sec ⁽¹⁾
1x	δ) Επιμήκυνση στους 72 ή 68°C ⁽²⁾ για την Expand HiFi και στους 74°C για την Taq Invitrogen, για χρόνο που ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του πολυμερισμού και των προδιαγραφών του ενζύμου
	ε) Τελική επιμήκυνση και κατανάλωση του ενζύμου για 7-10min, στη θερμοκρασία επιμήκυνσης του κάθε ενζύμου

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

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

Η θερμοκρασία T_m υπολογίζεται από τον τύπο:

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

(2): Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος των αναμενόμενων προϊόντων. Για προϊόντα μέχρι 3Kb είναι 72°C , ενώ για προϊόντα μεγαλύτερα από 3Kb είναι 68°C .

Όταν τελειώσουν οι αντιδράσεις PCR, αναλύονται σε πηκτή αгарόζης 0.8-1.2% ανάλογα με το αναμενόμενο μήκος των αποτελεσμάτων.

Οι αντιδράσεις PCR αποθηκεύονται στους -20°C .

Διαλύματα αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

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

4.1 PCR αποικιών (colony PCR)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε ποια τμήματα DNA έχουν υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Στην περίπτωση που είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει να έχει υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα, μπορούν να σχεδιαστούν συγκεκριμένοι εκκινητές (primers) και να πιστοποιήσουμε τοιούτοτρόπως την παρουσία της ένθεσης.

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

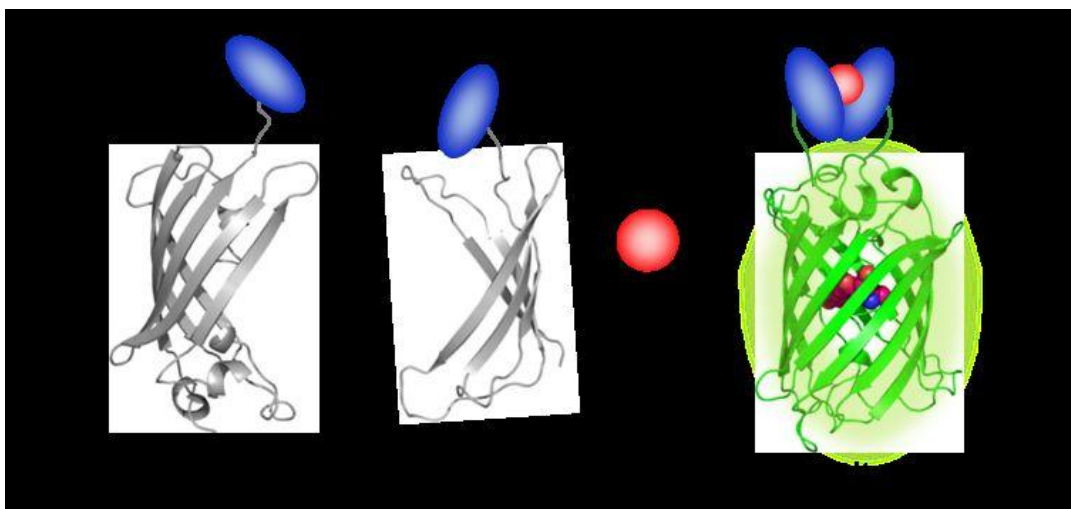
- Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf τοποθετούνται 15μl ddH₂O.
- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγουμε τη βακτηριακή αποικία από το στερεό υπόστρωμα και την τοποθετούμε στο erpendorf.
- Προετοιμάζουμε τα δείγματα για την αντίδραση PCR μόνο που αντί για DNA χρησιμοποιούμε 6μl από το βακτηριακό αιώρημα.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του αναμενόμενου τμήματος. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 25.

- Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα τα αποτελέσματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης. Για τις θετικές αποικίες μεταφέρουμε τα υπόλοιπα 7μl σε θρεπτικό μέσο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν χρησιμοποιούνται για περαιτέρω επεξεργασία ή αναμιγνύονται με γλυκερόλη για αποθήκευση στους -80°C.

5. BiFC (BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION) - SPLIT GFP ΣΕ *Nicotiana Benthamiana*

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς για τη μελέτη της τοπολογίας πρωτεϊνών, φαινόμενων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και έκφρασης γονιδίων. Με τη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, η κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης GFP μπορεί να συζευχθεί με άλλες πρωτεΐνες και να σχηματιστεί μια πρωτεΐνη υβρίδιο. Τα υβρίδια αυτά χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση in vivo ιστοειδικής και υποκυτταρικής τοπολογίας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Σε πειράματα in vitro οι πρωτεΐνες υβρίδια χρησιμοποιούνται για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών. Σε μελέτες έκφρασης γονιδίων, η πρωτεΐνη GFP τοποθετείται πίσω από τον κατάλληλο προαγωγέα ή την κατάλληλη ρυθμιστική αλληλουχία και χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς της μεταγραφικής δραστηριότητας. Η πρωτεΐνη GFP παρουσιάζει μοναδικά πλεονεκτήματα ως γονίδιο αναφοράς στις παραπάνω εφαρμογές καθώς διαθέτει τη δυνατότητα έκφρασης σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους κυττάρων χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη υποστρωμάτων ή συμπαραγόντων. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης είναι άμεσος, σταθερός, και άμεσα ανιχνεύσιμος χρησιμοποιώντας τις κλασσικές τεχνικές της μικροσκοπίας φθορισμού.

Η πρωτεΐνη αγρίου τύπου έχει ένα μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης στα 395 nm και ένα μικρότερο στα 475 nm, ενώ εκπέμπει φωτεινό πράσινο χρώμα με μέγιστο εκπομπής στα 508 nm. Ενδιαφέρον είναι ότι η διέγερση της πρωτεΐνης σε μήκος κύματος 395nm οδηγεί σε μείωση του χρόνου διέγερσης και σε αντίστοιχη αύξηση του χρόνου διέγερσης στα 475nm.



Εικόνα 16: Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in planta* σύμφωνα με το σύστημα SPLIT-GFP. Μια φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) χωρίζεται στα δύο και κάθε μια από τις δύο υπομονάδες είναι ανίκανη να παράγει φθορισμό. Όταν όμως πραγματοποιείται πρωτεϊνική σύντηξη της κάθε υπομονάδας με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, τότε οι δύο υπομονάδες έρχονται κοντά και η φθορίζουσα πρωτεΐνη έρχεται στην αρχική της μορφή δημιουργώντας ένα λειτουργικό φθοροφόρο.

5.1 Παροδική Έκφραση σε Φύλλα Καπνού

- 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), τζενταμικίνη (Gen) και καναμικίνη (Kan)]. Ανάπτυξη για 1-2 ημέρες, έως ότου θολώσει καλά.

- Ακολουθεί επανακαλλιέργεια κατάλληλης ποσότητας κυττάρων (800μl) σε 20ml καθαρού θρεπτικού μέσου (LB) και τις αφήνουμε να αναπτυχθούν για 5-6 hrs στους 28°C.

- Ανά διαστήματα οι καλλιέργειες φωτομετρούνται σε OD₆₀₀ έως ότου φτάσει η OD τα επιθυμητά επίπεδα (0,7).

- Μεταφορά της καλλιέργειας σε falcon και φυγοκέντρηση στις 4.000g για 15min.

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο infiltration media. 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 infiltration (για το ρ19→ 1, για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες→0,7).

- Ακολουθεί επώαση για 1,5hrs σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προετοιμασία του διαλύματος εμβολισμού αναμειγνύοντας ίσες ποσότητες από μετασχηματισμένα αγροβακτήρια.

- Εμβολιασμός αποαξονικής επιφάνειας φύλλων καπνού.

- Παρατήρηση της υποδερμίδας των φύλλων μετά από 65h-72h με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου OLYMPOUS U-CMAD3. Το μικροσκόπιο φέρει φωτογραφικό φακό τύπου OLYMPOUS DX50.

Διάλυμα διήθησης (Infiltration media)

- ✓ 10mM MES
- ✓ 10mM MgCl₂
- ✓ 150μM acetosyringone
- ✓ pH 5.7

5.2 Απομόνωση πρωτοπλαστών

• Φύλλα καπνού *Nicotiana bethiana* βάρους 1,5gr κόβονται σε μικρά κομμάτια (1cm X 1cm) με τη βοήθεια νυστεριού και λαβίδας και τοποθετούνται σε άδειο τριβλίο παρουσία μαννιτόλης 0,5M. Αντί για τριβλία Petri μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρά titer plate των 9 θέσεων.

• Το τριβλίο τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και τα μικρά κομμάτια φύλλων πλασμολύονται σε διάλυμα μαννιτόλης 0,5M για 3h. Η πλασμόλυση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός.

• Απομάκρυνση του διαλύματος μαννιτόλης και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ενζύμων-κυτταρινασών (enzyme solution).

- Το τριβλίο τυλίγεται και πάλι με αλουμινόχαρτο και επώαζεται στους 10⁰C ο/ν.
- Την επόμενη μέρα γίνεται μεταφορά του διαλύματος με τους πρωτοπλάστες σε erpendorf.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.800rpm για 10min.
- Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο.

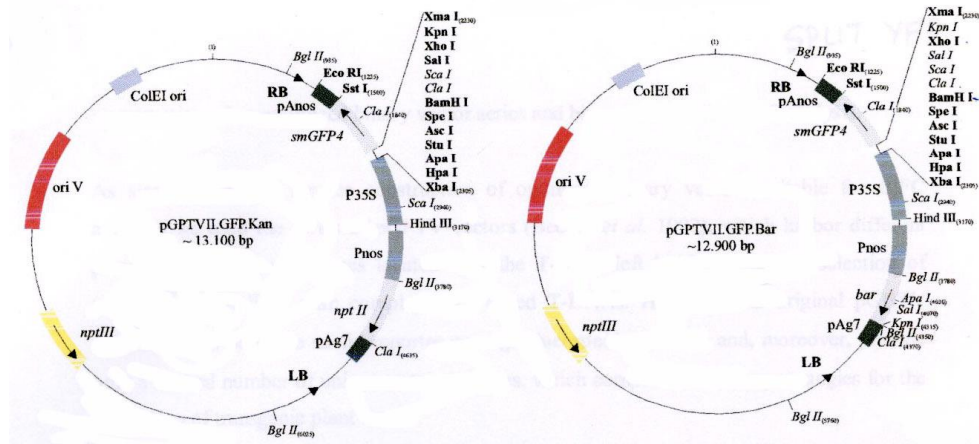
Enzyme solution

- ✓ 0,5M Mannitol
- ✓ 8mM CaCl₂
- ✓ 1% Cellulase
- ✓ 0,25% Macerozyme
- ✓ pH 5,5 (0,1M KOH)

5.3 Πλασμιδιακοί φορείς (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 pSPYNE και pSPYCE (split YFP N-terminal/C-terminal fragment expression) και έχουν μέγεθος 13.1kb και 12.9kb αντίστοιχα. Επιπλέον, περιέχουν τον καθολικό προαγωγέα 35S και μία περιοχή αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού (MCS, Multiple Cloning Site) για τη διευκόλυνση κλωνοποίησης τμημάτων. Κάθε φορέας παρέχει τη δυνατότητα

της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται συντηγμένες είτε στο N-άκρο (YFPN) είτε στο C- άκρο (YFPC) της YFP πρωτεΐνης.



Εικόνα 17. Χάρτης πλασμιδιακών φορέων pSPYNE και pSPYCE.

Οι πλασμιδιακοί φορείς pSPYNE (pGPTVII.GFP.Kan) και pSPYCE (pGPTVII.GFP.Bar) χρησιμοποιούνται ως φορείς αλληλεπίδρασης στο σύστημα SPLIT-GFP.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη του ρόλου του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών και γιββερελλινών ορμονών

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι HSP90 πρωτεΐνες απαντώνται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στα κύτταρα των οργανισμών καθώς αποτελούν το 1-2% των συνολικών διαλυτών κυτταρικών πρωτεϊνών (Lai B.T et al., 1984). Η οικογένεια των HSP90 μοριακών συνοδών είναι ευρέως διαδεδομένη από τους κατώτερους ευκαρυώτες μέχρι την κορυφή της ιεραρχίας, τον άνθρωπο. Έχει εκτιμηθεί ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούν περίπου το 1% του πρωτεώματος μη καταπονημένων κυττάρων, το οποίο τις κατατάσσει μέσα στις πιο άφθονες πρωτεΐνες των οργανισμών (Lai B.T et al., 1984). Παρ' όλα αυτά όμως, οι HSP90 θεωρούνται ένα άκρως εξειδικευμένο σύστημα μοριακού συνοδού.

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

Βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών (BR) και γιββερελλινών (GA) ορμονών. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών με βασικές πρωτεΐνες των μονοπατιών των BR και GA ορμονών. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν δύο συμπληρωματικές πειραματικές προσεγγίσεις: μία προσέγγιση *in planta*, κατά την οποία έλαβε χώρα παροδικός μετασχηματισμός φύλλων του φυτού *Nicotiana Benthamiana* με κατάλληλες *gfp* κατασκευές. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατασκευών μελετήθηκαν *in planta* με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Στα πλαίσια της προσέγγισης αυτής ελέγχθηκαν πιθανά σημεία εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στα παραπάνω μονοπάτια. Η δεύτερη πειραματική *in vivo* προσέγγιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος δυο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in planta*

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες RGA και SPY του μονοπατιού των GA ορμονών, επιλέχθηκε μια σειρά τεχνικών οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναδείξουν την πρωτεϊνική αλληλεπίδραση. Η πρώτη τεχνική που επιλέχθηκε αφορά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης σε φυτικά κύτταρα. Η μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in planta*

προσομοιάζει τις φυσικές συνθήκες αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών στόχων, οπότε αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών που μελετούνται τότε είναι πιο εύκολο να αναδειχθεί.

Ένα ευρέως διαδεδομένο σύστημα ελέγχου αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε φυτικά κύτταρα είναι το SPLIT-GFP ή αλλιώς BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation). Το σύστημα αυτό στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι N-/C-τελικές υπομονάδες της πρωτεΐνης GFP δεν αποτελούν από μόνες τους λειτουργικές πηγές φθορισμού. Ωστόσο, όταν αυτές συγχωνευθούν με πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τότε οι δύο μη φθορίζουσες υπομονάδες της πρωτεΐνης έρχονται σε στενή επαφή και αναδιπλώνονται μαζί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας στα 475nm του υπεριώδους μήκους κύματος, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκόπιο φθορισμού.

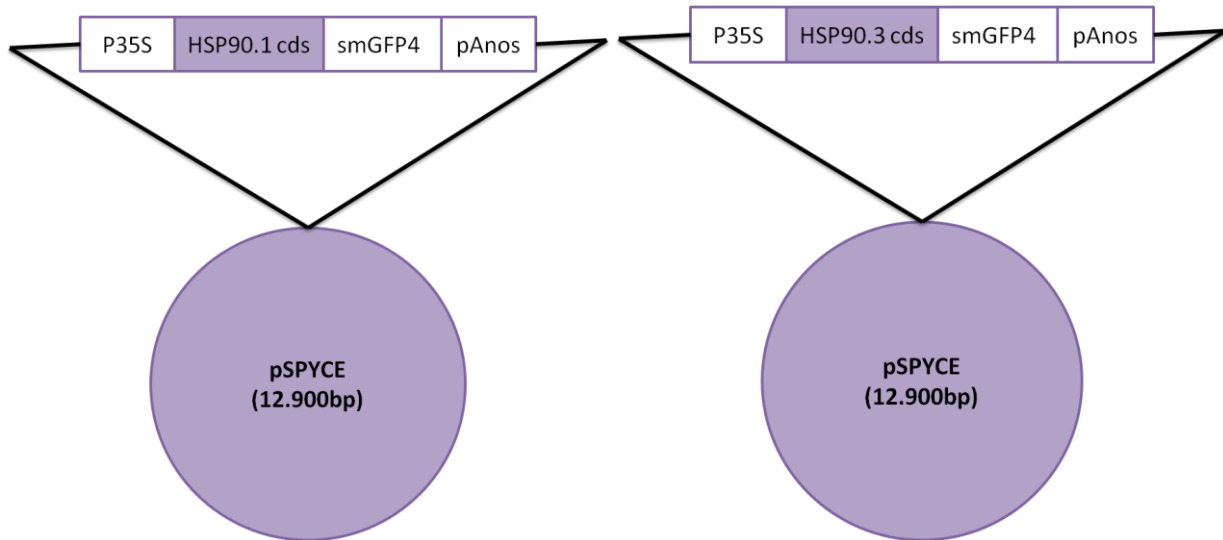
Αναλυτικά, το σύστημα περιέχει δύο πλασμιδιακούς φορείς, τον pSPYNE και τον pSPYCE όπου σε κάθε έναν είναι κλωνοποιημένη η άμινο-υπομονάδα και η καρβόξυ-υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες των οποίων επιθυμείται ο έλεγχος της αλληλεπίδρασής τους κλωνοποιούνται η μια σε κάθε φορέα στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την αντίστοιχη υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης. Στη συνέχεια μετασχηματίζονται κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* με την κάθε κατασκευή ξεχωριστά. Οι δυο καλλιέργειες των μετασχηματισμένων κυττάρων αναμιγνύονται σε ίσες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια πραγματοποιείται ένεση στην υποδερμίδα φύλλων καπνού *Nicotiana Benthamiana* όπου προκαλεί παροδικό μετασχηματισμό στα κύτταρα του καπνού. Μετά το πέρας 65-72 ωρών είναι δυνατή η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μέσω της ανίχνευσης της ακτινοβολίας φθορισμού που παράγεται με μικροσκόπιο φθορισμού. Προκειμένου όμως να μπορέσει να λειτουργήσει το σύστημα, απαιτείται η χρήση της πρωτεΐνης p19. Στον παροδικό μετασχηματισμό, οι εισερχόμενοι πλασμιδιακοί φορείς ανιχνεύονται ως εξωγενή μόρια DNA από τα κύτταρα με συνέπεια την επαγωγή του μηχανισμού της RNAi αποσιώπησης για την αντιμετώπιση της προσβολής. Η πρωτεΐνη p19 λειτουργεί ως καταστολέας της αποσιώπησης επιτρέποντας την έκφραση των πλασμιδιακών φορέων χωρίς άμεση καταστολή από το φυτικό οργανισμό.

2.1 Δημιουργία κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών RGA και SPY με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 με το σύστημα SPLIT-GFP

Ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκε μεταξύ των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών (κυτταροπλασματικά μέλη του Hsp90 συστήματος) και των RGA και SPY πρωτεϊνών (πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών). Κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων HSP90 κυτταροπλασματικών μελών αποτέλεσε το πρότυπο έκφρασής τους. Συγκεκριμένα το *HSP90.1* γονίδιο αποτελεί το καθαρά θερμοεπαγόμενο μέλος της οικογένειας, ενώ το γονίδιο *HSP90.3* παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης από τα τρία μέλη της οικογένειας που ανιχνεύονται ομαδοποιημένα στο χρωμόσωμα 5 του

Arabidopsis thaliana. Οι κατασκευές που περιέχουν τα γονίδια *HSP90.1* και *HSP90.3* κλωνοποιημένα στο φορέα pSPYCE υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο και παραθέτονται στην εικόνα 18.

GFP/90.1 και GFP/90.3

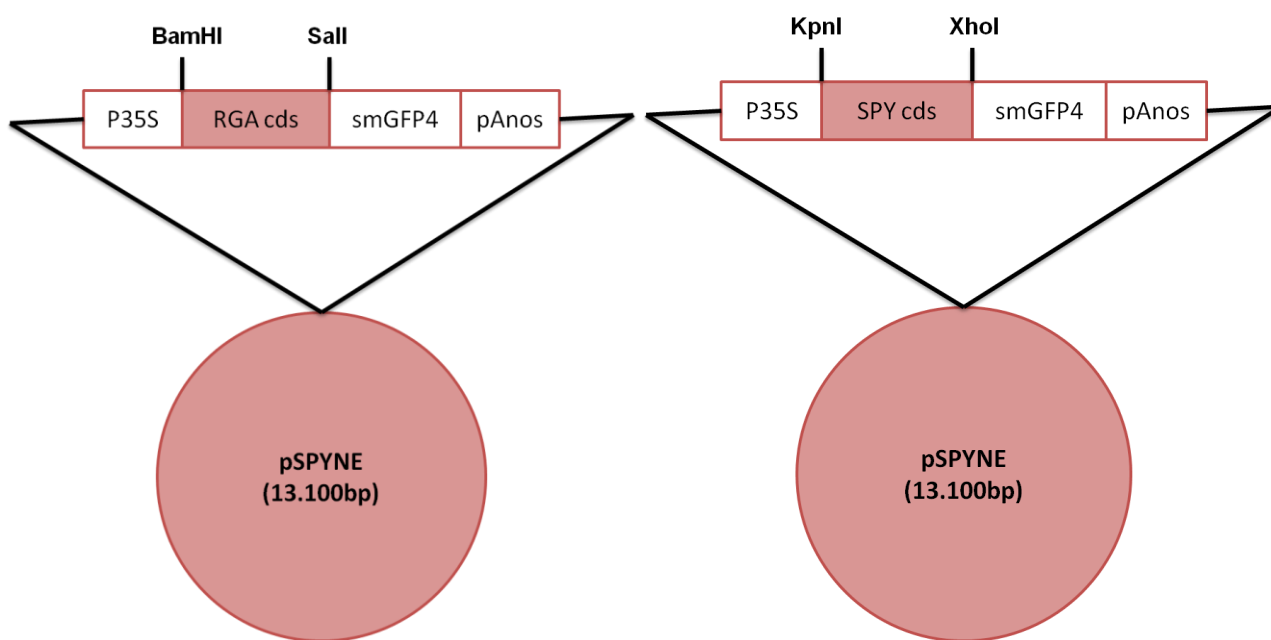


Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3.

Οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSPYCE σε μεταφραστική σύντηξη με την καρβοξυ-τελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης που περιέχει ο φορέας. Οι κασέτες έκφρασης καθοδηγούνται από τον καθολικό προαγωγέα 35S.

Για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών RGA και SPY με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 σχεδιάστηκαν κατασκευές που περιέχουν κλωνοποιημένα τα γονίδια *RGA* και *SPY* στον πλασμιδιακό φορέα pSPYNE. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του γονιδίου *RGA* είναι τα BamHI και Sall, ενώ για την κλωνοποίηση του γονιδίου *SPY* χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού KpnI και XhoI. Οι κατασκευές παραθέτονται στην εικόνα 19.

GFP/RGA και GFP/SPY



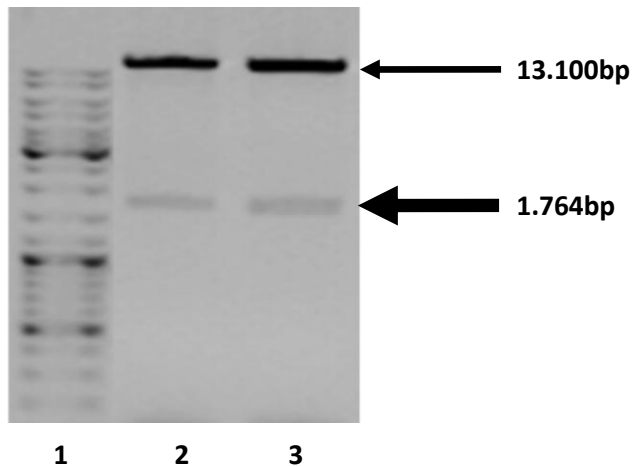
Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού των πρωτεϊνών RGA και SPY.

Τα γονίδια *RGA* και *SPY* κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSPYNE σε μεταφραστική σύντηξη με την αμινο-τελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης που περιέχει ο φορέας. Οι κασέτες έκφρασης καθοδηγούνται από τον καθολικό προαγωγέα 35S.

2.2 Κλωνοποίηση των γονιδίων *RGA* και *SPY* στο φορέα pSPYNE

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων *RGA* και *SPY* στο φορέα pSPYNE χρειάστηκε να γίνουν διπλές πέψεις του φορέα και των προς κλωνοποίηση γονιδίων με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Όπως φαίνεται και στις παραπάνω κατασκευές για την κλωνοποίηση του *RGA* χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα BamHI/Sall, ενώ για την κλωνοποίηση του *SPY* χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα KpnI/XhoI. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και οι αντίστοιχες ζώνες απομονώθηκαν. Στη συνέχεια έλαβε χώρα αντίδραση ενοποίησης των άκρων του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέτου. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την ενοποίηση ήταν η T4 DNA ligase (Promega). Ακολούθησε μετασχηματισμός κατάλληλων *E.coli* δεκτικών κυττάρων και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (Καναμυκίνη).

Η κλωνοποίηση του γονιδίου *RGA* έδωσε δύο αποικίες οι οποίες ελέχθησαν για την παρουσία του ενθέτου με διπλή πέψη επιβεβαίωσης με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/Sall. Τα αναμενόμενα προϊόντα της πέψης είναι στις 1.764bp και 13.100bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 20).



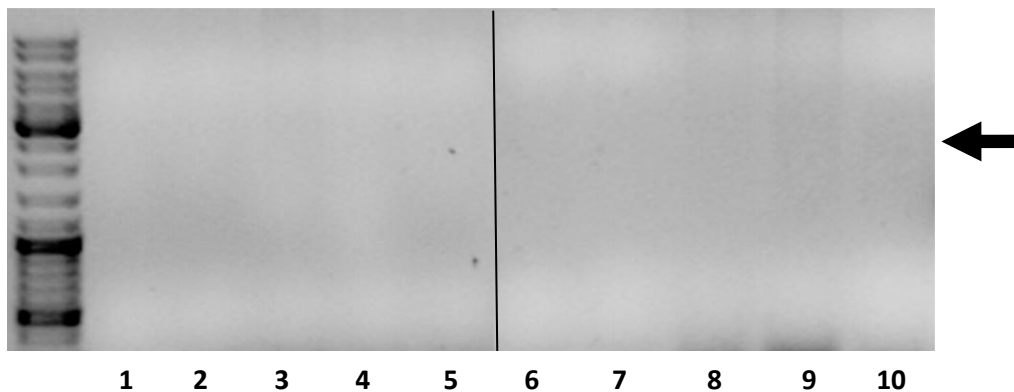
Εικόνα 20: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των πλασμιδιακών κλώνων μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI/*Sal*I για ανίχνευση της ένθεσης του γονιδίου *RGA* στο φορέα *pSPYNE*.

2 και 3: Και οι δύο αποικίες που αναλύθηκαν περιέχουν το ένθετο και δίνουν το αναμενόμενο πρότυπο στις 1.764bp και 13.100bp.

1: μάρτυρας μοριακών βαρών, Gene Ruler ladder mix.

Όπως φαίνεται στην πηκτή αγαρόζης και οι δύο αποικίες του μετασχηματισμού περιέχουν το γονίδιο *RGA*. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η αποικία 2 για περαιτέρω χειρισμούς.

Η κλωνοποίηση του γονιδίου *SPY* έδωσε πολλές περισσότερες αποικίες στα τριβλία του μετασχηματισμού από τις οποίες επιλέχθηκαν τυχαία 50 για να ελεγχθούν για την παρουσία του ένθετου τμήματος με χρήση της colony PCR (βλ. υλικά κ μέθοδοι). Οι 50 αποικίες ομαδοποιήθηκαν σε πεντάδες ανά μία αντίδραση PCR. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές και τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 21).



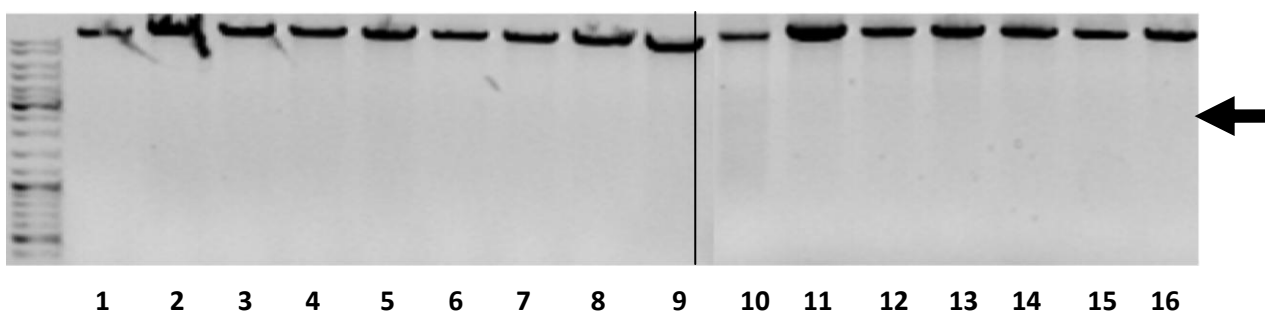
Εικόνα 21. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των προϊόντων PCR αντίδρασης για την επαλήθευση της κλωνοποίησης του γονιδίου *SPY* στο φορέα *pSPYNE*.

Όπως φαίνεται στην πηκτή αγαρόζης καμία από τις δέκα PCR αντιδράσεις δεν περιέχει το ένθετο. Αυτό συνεπάγεται ότι σε καμία από τις 50 αποικίες δεν έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο *SPY*. Το βέλος υποδεικνύει το σημείο που θα έπρεπε να εντοπιστεί η ζώνη αν η κλωνοποίηση είχε δώσει κάποια θετική αποικία.

Όπως γίνεται φανερό στην εικόνα 21 η κλωνοποίηση του γονιδίου *SPY* στο φορέα *pSPYNE* δεν έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Έτσι ακολούθησε επανάληψη της διαδικασίας κλωνοποίησης με διπλές πέψεις του φορέα κλωνοποίησης και του γονιδίου *SPY* με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και οι αντίστοιχες ζώνες απομονώθηκαν. Στη συνέχεια έλαβε χώρα

αντίδραση ενοποίησης των άκρων του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέτου. Ακολούθησε μετασχηματισμός κατάλληλων *E.coli* δεκτικών κυττάρων και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (Καναμυκίνη).

Η δεύτερη προσπάθεια κλωνοποίηση του γονιδίου *SPY* έδωσε 16 αποικίες οι οποίες ελέγχθηκαν για την παρουσία του ενθέτου με διπλή πέψη επιβεβαίωσης με τα ένζυμα περιορισμού *KpnI/XhoI*. Τα αναμενόμενα προϊόντα της πέψης είναι στις 2.745bp και 13.100bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 22).



Εικόνα 22. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των πλασμιδιακών κλώνων μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *KpnI/XhoI* για ανίχνευση της ένθεσης του γονιδίου *SPY* στο φορέα *pSPYNE*.

Όπως φαίνεται στην πηκτή αγαρόζης καμία από τις 16 αποικίες δεν περιέχει το ένθετο. Το βέλος υποδεικνύει το σημείο που θα έπρεπε να εντοπιστεί η ζώνη αν η κλωνοποίηση είχε δώσει κάποια θετική αποικία.

Όπως γίνεται φανερό στην εικόνα 22 ούτε η δεύτερη κλωνοποίηση έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η διαδικασία της κλωνοποίησης επαναλήφθηκε δύο ακόμα φορές και οι αποικίες του μετασχηματισμού ελέγχθηκαν για την παρουσία ή μη του ενθέτου. Καμία από τις επαναλήψεις δεν έδωσε κάποιο θετικό κλώνο κατάλληλο για περαιτέρω χειρισμούς, έτσι ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών συνεχίστηκε μόνο με την πρωτεΐνη RGA και τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3.

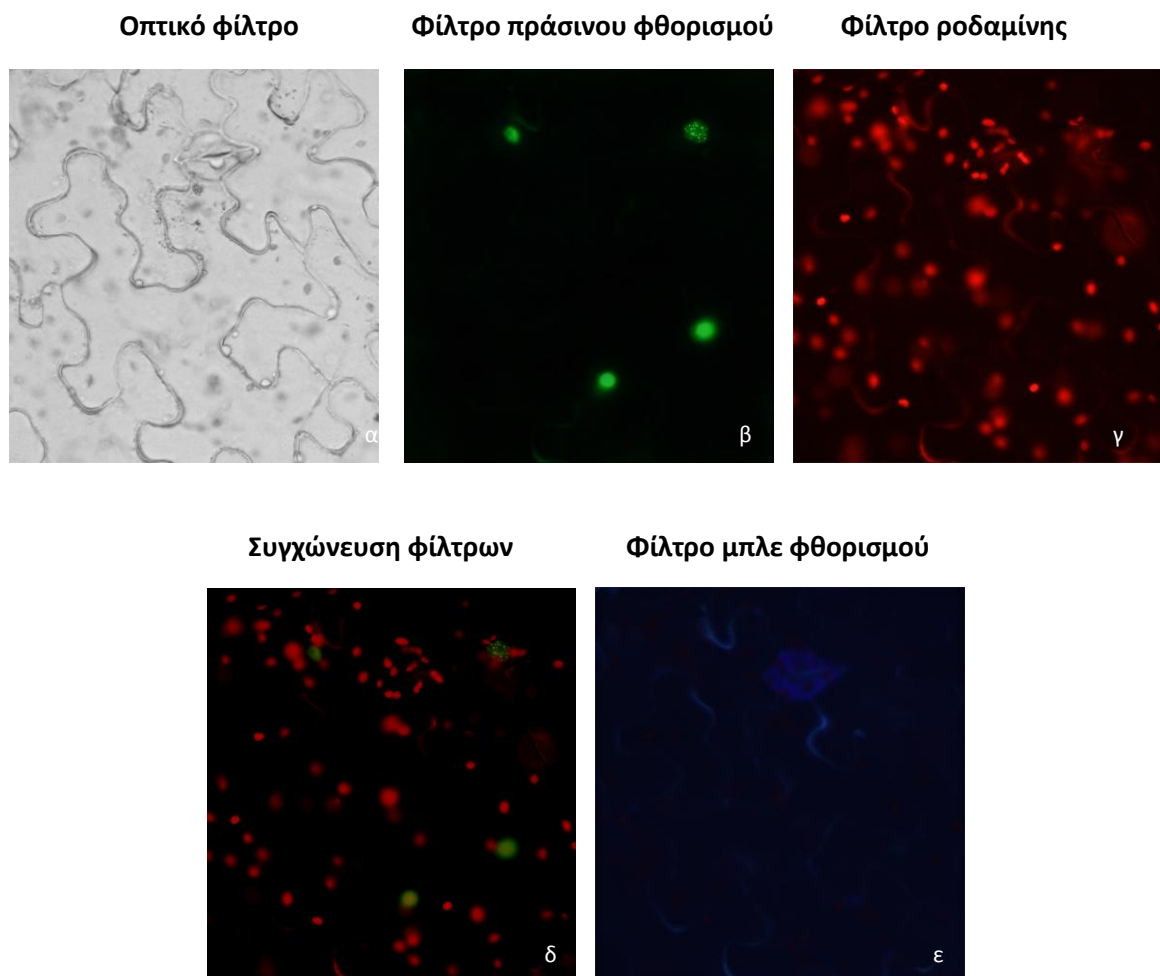
2.3 Αποτελέσματα SPLIT-GFP μεταξύ της πρωτεΐνης RGA και των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3

Όταν τα φυτά καπνού αναπτύχθηκαν τόσο ώστε να έχουν παράγει 4-6 ζευγάρια πραγματικών φύλλων, μετασχηματίστηκαν παροδικά με τους εξής συνδυασμούς πλασμιδίων: α) *pSPYNE:NbZIP/pSPYCE:CbZIP/p19*, β) *pSPYNE:RGA/pSPYCE:HSP90.1/p19* και γ) *pSPYNE:RGA/pSPYCE:HSP90.3/p19*. Εκτός από το συνδυασμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων, πραγματοποιήθηκε ακόμη ένας μετασχηματισμός για το θετικό έλεγχο της διαδικασίας. Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε η πυρηνική πρωτεΐνη *bZIP*, η οποία έχει χωριστεί σε δυο υπομονάδες που έχουν κλωνοποιηθεί σε κάθε πλασμιδιακό φορέα. Η αλληλεπίδραση οδηγεί σε λειτουργική πρωτεΐνη που τοποθετείται στον πυρήνα και το σήμα ανιχνεύεται

ως φθορισμός στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού. Για τον αρνητικό έλεγχο των αλληλεπιδράσεων έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν στο εργαστήριο μετασχηματισμοί με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pSPYNE σε συνδυασμό με τις pSPYCE:HSP90.1 και pSPYCE:HSP90.3 πρωτεΐνες, αντίστοιχα.

Μετά το πέρασ 65 ωρών από τον εμβολιασμό των φύλλων καπνού, παρατηρήθηκε η υποδερμίδα των φύλλων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η διαδικασία του μετασχηματισμού και της παρατήρησης των αλληλεπιδράσεων επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της παρατήρησης παρουσιάζονται στις εικόνες 23, 24 και 25.

NbZIP/CbZIP



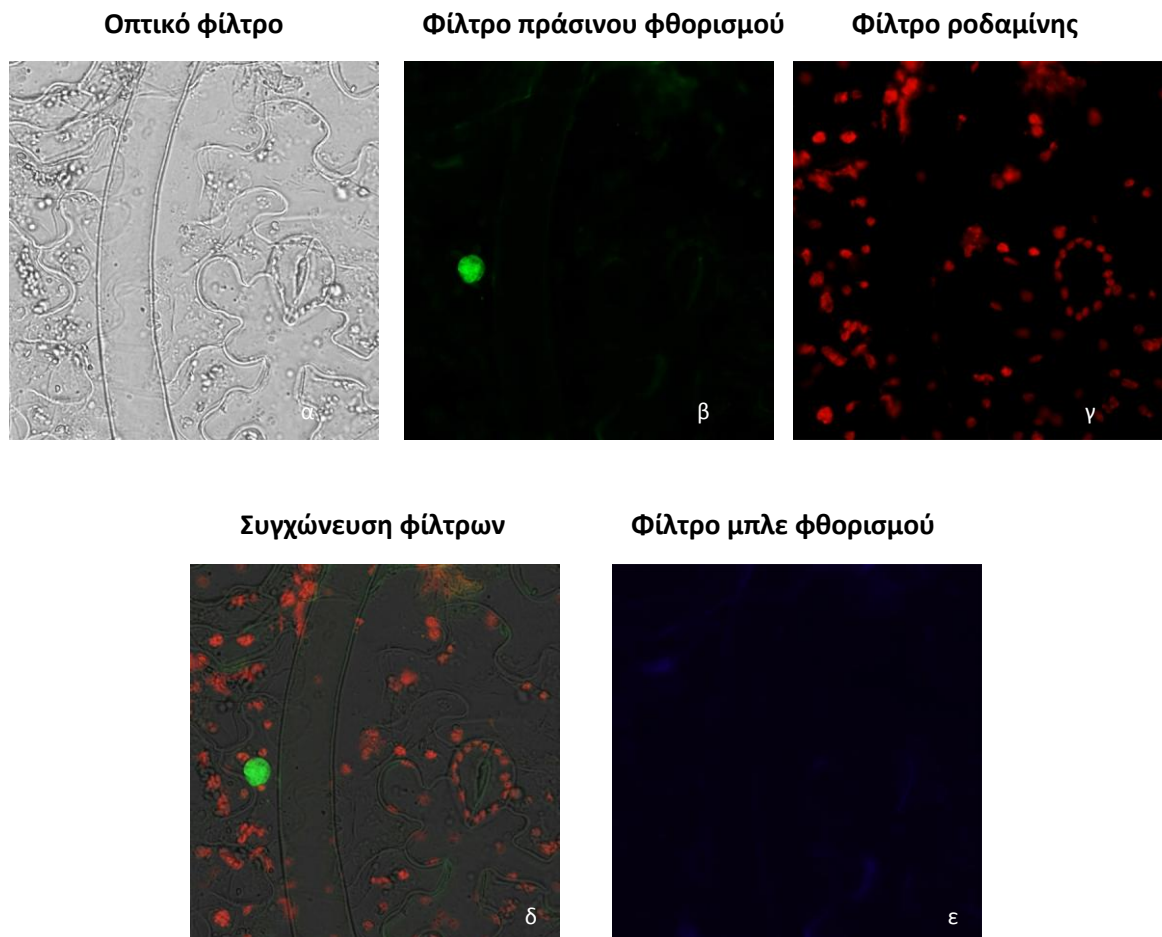
Εικόνα 23: Φωτογραφίες υποδερμίδων φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τον εξής συνδυασμό: pSPYNE:NbZIP, pSPYCE:CbZIP, p19.

Οι φωτογραφίες δείχνουν την παραγωγή σήματος στους πυρήνες των μετασχηματισμένων φύλλων καπνού έπειτα από την αλληλεπίδραση των δύο υπομονάδων της πρωτεΐνης bZIP. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης πάρθηκαν φωτογραφίες με διαφορετικά φίλτρα. Συγκεκριμένα στη φωτογραφία: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς

GFP, (γ) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των τριών φίλτρων (οπτικού, πράσινου και ροδαμίνης), (ε) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο μπλε φθορισμού για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης.

Η αλληλεπίδραση του θετικού ελέγχου λειτούργησε όπως ήταν αναμενόμενο και το αποτέλεσμα της ήταν σήμα υπό τη μορφή φθορισμού στους πυρήνες των μετασχηματισμένων κυττάρων του καπνού. Στη συνέχεια ακολούθησε η παρατήρηση των μετασχηματισμένων φύλλων καπνού για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων με τους εξής συνδυασμούς: α) RGA/HSP90.1 και β) RGA/HSP90.3. Επιπλέον φωτογραφίες από τις παρατηρήσεις των αλληλεπιδράσεων παρατίθενται στο Παράρτημα, στις εικόνες A1 και A2.

HSP90.1/RGA



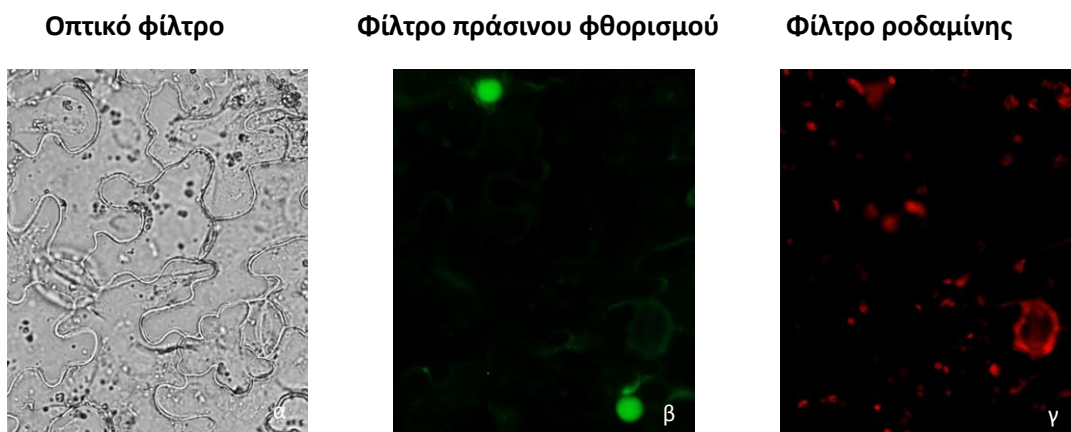
Εικόνα 24: Φωτογραφίες υποδερμίδων φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τον εξής συνδυασμό: pSPYNE:RGA, pSPYCE:HSP90.1, p19.

Οι φωτογραφίες δείχνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.1 και RGA σε πυρήνες μετασχηματισμένων φύλλων καπνού. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης πάρθηκαν φωτογραφίες από διαφορετικά φίλτρα. Συγκεκριμένα στη φωτογραφία: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, (γ) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των τριών φίλτρων (οπτικού, πράσινου και ροδαμίνης), (ε) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο μπλε φθορισμού για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης. Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμα επαναλήψεις.

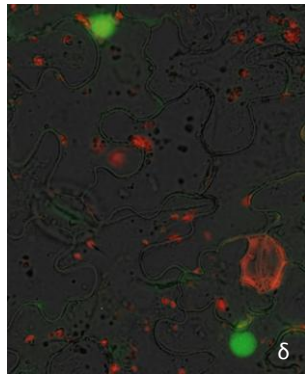
Τα αποτελέσματα από την παρατήρηση του παροδικού μετασχηματισμού με το συνδυασμό pSPYNE:RGA, pSPYCE:HSP90.1, έδειξαν την παρουσία σήματος φθορισμού στον πυρήνα των κυττάρων του καπνού. Το γεγονός ότι ανιχνεύεται φθορισμός στον πυρήνα είναι ένδειξη ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1:N-smGFP και RGA:C-smGFP παράγονται, εισέρχονται στον πυρήνα και αλληλεπιδρούν, φέρνοντας κοντά τις δυο υπομονάδες της GFP πρωτεΐνης και παράγοντας τη λειτουργική μορφή της που εκπέμπει ακτινοβολία στα 475nm. Η πρωτεΐνη RGA ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών DELLA, οι οποίες είναι αρνητικοί ρυθμιστές του μονοπατιού των GA ορμονών. Η δράση τους εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων όπου αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών πρωτεϊνών προκειμένου να ρυθμίζουν την επαγωγή ή καταστολή διαφόρων αναπτυξιακών μονοπατιών (Daviere J-M and Achard P, 2013). Πειραματικές μελέτες για τις πρωτεΐνες HSP90 αναφέρουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την τάση να εισέρχονται στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να εκδηλώσουν τη δράση τους.

Επόμενο βήμα της μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αποτέλεσε η παρατήρηση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης RGA και της πρωτεΐνης HSP90.3. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την παραπάνω. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 24.

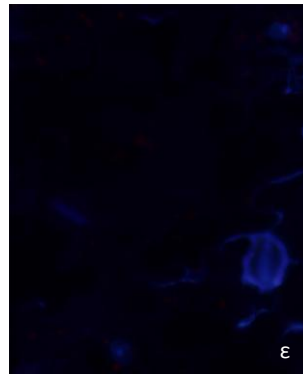
HSP90.3/RGA



Συγχώνευση φίλτρων



Φίλτρο μπλε φθορισμού



Εικόνα 25. Φωτογραφίες υποδερμίδων φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τον εξής συνδυασμό: rSPYNE:RGA, rSPYCE:HSP90.3, p19.

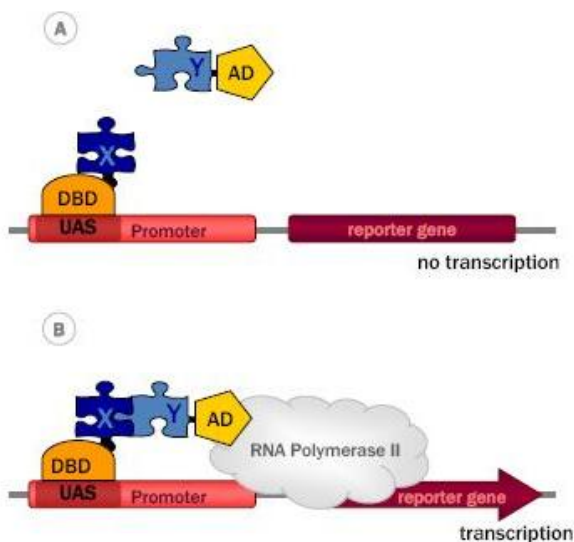
Οι φωτογραφίες δείχνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.3 και RGA σε πυρήνες μετασχηματισμένων φύλλων καπνού. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης πάρθηκαν φωτογραφίες από διαφορετικά φίλτρα. Συγκεκριμένα στη φωτογραφία: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, (γ) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των τριών φίλτρων (οπτικού, πράσινου και ροδαμίνης), (ε) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο μπλε φθορισμού για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης. Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμα επαναλήψεις.

Τα αποτελέσματα της παρατήρησης του παροδικού μετασχηματισμού με το συνδυασμό rSPYNE:RGA, rSPYCE:HSP90.3 έδειξαν ότι στον πυρήνα των κυττάρων της υποδερμίδας του καπνού εμφανίζεται φθορισμός υπό τη μορφή πράσινου σήματος. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι και η HSP90.3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RGA και η αλληλεπίδρασή τους τοποθετείται στον πυρήνα των κυττάρων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των πυρήνων που εμφάνισαν φθορισμό με το συνδυασμό RGA/HSP90.3 ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό των πυρήνων που εμφάνισαν φθορισμό με το συνδυασμό RGA/HSP90.1. Η ίδια παρατήρηση έγινε και στις τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας.

Η πρωτεΐνη HSP90.3 είναι αυτή που κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας με τις υπόλοιπες κυτταροπλασματικές HSP90 πρωτεΐνες. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι τα *HSP90* κυτταροπλασματικά γονίδια διαδραματίζουν πρωτεύον ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος των ορμονών GA στο φυτικό οργανισμό αφού αλληλεπιδρούν με μια κομβική πρωτεΐνη του μονοπατιού των γιββερελλινών ορμονών.

3. Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης

Στο σύστημα δυο υβριδίων χρησιμοποιούνται δυο πλασμιδιακοί φορείς. Ο ένας φορέας φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή της μεταγραφής και ο δεύτερος την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς με βάση το οποίο θα ελεγχτεί η αλληλεπίδραση. Σε κάθε φορέα κλωνοποιείται μια από τις δύο πρωτεΐνες που επιθυμείται να ελεγχτεί η αλληλεπίδρασή τους. Εφόσον οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, οι περιοχές πρόσδεσης στο DNA και ενεργοποίησης της μεταγραφής έρχονται κοντά, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς της Clontech pGBKT7, που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, και ο pGADT7, που φέρει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Το σχεδιάγραμμα ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς και λειτουργίας της μεθόδου παραθέτεται στην εικόνα 26.



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος δυο υβριδίων στη ζύμη.

Σε πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς αντίστοιχα, κλωνοποιούνται σε μεταφραστική σύντηξη οι πρωτεΐνες των οποίων επιθυμείται να ελεγχτεί η αλληλεπίδραση. Στη συνέχεια ακολουθεί μετασχηματισμός, ταυτόχρονα ή διαδοχικά, της ζύμης και με τους δυο πλασμιδιακούς φορείς. Η μεταγραφή για την παραγωγή του γονιδίου αναφοράς ξεκινά εφόσον οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Σε αυτή την περίπτωση έρχονται κοντά οι δύο ρυθμιστικές περιοχές και καθίσταται δυνατή η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς μέσω της δράσης της RNA πολυμεράσης.

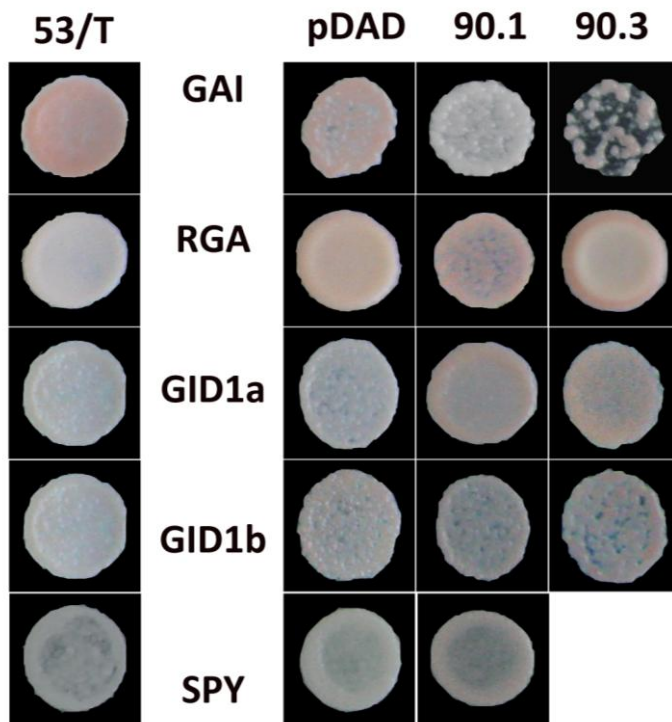
Για τα κύτταρα SG335 ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται με δύο τρόπους. Στο στέλεχος αυτό οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εντοπίζονται με την ανάπτυξη των ζυμών σε θρεπτικό μέσο όπου απουσιάζουν τρία αμινοξέα: τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη (SD-3). Το γονίδιο αναφοράς που ενεργοποιείται όταν οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν είναι για την παραγωγή ιστιδίνης. Επιπρόσθετα, στο στέλεχος αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών μέσω του μεταβολισμού του X-gal που αποτελεί υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς *LACZ* το οποίο μεταβολίζει το X-gal που περιέχεται στο φίλτρο ανίχνευσης. Το προϊόν μεταβολισμού του X-gal είναι η παραγωγή μπλε χρώματος, χρωματισμός που αποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη αποικία μετασχηματισμένης ζύμης.

3.1 Μετασηματισμοί κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και πρωτεϊνών του μονοπατιού των GA ορμονών

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης *in planta*, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν με μια σημαντική πρωτεΐνη του μονοπατιού των γιββερελλινών ορμονών, την πρωτεΐνη RGA. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν ισχυρή απόδειξη για την εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στη ρύθμιση του των αναπτυξιακών σιναλών μέσω του ορμονικού μονοπατιού των γιββερελλινών. Βέβαια ακόμα πιο ισχυρή απόδειξη για τη δυναμική της αλληλεπίδρασης θα αποτελούσε η επιβεβαίωσή της σε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης *in vivo*. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα δυο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Σε συνδυασμό με τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 (HSP90.1 και HSP90.3) και της πρωτεΐνης RGA κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθούν και άλλες πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών για τυχόν αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες HSP90. Οι πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών που επιλέχθηκαν για να ελεγχθούν για τυχόν αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες HSP90 είναι οι εξής: α) Οι πρωτεΐνες RGA και GAI, που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών DELLA και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος των GA ορμονών για τη ρύθμιση πολλών αναπτυξιακών μονοπατιών, β) οι πρωτεΐνες GID1a και GID1b, που είναι οι βασικοί υποδοχείς των ορμονών GA στους περισσότερους οργανισμούς και γ) η πρωτεΐνη SPY, που είναι ένας βασικός αρνητικός ρυθμιστής στο μονοπάτι των γιββερελλινών.

Η κωδική περιοχή των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7, ενώ οι πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7, σε μεταφραστική σύντηξη με την αντίστοιχη ρυθμιστική περιοχή του κάθε πλασμιδιακού φορέα. Στο εργαστήριο υπήρχαν ήδη οι κατασκευές που περιείχαν κλωνοποιημένα τα γονίδια *HSP90.1* και *HSP90.3* στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7, καθώς και οι κατασκευές που περιείχαν κλωνοποιημένα τα γονίδια *RGA*, *GAI*, *SPY*, *GID1a* και *GID1b* του μονοπατιού των GA ορμονών στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7. Ακολούθησε διαδοχικός μετασηματισμός κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στελέχους SG335 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech. Οι συνδυασμοί των μετασηματισμών που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 με την πρωτεΐνη RGA αλλά και για θετικό και αρνητικό έλεγχο ήταν οι εξής: α) pGBKT7:53/pGADT7:T, β) pGBKT7:RGA/pGADT7, γ) pGBKT7:RGA/pGADT7:HSP90.1, δ) pGBKT7:RGA/pGADT7:HSP90.3. Οι συνδυασμοί γ) και δ) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων, ο συνδυασμός β) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός έλεγχος της πρωτεΐνης RGA και ο συνδυασμός στ) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος του πειράματος. Οι συνδυασμοί pGBKT7/pGADT7:HSP90.1 και pGBKT7/pGADT7:HSP90.3 για τον αρνητικό έλεγχο των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 είχαν πραγματοποιηθεί ήδη στο εργαστήριο οπότε δε χρειάστηκε να επαναληφθούν. Οι ίδιοι συνδυασμοί μετασηματισμών πραγματοποιήθηκαν και για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του μονοπατιού.

Τα γεγονότα του διπλού μετασχηματισμού ήταν αποικίες ζύμης που είχαν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο απουσία των αμινοξέων τρυπτοφάνη και λευκίνη (SD-2), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναπτυσσόμενη ζύμη έχει μετασχηματιστεί και με τα δυο πλασμίδια. Από κάθε μετασχηματισμό επιλέχτηκαν κάποιες αποικίες που στρώθηκαν ξανά σε τριβλία με θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής και στη συνέχεια επιλέχτηκαν τρεις αποικίες για κάθε μετασχηματισμό προκειμένου να γίνει ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης. Οι τρεις αυτές αποικίες μεγάλωσαν σε υγρό θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής και στη συνέχεια στρώθηκαν και πάλι σε στερεό θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής προκειμένου να ελεγχθούν για την ύπαρξη της αλληλεπίδρασης. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ζυμών στο θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής (SD-2), λίγο πριν τη διαδικασία μεταβολισμού του X-gal στο φίλτρο ανίχνευσης, παρουσιάζονται στην εικόνα 27.

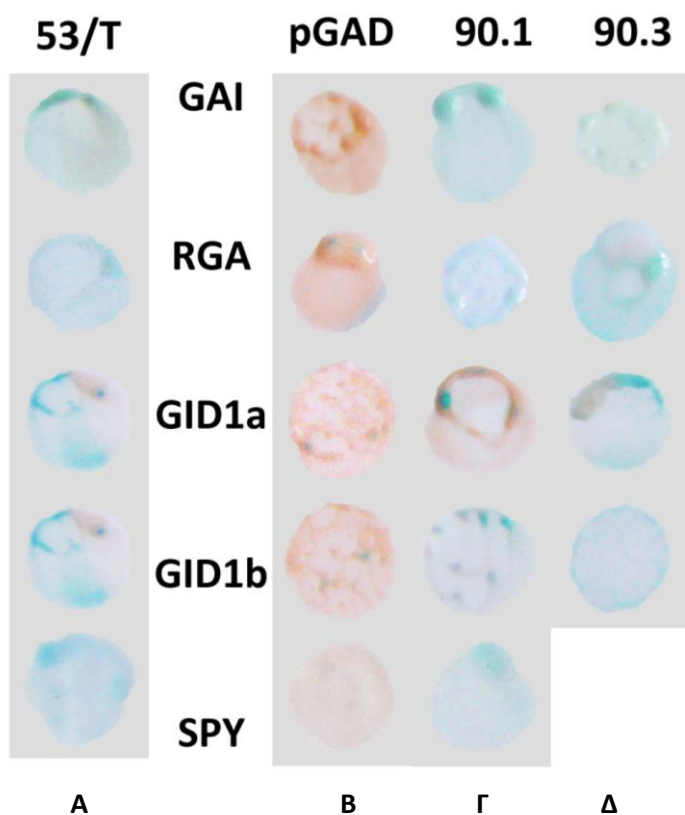


Εικόνα 27. Φωτογραφίες αποικιών επιλεγμένων μετασχηματισμένων SG335 κυττάρων ζύμης που αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής (SD-2).

Κάθε αποικία επιλέχτηκε από τον αρχικό μετασχηματισμό και στη συνέχεια επαναποθετήθηκε για ανάπτυξη σε τριβλία διπλής επιλογής, χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε τρεις διαφορετικές αποικίες για τον κάθε μετασχηματισμό. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.

Όλοι οι συνδυασμοί των μετασχηματισμών έδωσαν έναν ικανοποιητικό αριθμό αποικιών εκτός από το συνδυασμό rGBKT7:SPY/rGADT7:HSP90.3, ο μετασχηματισμός του οποίου επαναλήφθηκε τρεις φορές χωρίς όμως να δώσει εύρωστες αποικίες. Στη συνέχεια, στις αποικίες της εικόνας 27 ακολούθησε ο έλεγχος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη χρήση κατάλληλου φίλτρου ανίχνευσης εμποτισμένου με το χημικό παράγοντα X-gal. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς *LACZ*, το οποίο μεταβολίζει το X-gal που περιέχεται στο φίλτρο ανίχνευσης. Το προϊόν μεταβολισμού του X-gal είναι η παραγωγή μπλε χρώματος. Οι αποικίες αυτές φωτογραφήθηκαν ξανά πάνω στο φίλτρο

ανίχνευσης, όπου και φάνηκε, από τον χρωματισμό της αποικίας, η ύπαρξη ή μη της κάθε αλληλεπίδρασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 28.



Εικόνα 28. Φωτογραφίες των αποικιών της εικόνας 27 τοποθετημένων στο φίλτρο ανίχνευσης που περιέχει X-gal.

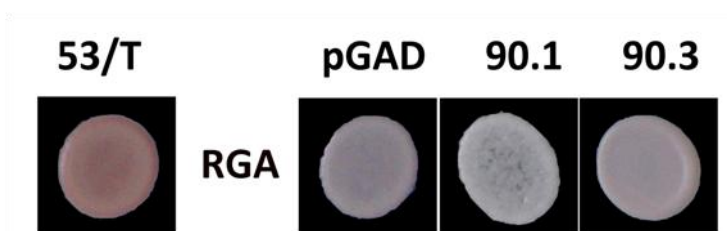
Στη στήλη Α) παρουσιάζονται οι αποικίες για το θετικό έλεγχο του πειράματος, Β) παρουσιάζονται οι αποικίες για τον αρνητικό έλεγχο του πειράματος, Γ και Δ) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι αποικίες της στήλης Α πήραν έναν έντονο μπλε χρωματισμό, οι αποικίες της στήλης Β δε χρωματίστηκαν μπλε, ενώ ο χρωματισμός των αποικιών στις στήλες Γ και Δ κυμαίνεται από ανοιχτό γαλάζιο έως σκούρο μπλε. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2-5 ώρες επώασης των αποικιών πάνω στο φίλτρο ανίχνευσης στους 28°C.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 28 οι μετασχηματισμένες αποικίες της στήλης Α με τον συνδυασμό pGBKT7:53/pGADT7:T, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες της διαδικασίας, έδωσαν ένα έντονο μπλε χρωματισμό όπως ήταν αναμενόμενο. Οι μετασχηματισμένες αποικίες της στήλης Β, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες για τον έλεγχο της κάθε αλληλεπίδρασης, δεν άλλαξαν χρωματισμό κατά τη μεταφορά τους στο φίλτρο ανίχνευσης όπως ήταν αναμενόμενο. Στις στήλες Γ και Δ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του GA μονοπατιού και των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα του πειράματος με το σύστημα δύο υβριδίων επιβεβαιώνουν ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RGA, επαναλαμβάνοντας τα αποτελέσματα του πειράματος SPLIT-GFP. Ταυτόχρονα, με αυτή τη μέθοδο ανιχνεύτηκαν και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και σημαντικών πρωτεϊνών του GA μονοπατιού. Στην εικόνα 28 φαίνεται ότι και η πρωτεΐνη GAI που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών DELLA, όπως και η πρωτεΐνη RGA, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3. Επίσης, στην εικόνα 28 φαίνεται ότι και οι υποδοχείς των GA ορμονών, GID1a και GID1b, αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3. Τέλος, ένας

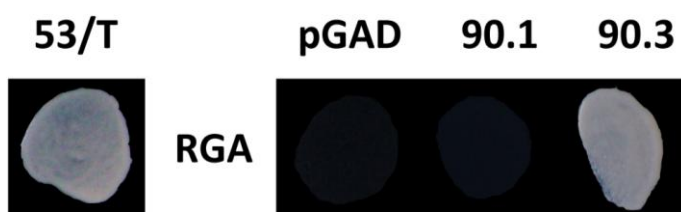
σημαντικός ρυθμιστής του GA μονοπατιού, η πρωτεΐνη SPY, φαίνεται να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HSP90.1.

Συμπληρωματικά με την παραπάνω μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο σύστημα δύο υβριδίων χρησιμοποιήθηκε και μια ακόμα μέθοδος ανίχνευσης. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εντοπίζονται με την ανάπτυξη των ζυμών σε θρεπτικό μέσο όπου απουσιάζουν τρία αμινοξέα: τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη (SD-3). Το γονίδιο αναφοράς που ενεργοποιείται όταν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν είναι για την παραγωγή ιστιδίνης. Έτσι, οι συνδυασμοί των μετασηματισμένων αποικιών του γονιδίου RGA στρώθηκαν σε δύο τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο διπλής (SD-2) και τριπλής (SD-3) επιλογής. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ζυμών στα δύο θρεπτικά μέσα παρουσιάζονται στις εικόνες 29α και 29β.



Εικόνα 29α. Φωτογραφίες αποικιών επιλεγμένων μετασηματισμένων SG335 κυττάρων ζύμης που αναπτύσσονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής (SD-2).

Κάθε αποικία επιλέχτηκε από τον αρχικό μετασηματισμό και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκε για ανάπτυξη σε τριβλία διπλής επιλογής, χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε τρεις διαφορετικές αποικίες για τον κάθε μετασηματισμό. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.



Εικόνα 29β. Φωτογραφίες των αποικιών της εικόνας 29β που αναπτύσσονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο τριπλής επιλογής (SD-3).

Από το υπόστρωμα απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη. Επίσης, στο υπόστρωμα έχει προστεθεί ο παράγοντας 3-Amino-triazole (3-AT), ανταγωνιστής στην παραγωγή ιστιδίνης, σε συγκέντρωση 100mM για την παρεμπόδιση εμφάνισης λανθασμένα θετικών αλληλεπιδράσεων. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 7 ημέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.

Χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά γονίδια αναφοράς στο σύστημα δύο υβριδίων, επαναλήφθηκαν τα αποτελέσματα του SPLIT-GFP. Και με τις τρεις μεθόδους ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν αποδείχτηκε ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν τόσο *in planta* όσο και *in vivo* με την πρωτεΐνη RGA.

Στην εικόνα 29β η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.1 και RGA δε γίνεται φανερή λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης (100mM) του παράγοντα 3-Amino-triazole (3-AT) που παρεμποδίζει την παραγωγή ιστιδίνης. Πιθανόν, αυτή η αλληλεπίδραση να μην είναι τόσο ισχυρή όσο η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.3 και RGA και γι' αυτό η μετασηματοδοτημένη αποικία να μην μπορεί να αναπτυχθεί επαρκώς. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιδεικνύουν τον εξέχοντα ρόλο που διαδραματίζουν τα *HSP90* κυτταροπλασματικά γονίδια στον έλεγχο τόσο της μεταγωγής σήματος του μονοπατιού των GA ορμονών όσο και της ρύθμισης της λειτουργίας του μονοπατιού αυτού.

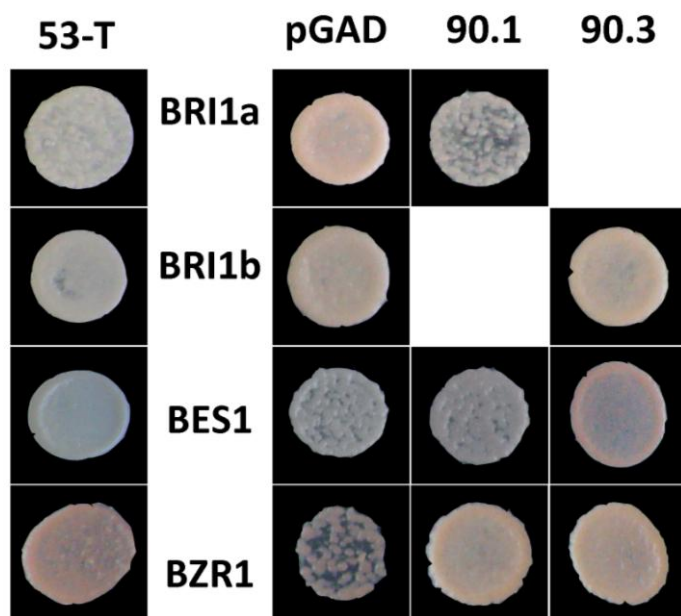
3.2 Μετασηματοδοτημένοι κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και πρωτεϊνών του μονοπατιού των BR ορμονών

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα σε επίπεδο μεταγραφημάτων συνηγορούν στην άποψη ότι τα μονοπάτια των ορμονών GA και BR δρουν συνεργιστικά μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ βασικών στοιχείων του κάθε μονοπατιού. Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν εντοπιστεί μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα BZR1 του μονοπατιού BR και των πρωτεϊνών GAI (Gallego-Bartoloméa J et al., 2012) και RGA (Bai M.Y et al., 2012)(πρωτεΐνες DELLA) του μονοπατιού GA.

Έχοντας ως δεδομένη την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ στοιχείων των μονοπατιών των BR και GA ορμονών σε επίπεδο μεταγραφής, επόμενο βήμα με σκοπό την αποσαφήνιση της εμπλοκής του Hsp90 συστήματος σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις σε πρωτεϊνικό επίπεδο αποτέλεσε η μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 (HSP90.1 και HSP90.3) και πρωτεϊνών του μονοπατιού των BR ορμονών. Το σύστημα το οποίο επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων είναι αυτό των δύο υβριδίων στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Οι πρωτεΐνες του μονοπατιού των BR ορμονών που επιλέχθηκαν για να ελεγχθούν για τυχόν αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες HSP90 είναι οι εξής: α) οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες του μονοπατιού, BZR1 και BES1, και ο υποδοχέας των BR ορμονών, BRI1, ο οποίος κρίθηκε σκόπιμο να χωριστεί σε δύο υπομονάδες, την BRI1a και BRI1b. Η υπομονάδα BRI1a περιλαμβάνει την εξωκυτταρική περιοχή (Extracellular Domain) που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της ορμόνης και για τον ολιγομερισμό του υποδοχέα, ενώ η υπομονάδα BRI1b περιλαμβάνει την κυτταροπλασματική περιοχή (Intracellular Domain), η οποία αποτελείται από την περιοχή της κινάσης (kinase domain, KD) και από την καρβοξυ-τελική περιοχή (C-terminal, CT).

Ακολούθησε διαδοχικός μετασηματοδοτημένος κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στελέχους SG335 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Clontech, όπως ακριβώς συνέβη και με τις πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών. Οι συνδυασμοί των μετασηματοδοτημένων που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3 με της πρωτεΐνης BZR1 αλλά και για θετικό και αρνητικό έλεγχο ήταν οι εξής: α) pGBKT7:53/pGADT7:T, β) pGBKT7:BZR1/pGADT7, γ) pGBKT7:BZR1/pGADT7:HSP90.1, δ) pGBKT7:BZR1/pGADT7:HSP90.3. Οι ίδιοι συνδυασμοί

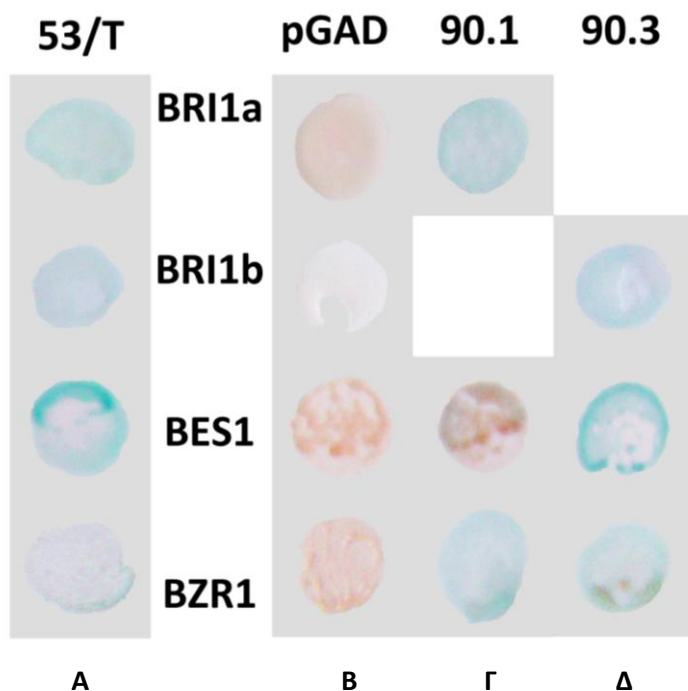
μετασχηματισμών πραγματοποιήθηκαν και για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του μονοπατιού. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ζυμών στο θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής (SD-2), λίγο πριν τη διαδικασία μεταβολισμού του X-gal στο φίλτρο ανίχνευσης, παρουσιάζονται στην εικόνα 30.



Εικόνα 30. Φωτογραφίες αποικιών επιλεγμένων μετασχηματισμένων SG335 κυττάρων ζύμης που αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής (SD-2).

Κάθε αποικία επιλέχτηκε από τον αρχικό μετασχηματισμό και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκε για ανάπτυξη σε τριβλία διπλής επιλογής, χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε τρεις διαφορετικές αποικίες για τον κάθε μετασχηματισμό. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.

Όλοι οι συνδυασμοί των μετασχηματισμών έδωσαν έναν ικανοποιητικό αριθμό αποικιών εκτός από τους συνδυασμούς pGBKT7:BRI1a/pGADT7:HSP90.3 και pGBKT7:BRI1b/pGADT7:HSP90.1, οι μετασχηματισμοί των οποίων επαναλήφθηκαν τρεις φορές χωρίς όμως να δώσουν εύρωστες αποικίες. Στη συνέχεια, στις αποικίες της εικόνας 30 ακολούθησε ο έλεγχος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη χρήση κατάλληλου φίλτρου ανίχνευσης εμποτισμένου με το χημικό παράγοντα X-gal. Οι αποικίες αυτές φωτογραφήθηκαν ξανά πάνω στο φίλτρο ανίχνευσης, όπου και φάνηκε, από τον χρωματισμό της αποικίας, η ύπαρξη ή μη της κάθε αλληλεπίδρασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 31.



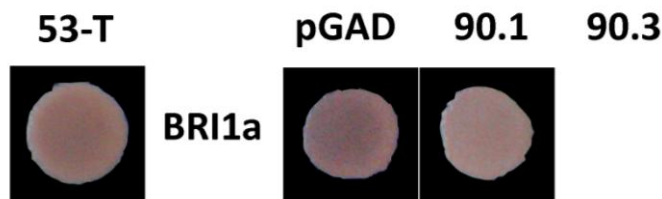
Εικόνα 31. Φωτογραφίες των αποικιών της εικόνας 30 τοποθετημένων στο φίλτρο ανίχνευσης που περιέχει X-gal.

Στη στήλη Α) παρουσιάζονται οι αποικίες για το θετικό έλεγχο του πειράματος, Β) παρουσιάζονται οι αποικίες για τον αρνητικό έλεγχο του πειράματος, Γ και Δ) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι αποικίες της στήλης Α πήραν έναν έντονο μπλε χρωματισμό, οι αποικίες της στήλης Β δε χρωματίστηκαν μπλε, ενώ ο χρωματισμός των αποικιών στις στήλες Γ και Δ κυμαίνεται από ανοιχτό γαλάζιο έως σκούρο μπλε. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2-5 ώρες επώασης των αποικιών πάνω στο φίλτρο ανίχνευσης στους 28°C.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 31 οι μετασχηματισμένες αποικίες της στήλης Α με τον συνδυασμό pGBKT7:53/pGADT7:T έδωσαν ένα έντονο μπλε χρωματισμό, ενώ οι μετασχηματισμένες αποικίες της στήλης Β δεν άλλαξαν χρωματισμό κατά τη μεταφορά του στο φίλτρο ανίχνευσης όπως ήταν αναμενόμενο. Στις στήλες Γ και Δ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του BR μονοπατιού και των πρωτεϊνών HSP90.1 και HSP90.3, αντίστοιχα.

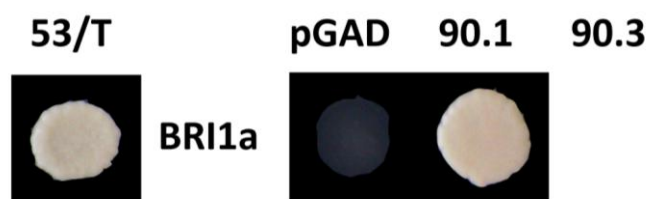
Τα αποτελέσματα του πειράματος με το σύστημα δύο υβριδίων δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3 αλληλεπιδρούν με τους δύο πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες του μονοπατιού των BR ορμονών, BZR1 και BES1, καθώς και ότι η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα BRI1 αλληλεπιδρά με των πρωτεΐνη HSP90.1, ενώ η κυτταροπλασματική περιοχή του αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HSP90.3.

Συμπληρωματικά με την παραπάνω μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς *LACZ*, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς για την παραγωγή της ιστιδίνης. Έτσι, μετασχηματισμένες αποικίες από όλους τους παραπάνω μετασχηματισμούς στρώθηκαν σε δύο τριβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο διπλής (SD-2) και τριπλής (SD-3) επιλογής. Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των ζυμών στα δύο θρεπτικά μέσα παρουσιάζονται στις εικόνες 32α και 32β.



Εικόνα 32α. Φωτογραφίες αποικιών επιλεγμένων μετασηματισμένων SG335 κυττάρων ζύμης που αναπτύσσονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο διπλής επιλογής (SD-2).

Κάθε αποικία επιλέχτηκε από τον αρχικό μετασηματισμό και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκε για ανάπτυξη σε τριβλία διπλής επιλογής, χωρίς τρυπτοφάνη και λευκίνη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε τρεις διαφορετικές αποικίες για τον κάθε μετασηματισμό. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.



Εικόνα 32β. Φωτογραφίες των αποικιών της εικόνας 29β που αναπτύσσονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο τριπλής επιλογής (SD-3).

Από το υπόστρωμα απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη. Επίσης, στο υπόστρωμα έχει προστεθεί ο παράγοντας 3-Amino-triazole (3-AT), ανταγωνιστής στην παραγωγή ιστιδίνης, σε συγκέντρωση 10mM για την παρεμπόδιση εμφάνισης λανθασμένα θετικών αλληλεπιδράσεων. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 7 ημέρες ανάπτυξης των αποικιών στους 28°C.

Χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά γονίδια αναφοράς στο σύστημα δύο υβριδίων αποδείχτηκε ότι η πρωτεΐνη HSP90.1 αλληλεπιδρά *in vivo* με την εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα των BR ορμονών (BRI1a). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιδεικνύουν τον εξέχοντα ρόλο που διαδραματίζουν τα HSP90 κυτταροπλασματικά γονίδια στον έλεγχο τόσο της μεταγωγής σήματος του μονοπατιού των BR ορμονών όσο και της ρύθμισης της λειτουργίας του μονοπατιού αυτού.

4. Εμπλοκή των HSP90 στον ομο-διμερισμό του υποδοχέα των BR ορμονών, BRI1

Η πρωτεΐνη BRI1 είναι ο σημαντικότερος υποδοχέας των ορμονών BR. Η δομή του μορίου αυτού περιλαμβάνει: α) μια εξωκυτταρική περιοχή (Extracellular Domain) που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της ορμόνης και για τον ολιγομερισμό του υποδοχέα, β) μια διαμεμβρανική αλληλουχία (Transmembrane Segment) και γ) μια κυτταροπλασματική περιοχή (Intracellular Domain), η οποία αποτελείται από την περιοχή της κινάσης (kinase domain, KD) και από την καρβοξυ-τελική περιοχή (C-terminal, CT). Σήμερα είναι γνωστό ότι απουσία ορμονών BR ο υποδοχέας BRI1 εντοπίζεται σε ομοδιμερή διαμόρφωση στην

πλασματική μεμβράνη εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εσφαλμένη μεταφορά σημάτων. Πρόσδεση, όμως, της ορμόνης BR από την εξωκυτταρική LRR περιοχή του ομοδιμερούς BRI1 οδηγεί την πρωτεΐνη σε αλλαγή της διαμόρφωσής της ενεργοποιώντας τη δράση της ως κινάση και την αυτό-φωσφορυλίωσή της (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010). Ακολούθως, η πρωτεΐνη BRI1 προκαλεί τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης BKI, προκαλώντας την αποδέσμευσή της πρωτεΐνης-καταστολέα και οδηγώντας τη στο κυτταρόπλασμα. Η αποσύνδεση της πρωτεΐνης BKI οδηγεί τελικά στη σύνδεση των πρωτεϊνών BRI1 και BAK1 μεταξύ τους, δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο του υποδοχέα BRI1 (Jaillais Y et al., 2011a, 2011b). Στη συνέχεια, μέσω διαδοχικών φωσφορυλίσεων μεταξύ των πρωτεϊνών BRI1 και BAK1, ο υποδοχέας BRI1 αποκτά ολοκληρωτικά ενεργότητα κινάσης και η μεταγωγή του σήματος ξεκινά (Bücherl C.A et al., 2013).

Γνωρίζοντας, από τα παραπάνω πειράματα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, ότι η πρωτεΐνη HSP90.1 αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1a) και ότι η πρωτεΐνη HSP90.3 αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1b) κρίθηκε σκόπιμο σε επόμενο βήμα να μελετηθεί και το στάδιο εμπλοκής των HSP90 με την πρωτεΐνη BRI1. Όπως φαίνεται, από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των BR ορμονών, ο διμερισμός του υποδοχέα BRI1 είναι ένα κομβικό σημείο για τη μεταφορά ή μη των ορμονικών σιγνάλων μέσα στο κύτταρο. Έτσι αποφασίστηκε να ελεγχθεί αν όντως το Hsp90 σύστημα εμπλέκεται στο διμερισμό του υποδοχέα BRI1.

Για τον έλεγχο της υπόθεσης εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό του υποδοχέα BRI1 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SPLIT-GFP σε πρωτοπλάστες. Η κάθε περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 κλωνοποιήθηκε στους φορείς rSPYNE και rSPYCE έτσι ώστε όταν η πρωτεΐνη διμερίζεται σε λειτουργικό σύμπλοκο να παράγεται πράσινος φθορισμός. Σε αυτό το σημείο ακολουθεί καταστολή των Hsp90 με το χημικό παράγοντα GDA. Ο χημικός παράγοντας GDA (geldamycin) αποτελεί φυσικό προϊόν του ακτινομύκητα *Streptomyces hygroscopicus*. Το GDA έχει την ικανότητα να προάγει την αποικοδόμηση μεγάλου αριθμού μορίων/πελατών του τσαπερονίου HSP90 *in vivo* καθώς και να δεσμεύεται, με υψηλή εκλεκτικότητα, εντός της θέσης δέσμευσης του ATP στην αμινο-τελική περιοχή της HSP90 (Millson S.H et al., 2011). Ο χειρισμός των δειγμάτων με τον παράγοντα GDA θα δείξει αν η καταστολή των HSP90 επηρεάζει το διμερισμό της πρωτεΐνης BRI1 ή όχι.

4.1 Δημιουργία κατασκευών παροδικού μετασηματισμού για τον έλεγχο της εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στον ομο-διμερισμό του υποδοχέα BRI1 με το σύστημα SPLIT-GFP

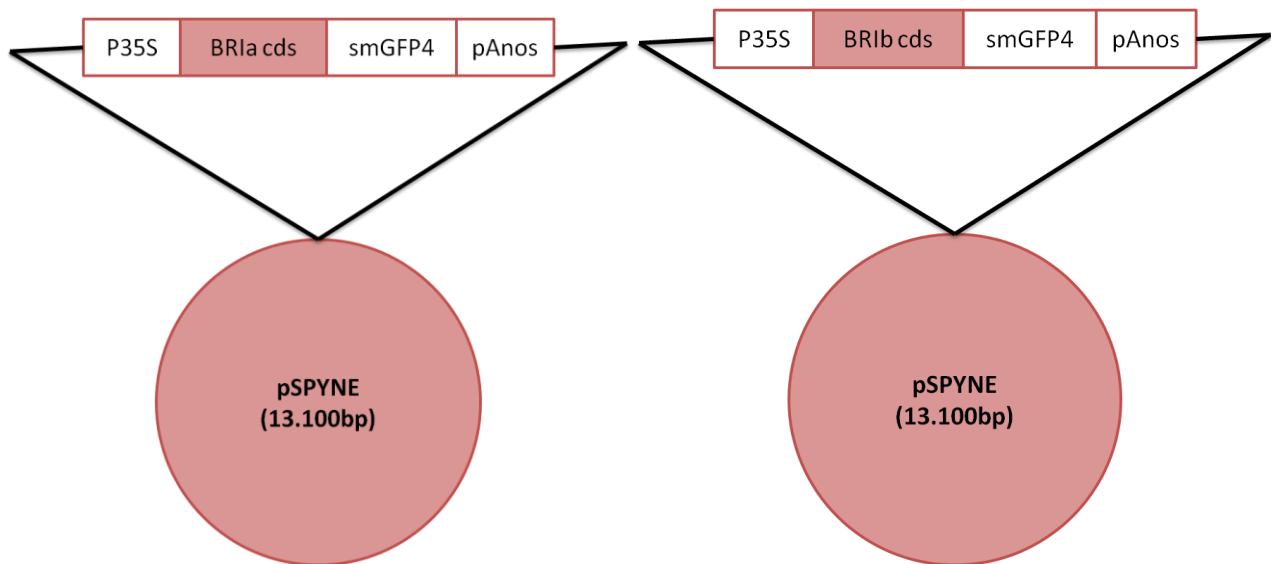
Το γονίδιο *BRI1* του φυτού *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (BRI1) που αποτελείται από 1.196 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 130KDa. Η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης BRI1 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (AT4G39400, GenBank accession no. AEE87069.1) είναι η εξής:

1 mktfssffls vtllfffsff slsfqaspsq slyreihqli sfkdvlpdkn llpdwssnkn
61 pctfdgvtcr ddkvtsidls skplnvgsfa vssllsltg leslflsnsh ingsvsgfkc
121 sasltsllds rnsllsgpvtl ltslgscsgl kflnvssntl dfpgkvsggl klnslevldl
181 sansisganv vgwvlsdgcg elkhlaishgn kisgdvdvsr cvnlefldvs snnfstgipf
241 lgdcsalqhl disgnklsgd fsraistcte lkllnissnq fvgpipplpl kslqylslae
301 nkftgeipdf lsgacdtltg ldlsghfyg avppffgscs lleslalssn nfgselpmdt
361 llkmrglklvl dlsfnfsgge lpesltnlsa sltldlssn nfgsilpnl cqnkntlqe
421 lylqnnngftg kipptlsnscs elvshlsfn ylshtipssl gslsklrldk lwlmlgeei
481 pqelmyvktl etlildfndl tgeipsglsn ctnlnwisls nnrltgeipk wigrlenlai
541 lklsnnsfsg nipaelgdcr sliwldlntn lfnhtipaam fkqsgkiaan fiagkryvyi
601 kndgmkkech gagnllefqg irseqlnrsl trnpcnitsr vygghtsptf dnngsmmfld
661 msynmlsgyi pkeigsmpyl filnlghndi sgsipdevgd lrglnildls snkldgripq
721 amsaltmlte idlsnnnlsq pipemqfet fppakflnnp glcgyplprc dpsnadgyah
781 hqrshgrrpa slagsvamgl lfsfvcifgl ilvgremrkr rrkkaelem yaeghgnsqd
841 rtanntnwkl tgvkealsin laafekplrkl ltfadllqat ngfhndslig sggfgdvyka
901 ilkdgsavai kklihvsggg drefmaemet igkikhrlv pllgyckvgd erllvyefmk
961 ygsledvlhd pkkagvklw strrkiaigs arglaflhhn csphiihrdm kssnvllden
1021 learvsdfgm arlmsamdth lsvstlagtp gyvppeyyqs frcstkgdvy sygvvllell
1081 tgkrptdspd fgdnnlvgwv kqhaklrisd vfdpelmked paleiellqh lkvavacldd
1141 rawrrptmvq vmamfkeiqa gsgidsqsti rsiedggfst iemvdsike vpegkl

Στην παρούσα μελέτη κρίθηκε σκόπιμο να γίνει διαχωρισμός της εξωκυτταρικής και της κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1. Για το λόγο αυτό η πρωτεΐνη χωρίστηκε σε δύο περιοχές, την περιοχή BRI1a (εξωκυτταρική) και την περιοχή BRI1b (κυτταροπλασματική). Η περιοχή BRI1a αποτελείται από τα αμινοξέα 24-730 (κόκκινα βέλη), ενώ η περιοχή BRI1b αποτελείται από τα αμινοξέα 550-1.192 (μοβ βέλη). Οι περιοχές που είναι υπογραμμισμένες είναι το «φερμουάρ λευκίνης», το ζευγάρι των κυστεϊνικών υπολειμμάτων και η διαμεμβρανική περιοχή.

Αναλυτικότερα, στην περιοχή BRI1a περιλαμβάνονται οι εξής περιοχές: α) το «φερμουάρ» λευκίνης (Leucine-Zipper motif) που αποτελείται από τα αμινοξέα 32-52 και είναι υπεύθυνο για τον ομο- και ετερο-διμερισμό του μορίου, β) το ένα από τα δύο κυστεϊνικά υπολείμματα που αποτελείται από τα αμινοξέα 62-69, γ) η κύρια εξωκυτταρική περιοχή που περιέχει 25 πλούσιες σε λευκίνη επαναλήψεις (LRRs) με μήκος μονάδας 24 αμινοξέα και αποτελείται από τα αμινοξέα 101-750 και δ) μια ομάδα 70 αμινοξέων (Island Domain) που βρίσκεται μεταξύ των LRR20-LRR21 και αποτελείται από τα αμινοξέα 587-656. Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της ορμόνης BR (Jiang J et al., 2013). Στην περιοχή BRI1b περιλαμβάνονται οι εξής περιοχές: α) η ομάδα των 70 αμινοξέων (Island Domain) που βρίσκεται μεταξύ των LRR20-LRR21 και αποτελείται από τα αμινοξέα 587-656, β) οι πλούσιες σε λευκίνη επαναλήψεις LRR21-24 που αποτελούνται από τα αμινοξέα 680-750, γ) το ένα από τα δύο κυστεϊνικά υπολείμματα που αποτελείται από τα αμινοξέα 763-770, δ) η διαμεμβρανική περιοχή (transmembrane segment) που αποτελείται από τα αμινοξέα 793-814, ε) η παραμεμβρανική περιοχή (juxtamembrane region), στ) την περιοχή της κινάσης (kinase domain) και ζ) η καρβοξυ-τελική περιοχή (C-terminal). Η καρβοξυ-τελική περιοχή περιέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης οι οποίες αποτελούνται επαναλαμβανόμενα αμινοξέα σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr). Οι θέσεις αυτές πιθανόν να επάγουν την ενεργοποίηση της κινάσης, μέσω αλλαγών στη διαμόρφωση της περιοχής που οδηγούν στην απελευθέρωση της καρβοξυ-τελικής περιοχής από την αυτό-καταστολής (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010).

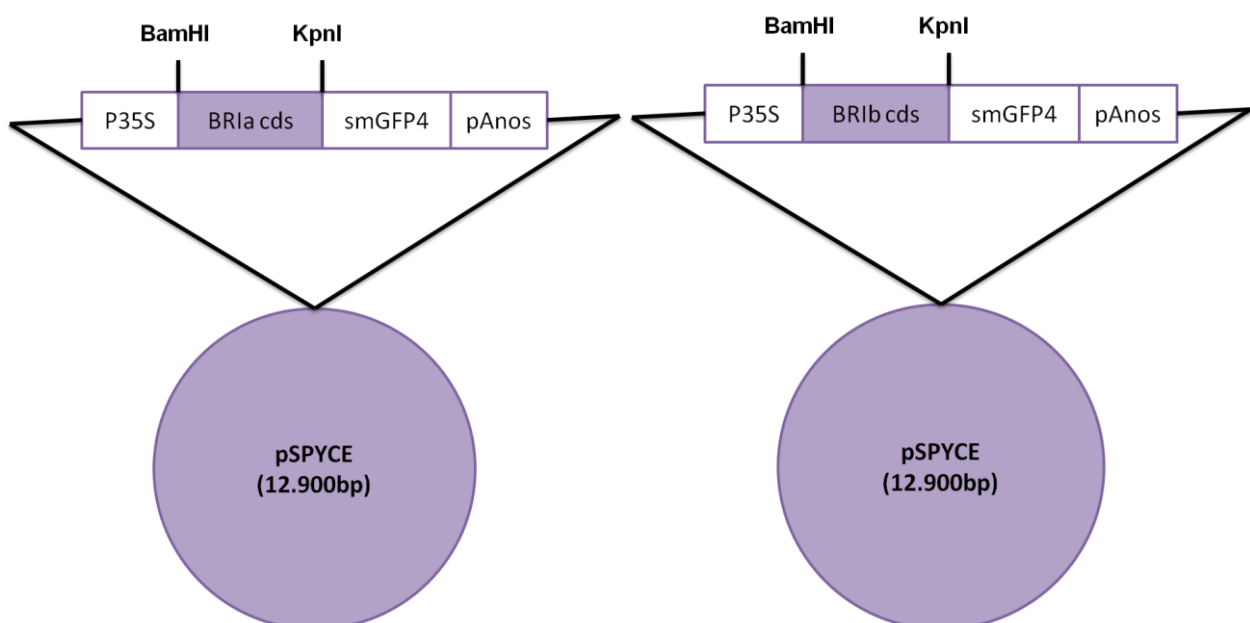
Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της υπόθεσης εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό του υποδοχέα BRI1 περιείχαν τις δύο περιοχές της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1a και BRI1b) στους δύο πλασμιδιακούς φορείς (pSPYNE και pSPYCE). Έτσι, όταν η αντίστοιχη πρωτεΐνη ομοδιμερίζεται *in planta* παράγεται πράσινος φθορισμός. Οι κατασκευές που περιέχουν τις πρωτεΐνες BRI1a και BRI1b κλωνοποιημένες στο φορέα pSPYNE υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο και παραθέτονται στην εικόνα 33.



Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για τις πρωτεΐνες BRI1a και BRI1b στο φορέα pSPYNE.

Οι πρωτεΐνες BRI1a και BRI1b κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSPYNE σε μεταφραστική σύντηξη με την αμινοτελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης που περιέχει ο φορέας. Οι κασέτες έκφρασης καθοδηγούνται από τον καθολικό προαγωγέα 35S.

Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν κατασκευές που περιέχουν κλωνοποιημένες τις πρωτεΐνες BRI1a και BRI1b στον πλασμιδιακό φορέα pSPYCE. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις κλωνοποιήσεις είναι τα BamHI/KpnI. Οι κατασκευές παραθέτονται στην εικόνα 34.



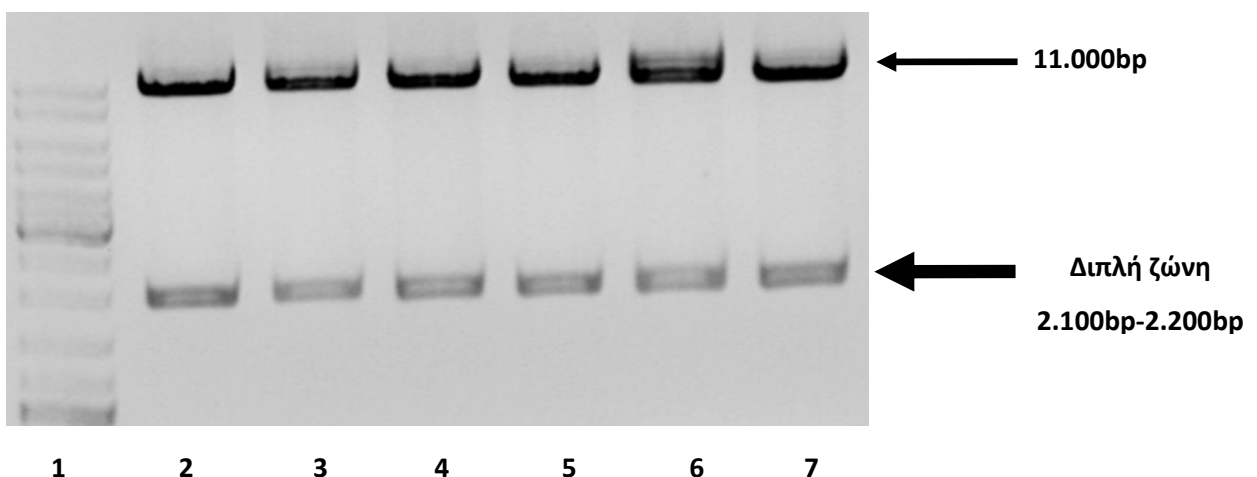
Εικόνα 34. Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών παροδικού μετασχηματισμού για τις πρωτεΐνες BRI1a και BRI1b στο φορέα pSPYCE.

Οι πρωτεΐνες BRI1a και BRI1b κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pSPYCE σε μεταφραστική σύντηξη με την καρβοξυτελική υπομονάδα της GFP πρωτεΐνης που περιέχει ο φορέας. Οι κασέτες έκφρασης καθοδηγούνται από τον καθολικό προαγωγέα 35S.

4.2 Κλωνοποίηση των περιοχών BRI1a και BRI1b του γονιδίου *BRI1* στο φορέα pSPYCE

Για την κλωνοποίηση των περιοχών BRI1a και BRI1b του γονιδίου *Bri1* στο φορέα pSPYCE χρειάστηκε να γίνουν διπλές πέψεις του φορέα και των προς κλωνοποίηση γονιδίων με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Όπως φαίνεται και στις παραπάνω κατασκευές τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα BamHI/KpnI. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης και οι αντίστοιχες ζώνες απομονώθηκαν. Στη συνέχεια έλαβε χώρα αντίδραση ενοποίησης των άκρων του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέτου. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την ενοποίηση ήταν η T4 DNA ligase (Promega). Ακολούθησε μετασχηματισμός κατάλληλων *E.coli* δεκτικών κυττάρων και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (Καναμυκίνη).

Η κλωνοποίηση του γονιδίου *BRI1a* έδωσε επαρκή αριθμό αποικιών, οι οποίες ελέγχθηκαν για την παρουσία του ενθέτου με διπλή πέψη επιβεβαίωσης με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/KpnI. Τα αναμενόμενα προϊόντα της πέψης είναι περίπου στις 2.200bp, 2.100bp και 11.000bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 35).



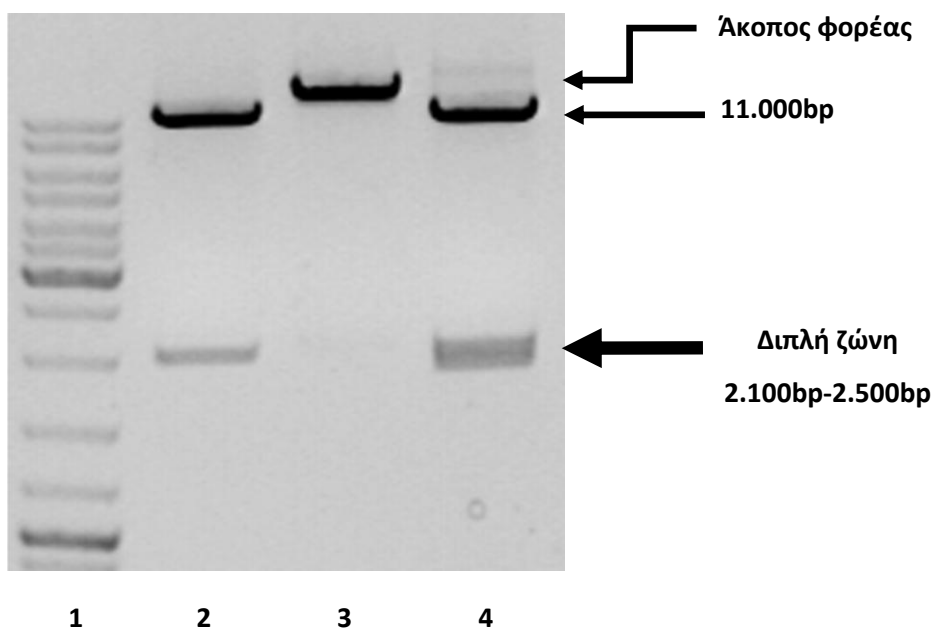
Εικόνα 35: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% των πλασμιδιακών κλώνων μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/KpnI για ανίχνευση της ένθεσης της περιοχής BRI1a του γονιδίου *BRI1* στο φορέα pSPYCE.

2-7: Όλες οι δύο αποικίες που αναλύθηκαν περιέχουν το ένθετο και δίνουν το αναμενόμενο πρότυπο με μια διπλή ζώνη στις 2.100bp-2.200bp και μια ζώνη στις 11.000bp.

1: μάρτυρας μοριακών βαρών, Gene Ruler ladder mix.

Όπως φαίνεται στην πηκτή αγαρόζη και οι έξι αποικίες του μετασχηματισμού περιέχουν την περιοχή BRI1a του γονιδίου *BRI1*. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η αποικία 2 για περαιτέρω χειρισμούς.

Η κλωνοποίηση του γονιδίου *BRI1b* έδωσε επαρκή αριθμό αποικιών, οι οποίες ελέχθησαν για την παρουσία του ενθέτου με διπλή πέψη επιβεβαίωσης με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/KpnI. Τα αναμενόμενα προϊόντα της πέψης είναι περίπου στις 2.500bp, 2.100bp και 11.000bp. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζη (εικόνα 36).



Εικόνα 36: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζη 0,8% των πλασμιδιακών κλώνων μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/KpnI για ανίχνευση της ένθεσης της περιοχής BRI1b του γονιδίου *BRI1* στο φορέα pSPYCE.

- 2: Η αποικία δε φαίνεται να φέρει την ένθεση.
- 3: Τα ένζυμα περιορισμού δεν κατάφεραν να κόψουν το DNA της αποικίας τρία.
- 4: Η αποικία φαίνεται να περιέχει το ένθετο. Η διπλή πέψη δίνει το αναμενόμενο πρότυπο με μια διπλή ζώνη στις 2.100bp-2.500bp και μια ζώνη στις 11.000bp.
- 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, Gene Ruler ladder mix.

Όπως φαίνεται στην πηκτή αγαρόζη η αποικία 4 του μετασχηματισμού είναι αυτή που περιέχει την ένθεση της περιοχής BRI1a του γονιδίου *BRI1*. Η αποικία αυτή επιλέχθηκε για περαιτέρω χειρισμούς.

Στη συνέχεια ακολούθησαν οι μετασχηματισμοί του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* με τις δύο περιοχές του γονιδίου *BRI1* και προετοιμασία των φυτών για τη διαδικασία του παροδικού μετασχηματισμού.

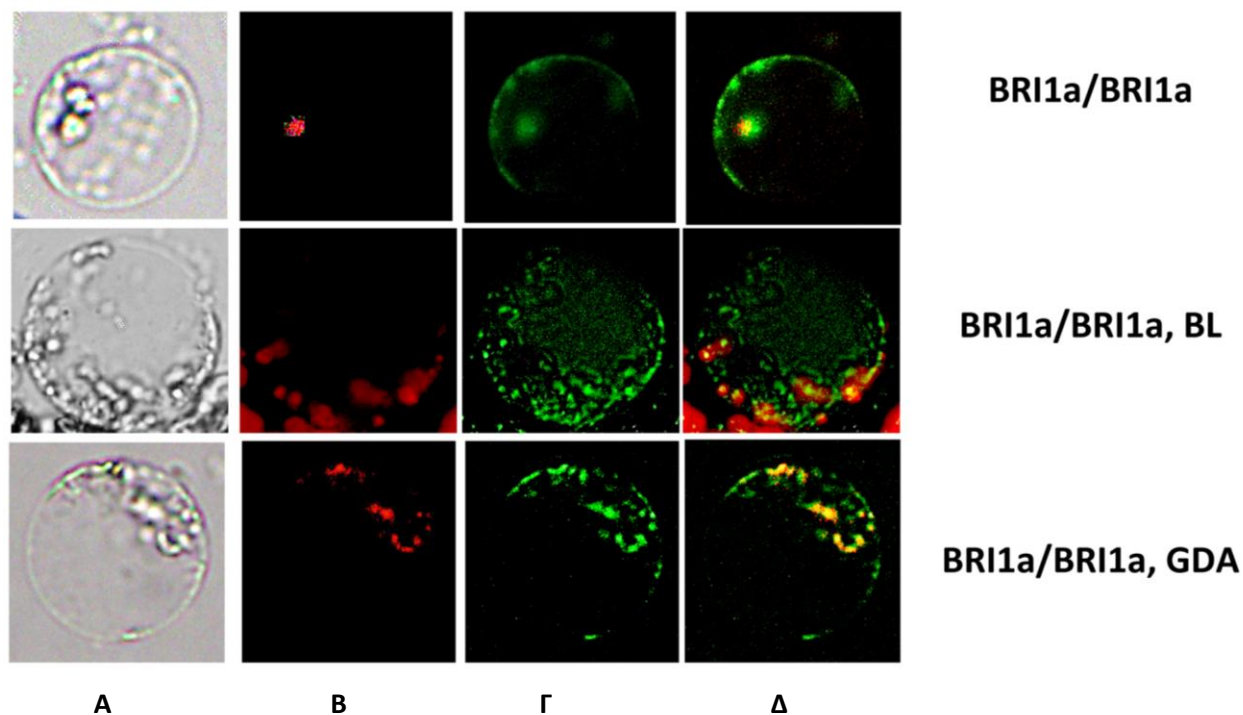
4.3 Αποτελέσματα SPLIT-GFP σε πρωτοπλάστες

Όταν τα φυτά καπνού αναπτύχθηκαν τόσο ώστε να έχουν παράγει 4-6 ζευγάρια πραγματικών φύλλων, μετασηματίστηκαν με τους εξής συνδυασμούς πλασμιδίων: α) pSPYNE:BR11a/pSPYCE:BR11a/p19, β) pSPYNE:BR11b/pSPYCE:BR11b/p19. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το γονίδιο *BR11* κωδικοποιεί για τον υποδοχέα των BR ορμονών, ο οποίος εδράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Για την καλύτερη παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων ακολούθησε η καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος των μετασηματισμένων κυττάρων καπνού με τη διαδικασία της απομόνωσης των πρωτοπλαστών.

Μετά το πέρασ 65 ωρών από τον εμβολιασμό των φύλλων καπνού και αφού έχουν απομονωθεί οι μετασηματισμένοι πρωτοπλάστες ακολούθησαν χειρισμοί με την ορμόνη BL (22(S), 23(S)-Homobrassinolide) και το χημικό παράγοντα GDA (Geldamycin). Η ορμόνη BL είναι ομόλογη της ορμόνης BR και έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί το μονοπάτι των BR ορμονών καθώς προσδένεται στους υποδοχείς (BR11) των BR ορμονών. Το GDA είναι ένας καταστολέας του τσαπερονίου HSP90 καθώς έχει την ικανότητα να δεσμεύεται, με υψηλή εκλεκτικότητα, στην αμινο-τελική περιοχή της HSP90.

Στη συνέχεια ακολούθησε η παρατήρηση τριών δειγμάτων από τον κάθε συνδυασμό μετασηματισμένων πρωτοπλαστών. Το πρώτο δείγμα αποτελεί το μάρτυρα, όπου οι πρωτοπλάστες έχουν αναπτυχθεί σε φυσιολογικές συνθήκες απουσία της ορμόνης BL. Το δεύτερο δείγμα περιέχει πρωτοπλάστες οι οποίοι έχουν επωαστεί για δύο ώρες σε διάλυμα που περιέχει 10μM BL και το τρίτο δείγμα περιέχει πρωτοπλάστες οι οποίοι έχουν επωαστεί για τέσσερις ώρες σε διάλυμα που περιέχει 10μM GDA. Η διαδικασία του μετασηματισμού και της παρατήρησης των αλληλεπιδράσεων επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της παρατήρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 37. Επιπλέον φωτογραφίες από τις παρατηρήσεις των πρωτοπλαστών παρατίθενται στο Παράρτημα, στην εικόνα B1.

BRI1a/BRI1a



Εικόνα 37. Φωτογραφίες μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασηματισμός με τον εξής συνδυασμό: pSPYNE:BRI1a/pSPYCE:BRI1a/p19.

Οι φωτογραφίες δείχνουν το διμερισμό μεταξύ των εξωκυτταρικών περιοχών της πρωτεΐνης BRI1 σε πρωτοπλάστες μετασηματισμένων φύλλων καπνού. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στους οποίους δεν είχε εφαρμοστεί κάποιος επιπλέον χειρισμός και διάλυμα μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στο οποίο είχε γίνει εφαρμογή της ορμόνης BL σε συγκέντρωση 10 μM για 2h. Για τον έλεγχο της υπόθεσης εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα BRI1 έγινε χειρισμός των πρωτοπλαστών με τον καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA σε συγκέντρωση 10 μM για 4h.

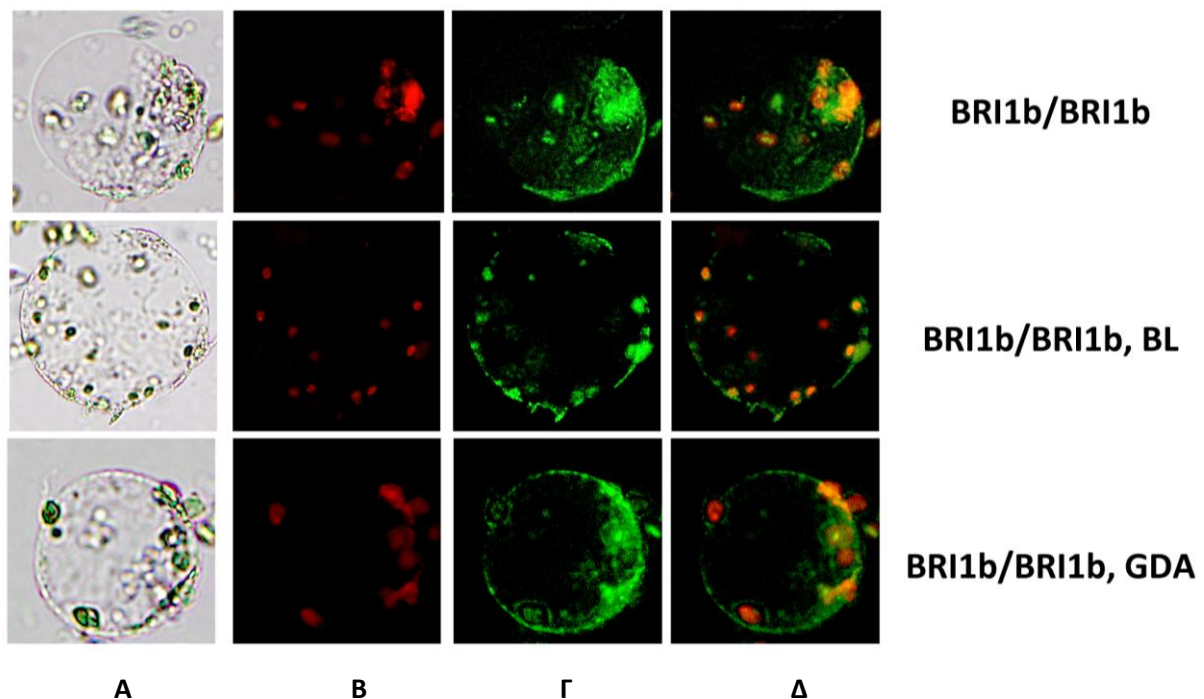
Συγκεκριμένα στις φωτογραφίες της στήλης: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (γ) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των δύο φίλτρων (πράσινου και ροδαμίνης). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε μία ακόμα επανάληψη.

Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται ότι η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα BRI1 (BRI1a) σε φυσιολογικές συνθήκες και απουσία της ορμόνης BL βρίσκεται σε ομοδιμερή μορφή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των πρωτοπλαστών, όπου εντοπίζεται και ο φθορισμός της λειτουργικής GFP πρωτεΐνης. Προσθήκη ορμόνης BL φαίνεται να οδηγεί τα ομοδιμερή της περιοχής BRI1a σε ενδοκύττωση. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στην ανάγκη ανακύκλωσης των μορίων του υποδοχέα έπειτα από την εκπλήρωση της λειτουργικής τους δράσης ως υποδοχείς της ορμόνης BL. Προσθήκη του χημικού παράγοντα GDA, που οδηγεί σε καταστολή της δράσης των HSP90 πρωτεϊνών,

φαίνεται από την εικόνα 37 να δίνει το ίδιο πρότυπο φθορισμού με αυτό του μάρτυρα. Αυτό δείχνει ότι το Hsp90 σύστημα δεν επηρεάζει το διμερισμό της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα BRI1, ούτε την τοποθέτησή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Επόμενο βήμα της μελέτης της υπόθεσης εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό του υποδοχέα BRI1, αποτέλεσε ο έλεγχος του ρόλου των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό της κυτταροπλασματικής (BRI1b) περιοχής του υποδοχέα BRI1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την παραπάνω. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 38. Επιπλέον φωτογραφίες από τις παρατηρήσεις των πρωτοπλαστών παρατίθενται στο Παράρτημα, στην εικόνα B2.

BRI1b/BRI1b



Εικόνα 38. Φωτογραφίες μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασηματισμός με τον εξής συνδυασμό: pSPYNE:BRI1b/pSPYCE:BRI1b/p19.

Οι φωτογραφίες δείχνουν το διμερισμό μεταξύ των κυτταροπλασματικών περιοχών της πρωτεΐνης BRI1 σε πρωτοπλάστες μετασηματισμένων φύλλων καπνού. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στους οποίους δεν είχε εφαρμοστεί κάποιος επιπλέον χειρισμός και διάλυμα μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στο οποίο είχε γίνει εφαρμογή της ορμόνης BL σε συγκέντρωση 10 μ M για 2h. Για τον έλεγχο της υπόθεσης εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα BRI1 έγινε χειρισμός των πρωτοπλαστών με τον καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA σε συγκέντρωση 10 μ M για 4h.

Συγκεκριμένα στις φωτογραφίες της στήλης: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (γ)

χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των δύο φίλτρων (πράσινου και ροδαμίνης). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε μία ακόμα επανάληψη.

Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται ότι η κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα BRI1 (BRI1b) σε φυσιολογικές συνθήκες και απουσία της ορμόνης BL βρίσκεται σε ομοδιμερή μορφή στο κυτταρόπλασμα των πρωτοπλαστών, όπου εντοπίζεται και ο φθορισμός της λειτουργικής GFP πρωτεΐνης. Προσθήκη ορμόνης BL φαίνεται να προκαλεί μετατόπιση του σήματος των ομοδιμερών BRI1b μορίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των πρωτοπλαστών. Αντίθετα, προσθήκη του χημικού παράγοντα GDA, που οδηγεί σε καταστολή της δράσης των HSP90 πρωτεϊνών, φαίνεται από την εικόνα 38 να δίνει το ίδιο πρότυπο φθορισμού με αυτό του μάρτυρα. Αυτό δείχνει ότι το Hsp90 σύστημα δεν επηρεάζει το διμερισμό της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα BRI1, ούτε την τοποθέτησή του στο κυτταρόπλασμα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, απουσία ορμονών BR ο υποδοχέας BRI1 εντοπίζεται με ομοδιμερή διαμόρφωση στην πλασματική μεμβράνη (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010; Jaillais Y et al., 2011a) εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εσφαλμένη μεταφορά σημάτων. Πρόσδεση, όμως, της ορμόνης BR από την εξωκυτταρική LRR περιοχή του ομοδιμερούς BRI1 πιστεύεται ότι οδηγεί την πρωτεΐνη σε αλλαγή της διαμόρφωσής της ενεργοποιώντας τη δράση της ως κινάση και την αυτό-φωσφορυλίωσή της. Είναι ήδη γνωστό ότι όταν οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών στα ζωικά κύτταρα ολοκληρώσουν το λειτουργικό τους ρόλο οδηγούνται για ανακύκλωση στα ενδοσώματα (Wiley H.S, 2003). Το ίδιο συμβαίνει και με τον υποδοχέα των μπρασσινοστεροειδών ορμονών (BRI1). Έτσι προσθήκη της ορμόνης BL προκαλεί τη μετατόπιση των ομοδιμερών του υποδοχέα BRI1 στα ενδοσώματα όπου και γίνεται η ανακύκλωσή τους.

Προσθήκη του καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών (GDA) δεν παρεμπόδισε το διμερισμό των δύο περιοχών του υποδοχέα BRI1, όπως φάνηκε στις εικόνες 37 και 38, αποδεικνύοντας ότι το Hsp90 σύστημα δε διαδραματίζει κάποιον ιδιαίτερο ρόλο στο διμερισμό του υποδοχέα των μπρασσινοστεροειδών ορμονών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Θεωρητικό υπόβαθρο δράσης του Hsp90 συστήματος

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSPs) προστατεύουν τα κύτταρα από τα τοξικά αποτελέσματα των διαφόρων μορφών στρες, συμπεριλαμβανομένου του θερμικού στρες, μέσω της συνοδευτικής δράσης τους στις υπόλοιπες πρωτεΐνες του κυττάρου. Επιπλέον, μέλη των διαφόρων οικογενειών των πρωτεϊνών αυτών παίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών σε φυσιολογικές συνθήκες (Pratt W.B and Toft D.O, 2003; Young J.C et al., 2003).

Οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούν μια πολύ συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών τόσο μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών όσο και μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών. Παρόλο που ονομάζονται θερμοεπαγόμενες, η έκφρασή τους δεν εμφανίζεται μόνο κάτω από συνθήκες καταπόνησης αλλά ανιχνεύεται ικανοποιητικά και σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των οργανισμών. Τα μέλη της οικογένειας των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών HSP90, αποτελούν μοριακούς συνοδούς, οι οποίοι εμπλέκονται στη σωστή διαμόρφωση ορισμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια μεταβίβασης σήματος, όπως είναι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών και οι πρωτεϊνικές κινάσες (Luo J and Benovic J.L, 2003; Pai K.S et al., 2001; Vanaja D.K et al., 2002). Στα περισσότερα κύτταρα, τα επίπεδα των πρωτεϊνών HSP90 φτάνουν το 1-2% του συνόλου των πρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες και αυξάνουν σημαντικά όταν τα κύτταρα υποστούν θερμικό ή άλλου τύπου στρες (Morimoto R.I, 1998). Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχουν δείξει ότι το 10% του πρωτεώματος της ζύμης αλληλεπιδρά με τις HSP90 πρωτεΐνες (Zhao R et al., 2005). Ο μεγάλος αριθμός των πρωτεϊνών-στόχων του Hsp90 συστήματος δηλώνει το καθολικό ρόλο που διαδραματίζει στην ανάπτυξη των οργανισμών. Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλους οργανισμούς όπως είναι η μύγα *Drosophila melanogaster* και το φυτό *Arabidopsis thaliana*, υποδηλώνουν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της αύξησης και της ανάπτυξης των οργανισμών (Genest O et al., 2011). Μελέτες στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής δείχνουν ότι κατέχουν ευρύ πεδίο δράσης το οποίο περιλαμβάνει: σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών-στόχων, συμμετοχή στη μεταγωγή σήματος και στη μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου μεμβρανών και άμεση επιρροή στη φαινοτυπική δυναμικότητα των οργανισμών. Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν χαρακτηριστεί επτά μέλη της οικογένειας των HSP90 πρωτεϊνών. Από αυτά, τα τέσσερα χαρακτηρίζονται ως κυτταροπλασματικά μέλη (*HSP90.1, 2, 3* και *4*), ενώ τα υπόλοιπα χαρακτηρίζονται ως οργανιδιακά μελή (*HSP90.5, 6* και *7*) (Krishna P and Gloor G, 2001). Από αυτά τα μέλη στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι πρωτεΐνες των γονιδίων *HSP90.1* και *HSP90.3* που αποτελούν τα δύο από τα τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη.

2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών και γιββερελλινών ορμονών

Όπως είναι ευρέως γνωστό, η ανάπτυξη των φυτών διαμορφώνεται από τη σύγκλιση πολλών περιβαλλοντικών και ενδογενών σημάτων. Οι μηχανισμοί όμως που επιτρέπουν την ενοποίηση και ρύθμιση τέτοιων σηματοδοτικών μονοπατιών παραμένουν ακόμα άγνωστοι. Μια τέτοια περίπτωση είναι και η από κοινού δράση του μονοπατιού των BR ορμονών και του μονοπατιού των GA ορμονών για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Πολλές μελέτες σε επίπεδο φυσιολογίας υποστηρίζουν τη συνεργασία μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών (Sun T.P, 2011; Clouse S.D, 2011; Jaillais Y and Chory J, 2010). Όμως, παρά τις φυσιολογικές ενδείξεις για αλληλο-επικαλυπτόμενες δράσεις μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών, η σχέση των μονοπατιών αυτών σε μοριακό επίπεδο παραμένει ασαφής. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα από γενετικές, βιοχημικές και γονιδιωματικές αναλύσεις συνηγορούν στην άποψη ότι τα μονοπάτια των ορμονών GA και BR δρουν συνεργιστικά μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ βασικών στοιχείων του κάθε μονοπατιού (Qian-Feng L and Jun-Xian H, 2013). Βάση των αποτελεσμάτων των ερευνών αυτό έχει προταθεί ένας μοριακός μηχανισμός δράσης μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των ορμονών BR και GA και του μονοπατιού που επάγεται από το φως. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό η δράση μεταξύ των ορμονικών μονοπατιών GA και BR βασίζεται στην απενεργοποίηση του παράγοντα BZR1 από τις πρωτεΐνες DELLA (Gallego-Bartoloméa J et al., 2012).

Έχοντας υπόψη τις έρευνες στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* που δείχνουν ότι το 10% του πρωτεώματος της αλληλεπιδρά με την HSP82 (Zhao et al., 2005), πολύ πιθανόν οι HSP90 πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν με κάποια ή κάποιες από τις πρωτεΐνες των μονοπατιών των BR και GA ορμονών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη του ρόλου του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασινοστεροειδών (BR) και γιββερελλινών (GA) ορμονών. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών με βασικές πρωτεΐνες των μονοπατιών των BR και GA ορμονών. Κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων HSP90 κυτταροπλασματικών μελών αποτέλεσε το πρότυπο έκφρασής τους. Συγκεκριμένα το *HSP90.1* γονίδιο αποτελεί το καθαρά θερμοεπαγόμενο μέλος της οικογένειας, ενώ το γονίδιο *HSP90.3* παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης από τα τρία μέλη της οικογένειας που ανιχνεύονται ομαδοποιημένα στο χρωμόσωμα 5 του φυτού *Arabidopsis thaliana*.

2.1 Οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κομβικά μόρια του μονοπατιού των GA ορμονών

Ο έλεγχος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ξεκίνησε με ένα κομβικό μόριο-ρυθμιστή του μονοπατιού των GA ορμονών, την πρωτεΐνη RGA και των HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεϊνών. Έτσι, ελέγχθησαν οι αλληλεπίδραση των HSP90.1 και HSP90.3 με την πρωτεΐνη RGA *in planta* και σε ετερόλογο

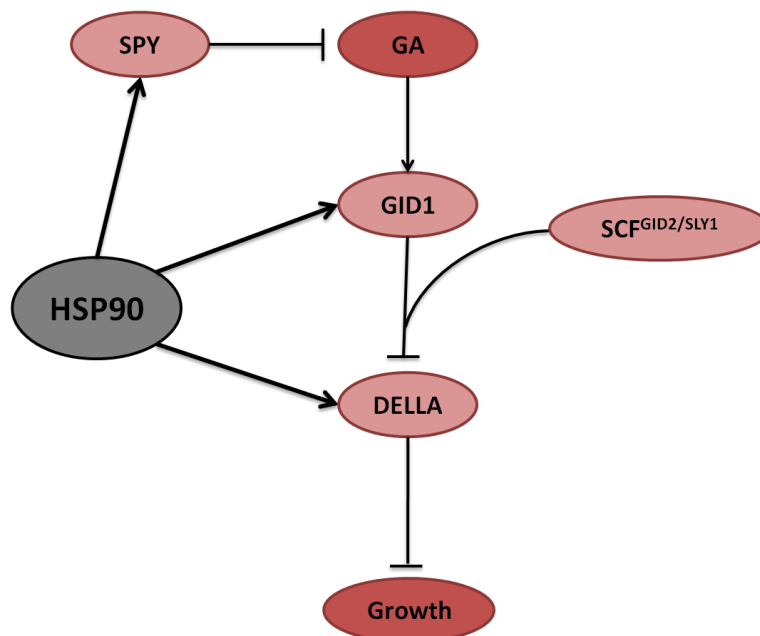
σύστημα έκφρασης. Τόσο στον καπνό όσο και στη ζύμη τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι HSP90.1 και HSP90.3 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RGA.

Η πρωτεΐνη RGA αποτελεί ένα από τα πέντε μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών DELLA. Οι πρωτεΐνες DELLA δρουν ως καταστολείς των σινιάλων των GA ορμονών ελλείψει βιοενεργών μορφών GA (Fleet C.M and Sun T-p, 2005). Ο μηχανισμός με τον οποίο οι πρωτεΐνες DELLA καταστέλλουν την απόκριση του φυτού σε σινιάλα των GA ορμονών παραμένει μέχρι και σήμερα ασαφής. Μια σημαντική λειτουργία των πρωτεϊνών DELLA είναι ότι αλληλεπιδρούν με ποικίλες κατηγορίες ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Μέσα από αυτές τις αλληλεπιδράσεις οι πρωτεΐνες DELLA ενισχύουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA των μεταγραφικών παραγόντων (Feng S et al., 2008) ή αναστέλλουν τη δραστηριότητα των μεταγραφικών ρυθμιστών (Hou X et al., 2010). Είναι ήδη γνωστό ότι οι πρωτεΐνες DELLA είναι πυρηνικά εντοπισμένοι καταστολείς οι οποίοι μπορεί να δρουν και ως μεταγραφικοί παράγοντες (Ogawa M et al., 2000). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα πρόσφατα ευρήματα ότι η πρωτεΐνη RGA είναι σε θέση να συνδεθεί με το DNA (Zentella R et al., 2007; Zhang Z.L et al., 2011).

Από τον έλεγχο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων γίνεται λοιπόν φανερός ο ουσιώδης ρόλος που διαδραματίζει η πρωτεΐνη HSP90 στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος των GA ορμονών. Τρεις φαίνεται να είναι οι πιθανοί ρόλοι που μπορεί να διαδραματίζει η HSP90 στο φαινόμενο αυτό. Πρώτον, η HSP90 λόγω της ιδιότητας να λειτουργεί ως μοριακός συνοδός μπορεί να συμβάλλει στη διατήρηση της σωστής ενεργής διαμόρφωσης της RGA πρωτεΐνης. Πιθανώς η RGA πρωτεΐνη να είναι ανίκανη να τροποποιείται και να λαμβάνει την ορθή διαμόρφωση που τη θέτει σε λειτουργική κατάσταση. Η αλληλεπίδραση με την HSP90 επιτρέπει την τροποποίηση και διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες αυτού ή άλλου μονοπατιού. Δεύτερον, η HSP90 πρωτεΐνη μπορεί να απαιτείται για τη μετακίνηση της πρωτεΐνης RGA στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να καταστείλει το μονοπάτι των GA ορμονών. Υπάρχει βέβαια η πιθανότητα οι δυο παραπάνω ρόλοι της HSP90 να δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η πρωτεΐνη HSP90 να χρειάζεται τόσο για τη λήψη και διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης RGA όσο και για την είσοδο της στον πυρήνα των κυττάρων. Ένα άλλο κομβικό σημείο για την έναρξη της μεταγωγής του σήματος των GA ορμονών είναι η καταστολή των πρωτεϊνών DELLA μέσω της αποικοδόμησης τους από το πρωτεάσωμα 26S. Αυτό είναι ένα τρίτο πιθανό σημείο εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών, οι οποίες ως μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται σε διαδικασίες ανακύκλωσης ή αποικοδόμησης πρωτεϊνών (Echeverria et al., 2009).

Σε συνδυασμό με τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 (HSP90.1 και HSP90.3) και της πρωτεΐνης RGA κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθούν και άλλες πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών για τυχόν αλληλεπιδράσεις με τις HSP90 πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες του μονοπατιού των GA ορμονών που επιλέχθηκαν για να ελεγχθούν για τυχόν αλληλεπιδράσεις με τις HSP90 πρωτεΐνες είναι οι εξής: α) Η πρωτεΐνη GAI η οποία αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών

DELLA, β) οι πρωτεΐνες GID1a και GID1b, που είναι οι βασικοί υποδοχείς των ορμονών GA στους περισσότερους οργανισμούς και γ) η πρωτεΐνη SPY, που είναι ένας βασικός αρνητικός ρυθμιστής στο μονοπάτι των γιββερελλινών. Με το σύστημα δύο υβριδίων ανιχνεύτηκαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 και σημαντικών πρωτεϊνών του GA μονοπατιού (Σχήμα 1). Το σύστημα δύο υβριδίων έδειξε ότι και η πρωτεΐνη GAI που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών DELLA, όπως και η πρωτεΐνη RGA, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3. Επίσης, το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με τους υποδοχείς των GA ορμονών, GID1a και GID1b, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3. Τέλος, ένας σημαντικός ρυθμιστής του GA μονοπατιού, η πρωτεΐνη SPY, φαίνεται να αλληλεπιδρά και αυτή με την πρωτεΐνη HSP90.1. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με παλαιότερα αποτελέσματα του εργαστηρίου στα οποία είχε δειχθεί η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραπάνω μορίων με τη βοήθεια φυσιολογικών παρατηρήσεων και αναλύσεων μεταγραφημάτων.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των HSP90 πρωτεϊνών και κομβικών μορίων του μονοπατιού GA.

Οι HSP90 πρωτεΐνες φαίνεται να επιτελούν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής των σημάτων από τις GA ορμόνες καθώς αλληλεπιδρούν με μια πληθώρα μορίων του μονοπατιού αυτού. Οι αλληλεπιδράσεις που εντοπίστηκαν ήταν μεταξύ των HSP90 πρωτεϊνών και των υποδοχέων των GA ορμονών καθώς και με αρνητικούς ρυθμιστές του μονοπατιού αυτού, όπως είναι οι πρωτεΐνες DELLA και η πρωτεΐνη SPY.

Όπως γίνεται φανερό οι HSP90 πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια ρύθμισης του μονοπατιού των GA ορμονών. Ο πιθανός ρόλος των HSP90 πρωτεϊνών είναι η τροποποίηση και διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης κομβικών πρωτεϊνών του μονοπατιού των GA ορμονών με σκοπό τη

ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τις GA ορμόνες μέσα στο κύτταρο για την επαγωγή ή καταστολή της ανάπτυξης του οργανισμού. Ταυτόχρονα, σημαντική είναι και η πιθανότητα εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών σε διαδικασίες αποικοδόμησης κομβικών μορίων του μονοπατιού αυτού.

2.2 Οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κομβικά μόρια του μονοπατιού των BR ορμονών

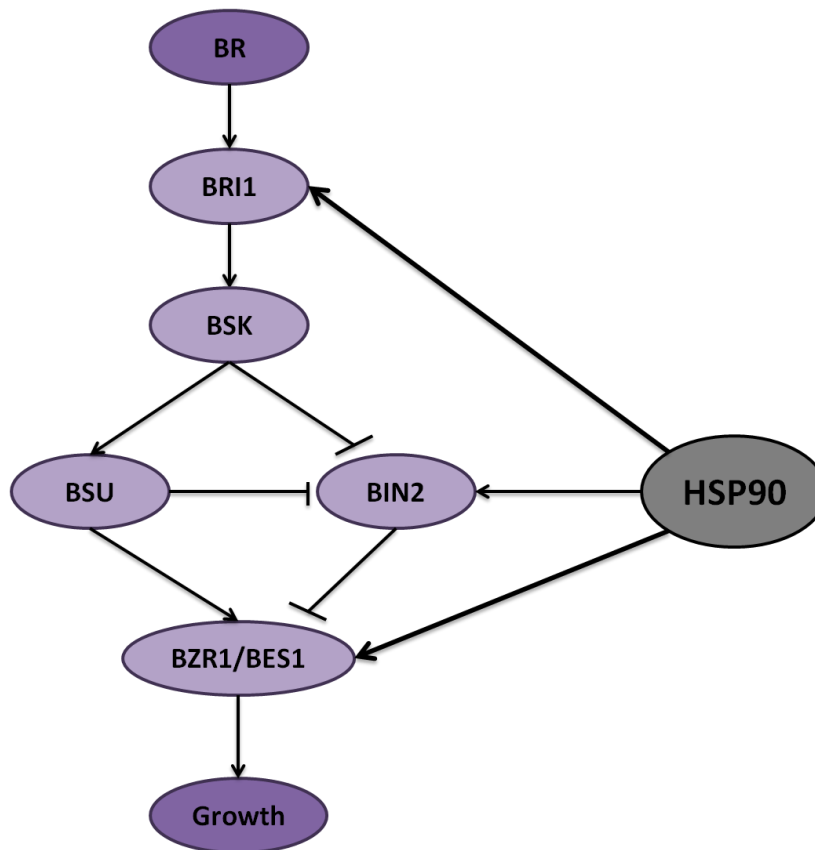
Γνωρίζοντας την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ στοιχείων των μονοπατιών των BR και GA ορμονών σε επίπεδο μεταγραφής, επόμενο βήμα με σκοπό την αποσαφήνιση της εμπλοκής του Hsp90 συστήματος σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις σε πρωτεϊνικό επίπεδο αποτέλεσε η μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90 (HSP90.1 και HSP90.3) και πρωτεϊνών του μονοπατιού των BR ορμονών με το σύστημα των δύο υβριδίων. Οι πρωτεΐνες του μονοπατιού των BR ορμονών που επιλέχθηκαν με σκοπό να ελεγχθούν για τυχόν αλληλεπιδράσεις με τις HSP90 πρωτεΐνες είναι οι εξής: α) οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες του μονοπατιού, BZR1 και BES1, και ο υποδοχέας των BR ορμονών, BRI1, ο οποίος χωρίστηκε σε δύο υπομονάδες, την BRI1a και BRI1b. Η υπομονάδα BRI1a περιλαμβάνει την εξωκυτταρική περιοχή (Extracellular Domain) που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της ορμόνης και για τον ολιγομερισμό του υποδοχέα, ενώ η υπομονάδα BRI1b περιλαμβάνει την κυτταροπλασματική περιοχή (Intracellular Domain), η οποία αποτελείται από την περιοχή της κινάσης (kinase domain, KD) και από την καρβόξυ-τελική περιοχή (C-terminal, CT). Τα αποτελέσματα του πειράματος με το σύστημα δύο υβριδίων δείχνουν ότι οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τους δύο πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες του μονοπατιού των BR ορμονών, BZR1 και BES1, καθώς και ότι η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα BRI1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HSP90.1, ενώ η κυτταροπλασματική περιοχή του αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HSP90.3.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα ζωικά συστήματα, έχουν δείξει ότι για να μετακινηθούν οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να προσδεθούν στα υποστρώματά τους, χρειάζονται παρουσία της HSP90. Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί τόσο στους υποδοχείς οιστρογόνων (Devin-Leclerc et al., 1998, Elbi et al., 2004) όσο και στους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών ορμονών (Katar et al., 2006; Echeverria et al., 2009). Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στο μοντέλο ότι ο υποδοχέας σχηματίζει ετεροσύμπλοκο με την HSP90 το οποίο εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων. Στη συνέχεια η HSP90 αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα ώστε να μπορέσει ο υποδοχέας να προσδεθεί στην αντίστοιχη ορμόνη (Echeverria et al., 2009). Επίσης, στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει παρατηρηθεί παρόμοια μετακίνηση της HSP90 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασινοστεροειδών ορμονών. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι η κινάση BIN2 (Brassinosteroid insensitive 2) αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη HSP90 προκειμένου να ολοκληρωθεί η μεταγωγή του σήματος των BR ορμονών (αποτελέσματα εργαστηρίου).

Ένα παρόμοιο μοντέλο μπορεί να προταθεί και για την εμπλοκή του Hsp90 συστήματος μοριακού συνοδού στο μονοπάτι των BR ορμονών στους φυτικούς οργανισμούς. Η αλληλεπίδραση της HSP90

πρωτεΐνης με των υποδοχέα των BR ορμονών (BR1a και BR1b) μπορεί να συμβάλλει τόσο στη λήψη της ορθής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης BR1, που την καθιστά ικανή να αλληλεπιδράσει με την ορμόνη-υπόστρωμα, όσο και στη διατήρηση της κατάστασης της πρωτεΐνης για να μπορέσει να αναγνωριστεί από τους υποδοχείς των πόρων της πλασματικής μεμβράνης και να τοποθετηθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Ένα άλλο κομβικό σημείο για τη σωστή λειτουργία των υποδοχέων των BR ορμονών είναι η ανακύκλωση του υποδοχέα BR1, σε ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μορφή με τον υποδοχέα BAK1, στα ενδοσώματα ανακύκλωσης. Αυτό είναι ένα τρίτο πιθανό σημείο εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών, οι οποίες ως μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται σε διαδικασίες ανακύκλωσης ή αποικοδόμησης πρωτεϊνών.

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων BES1 και BZR1 με την πρωτεΐνη HSP90 διττός φαίνεται να είναι ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίζει η HSP90 πρωτεΐνη σε αυτό το σημείο του μονοπατιού. Όπως είναι ήδη γνωστό πρόσδεση των ορμονών BR στον υποδοχέα BR1 οδηγεί σε συσσώρευση των πρωτεϊνών BZR1 και BES1 στον πυρήνα. Ο μεταγραφικός παράγοντας BES1 ενεργοποιεί γονίδια τα οποία επάγονται από τα σινιάλα των ορμονών BR, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας BZR1 όχι μόνο ενεργοποιεί τα γονίδια αυτά αλλά καταστέλλει και τα γονίδια βιοσύνθεσης των ορμονών BR, οδηγώντας σε καταστολή της ανατροφοδότησης της βιοσύνθεσης των ορμονών BR (Gampala S.S et al., 2007). Η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων BES1 και BZR1 με την πρωτεΐνη HSP90, που λειτουργεί ως μοριακός συνοδός, φαίνεται να επιτρέπει την τροποποίηση και διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης των μεταγραφικών αυτών παραγόντων προάγοντας πιθανόν την αλληλεπίδρασή τους με υποκινητές γονιδίων-στόχων. Επίσης, η πρωτεΐνη HSP90 μπορεί να είναι απαραίτητη και για την μετακίνηση των μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα των κυττάρων προκειμένου να ενεργοποιηθούν ή και να καταστείλουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων. Αυξημένη βέβαια είναι η πιθανότητα οι δυο παραπάνω ρόλοι της HSP90 να δρουν συνεργιστικά.



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των HSP90 πρωτεϊνών και κομβικών μορίων του μονοπατιού BR.

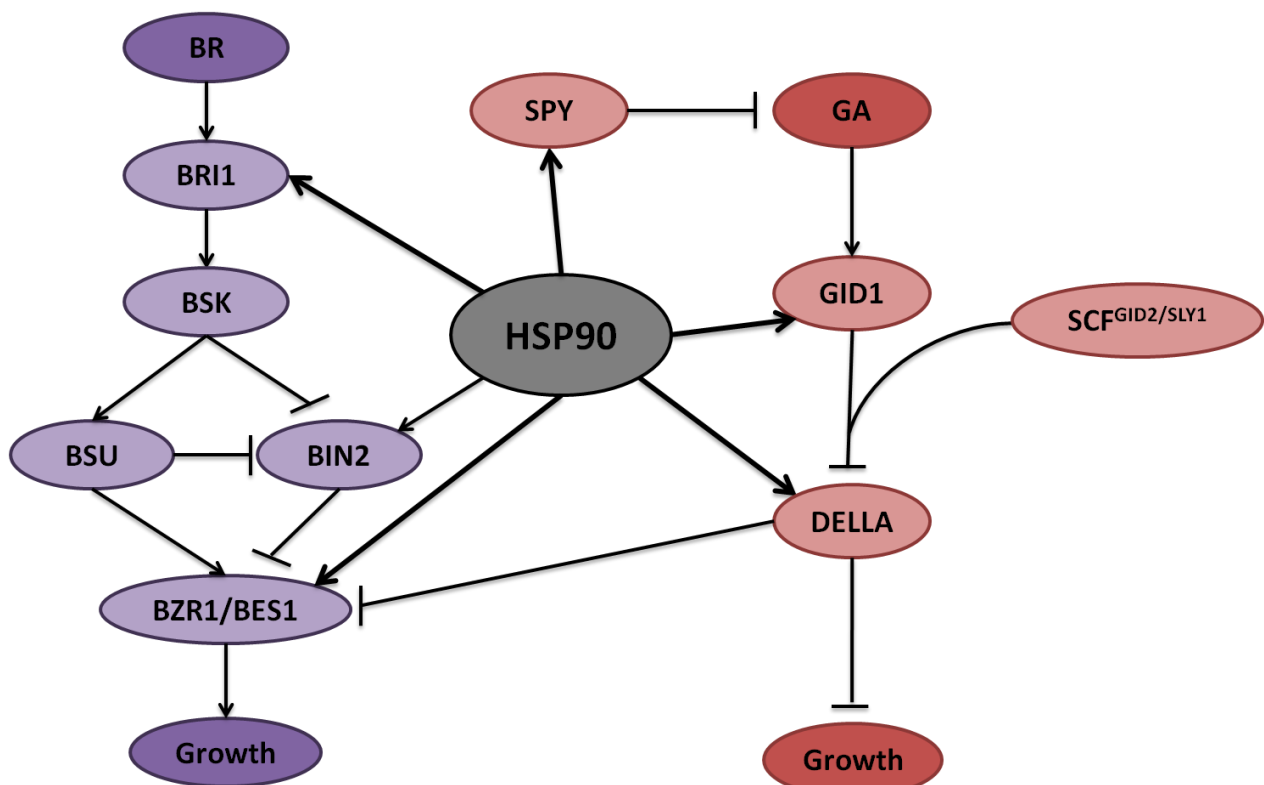
Οι HSP90 πρωτεΐνες φαίνεται να επιτελούν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής των σημάτων από τις BR ορμόνες καθώς αλληλεπιδρούν με μια πληθώρα μορίων του μονοπατιού αυτού. Οι πρωτεΐνες HSP90 αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των BR ορμονών (BRI1) καθώς και με σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες (BZR1/BES1) του μονοπατιού αυτού. Επίσης, είναι ήδη γνωστό ότι οι HSP90 αλληλεπιδρούν και με την πρωτεΐνη BIN2 του μονοπατιού.

Όπως γίνεται φανερό οι HSP90 πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια ρύθμισης του μονοπατιού των BR ορμονών. Ο πιθανός ρόλος των HSP90 πρωτεϊνών είναι η τροποποίηση και διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης κομβικών πρωτεϊνών του μονοπατιού των BR ορμονών με σκοπό τη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τις BR ορμόνες μέσα στο κύτταρο για την επαγωγή ή καταστολή άλλων αναπτυξιακών μονοπατιών. Ταυτόχρονα, σημαντική παραμένει και η πιθανότητα εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών σε διαδικασίες ανακύκλωσης κομβικών μορίων του μονοπατιού αυτού.

2.3 Ο ρόλος του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασισινοστεροειδών (BR) και γιββερελλινών (GA) ορμονών

Οι HSP90 πρωτεΐνες δρουν ως μόρια-συνοδοί (molecular chaperone) σε όλα τα είδη κυττάρων και για το λόγο αυτό ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε μη καταπονημένα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ως εκ

τούτου, οι Hsp90 αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία πρωτεϊνικών μορίων, όπως υποδοχείς στεροειδών ορμονών, κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες προωθώντας τη σωστή αναδίπλωση και λειτουργία τους (Tairale et al., 2010). Το Hsp90 τσαπερόνιο έχει την ικανότητα να ρυθμίζει, μέσω παροδικών αλληλεπιδράσεων, τη διαμόρφωση και τη λειτουργία άλλων ασταθών πρωτεϊνών/πελατών οι οποίες αποτελούν βασικά μόρια βιολογικών μονοπατιών (Echeverria and Picard, 2010). Τέτοιος φαίνεται να είναι και ο ρόλος του στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος των BR και GA ορμονών. Τα πειραματικά αποτελέσματα στην παρούσα μελέτη αποδεικνύουν τον εκτεταμένο ρόλο των HSP90 πρωτεϊνών στη μεταγωγή ορμονικών σιγνάλων μέσω αλληλεπιδράσεών τους με κομβικά μόρια των BR και GA μονοπατιών. Ταυτόχρονα, πολλές είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν τη συνεργασία μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης σε επίπεδο φυσιολογίας (Sun T.P, 2011; Clouse S.D, 2011; Qian-Feng L and Jun-Xian H, 2013). Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν την άμεση αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων BZR1/BES1 του BR μονοπατιού με τις πρωτεΐνες RGA και GAI (πρωτεΐνες DELLA) του GA μονοπατιού (Σχήμα 3) (Gallego-Bartoloméa J et al., 2012).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών των μπρασισινοστεροειδών (BR) και γιββερελλινών (GA) ορμονών.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των μπρασισινοστεροειδών και γιββερελλινών ορμονών αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της καταστολής των μεταγραφικών παραγόντων BZR1/BES1, του BR μονοπατιού, από τις πρωτεΐνες DELLA, του GA μονοπατιού. Άλλες απευθείας αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων των δύο αυτών μονοπατιών είναι επίσης πιθανές. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές

είναι πιθανόν να καταλύονται από το Hsp90 σύστημα μοριακού συνοδού. Οι πρωτεΐνες HSP90 αποδεικνύεται ότι αλληλεπιδρούν με μια πληθώρα σημαντικών μορίων και από τα δύο μονοπάτια.

Όπως αποδεικνύεται στην παρούσα μελέτη οι πρωτεΐνες DELLA και οι μεταγραφικοί παράγοντες BZR1/BES1 αλληλεπιδρούν με τις HSP90 πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό είναι μια σημαντική ένδειξη για το ρόλο που πιθανόν διαδραματίζει το Hsp90 σύστημα στην αλληλεπίδραση των δύο αυτών μονοπατιών. Εκτός όμως από αυτές τις αλληλεπιδράσεις στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν και αλληλεπιδράσεις των HSP90 πρωτεϊνών με μια πληθώρα πρωτεϊνικών μορίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταφοράς των μηνυμάτων των BR και GA ορμονών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ισχυροποιούν ακόμα περισσότερο τις ενδείξεις για το ρόλο του Hsp90 συστήματος στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών αυτών. Μια σημαντική παρατήρηση είναι η τάση των HSP90 πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν με μόρια που επιτελούν ανάλογους ρόλους και στα δύο μονοπάτια. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς των GA ορμονών (GID1a και GID1b) αλλά και των BR ορμονών (BRI1). Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με τους αρνητικούς ρυθμιστές των δύο μονοπατιών. Όπως γίνεται φανερό οι HSP90 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες DELLA του GA μονοπατιού καθώς και με την πρωτεΐνη BIN2 του BR μονοπατιού. Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών φαίνεται να είναι η άμεση ή έμμεση καταστολή της μεταγωγής του σήματος των GA και BR ορμονών, αντίστοιχα. Μέσα από αυτές τις παρατηρήσεις γίνεται φανερό ότι οι HSP90 πρωτεΐνες δρουν μέσω ενός αρκετά συντηρημένου προτύπου με σκοπό τον αυστηρό έλεγχο για την ορθή μετάδοση των μηνυμάτων μέσα στον οργανισμό. Πιθανόν το Hsp90 τσαπερόνιο να είναι αυτό που μέσα από τη δημιουργία παροδικών συμπλόκων με κομβικά μόρια των δύο αυτών σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγεί στην αλληλεπίδρασή τους και στην αμοιβαία μεταφορά μηνυμάτων από και προς τα μονοπάτια αυτά με σκοπό την ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού.

3. Θεωρητικό υπόβαθρο της λειτουργίας του υποδοχέα των BR ορμονών, BRI1

Η πρωτεΐνη BRI1, όπως και άλλες φυτικές πρωτεΐνες με επαναλαμβανόμενες LRR RPKs περιοχές, έχει παρόμοια οργάνωση των λειτουργικών της περιοχών με αυτή που έχουν οι υποδοχείς της τυροσίνης στα θηλαστικά (mammalian receptor tyrosine kinases, RTKs) και οι υποδοχείς των μεταγραφικών παραγόντων ανάπτυξης (transforming growth factor- β , TGF- β) (Pawson T, 2004; Hubbard S.R and Miller W.T, 2007). Ο υποδοχέας BRI1 αντιλαμβάνεται το σήμα της ορμόνης BR μέσω της εξωκυτταρικής περιοχής του και στη συνέχεια ενεργοποιεί μια σειρά διαδοχικών διαδικασιών για τη μεταγωγή του σήματος μέσω της δράσης της κυτταροπλασματικής κινάσης (Zhou A et al., 2004; Osakabe Y et al., 2005). Σήμερα είναι γνωστό ότι απουσία ορμονών BR ο υποδοχέας BRI1 εντοπίζεται με ομο-διμερή διαμόρφωση στην πλασματική μεμβράνη (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010; Jaillais Y et al., 2011a) εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εσφαλμένη μεταφορά σημάτων (Jaillais Y et al., 2011a; Wang Z.Y et al., 2012). Ο ανασταλτικός αυτός

μηχανισμός περιλαμβάνει και τη δράση της κινάσης BKI (BRI1 Kinase Inhibitor 1), η οποία δεσμεύεται στην περιοχή της κινάσης του υποδοχέα BRI1 κρατώντας αδρανή την περιοχή LRR-RLK (Jaillais Y et al., 2011b). Πρόσδεση, όμως, της ορμόνης BR από την εξωκυτταρική LRR περιοχή του ομοδιμερούς BRI1 πιστεύεται ότι οδηγεί την πρωτεΐνη σε αλλαγή της διαμόρφωσής της ενεργοποιώντας τη δράση της ως κινάση και την αυτό-φωσφορυλίωσή της (Kim T.W and Wang Z.Y, 2010; Jaillais Y et al., 2011a). Τέλος, μέσω διαδοχικών φωσφορυλίσεων μεταξύ των πρωτεϊνών BRI1 και BAK1, ο υποδοχέας BRI1 αποκτά ολοκληρωτικά ενεργότητα κινάσης και η μεταγωγή του σήματος ξεκινά (Bücherl C.A et al., 2013).

Όταν οι υποδοχείς ολοκληρώσουν το λειτουργικό τους ρόλο οδηγούνται για ανακύκλωση. Το ίδιο συμβαίνει και με τον υποδοχέα των μπρασσινοστεροειδών ορμονών (BRI1). Η ανακύκλωση των υποδοχέων έχει μελετηθεί επαρκώς σε ζωικά κύτταρα. Για παράδειγμα, όλα τα μέλη των υποδοχέων της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων (EGFR) εντοπίζονται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη και μόνο απουσία των μορίων/υποστρωμάτων εσωτερικεύονται στο κυτταρόπλασμα ώστε να επιστρέψουν σύντομα και πάλι πίσω στην πλασματική μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων και ενεργοποίηση των υποδοχέων τους (EGFR) έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ενδοκύττωσης που τελικά θα οδηγήσει τους υποδοχείς στα λυσοσώματα (Wiley H.S, 2003). Αποδείξεις ότι παρόμοιοι μηχανισμοί λειτουργούν και στα φυτά ήρθαν από μελέτες που δείχνουν ότι μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως ο μεταφορέας εκροής της αυξίνης, PIN1 (Geldner N et al., 2001), οι πηκτίνες του κυτταρικού τοιχώματος (Baluska F et al., 2002) και οι στερόλες (Grebe M et al., 2003), ανακυκλώνονται μέσω των ενδοσωμάτων στα φυτά *Arabidopsis thaliana* και *Zea mays*. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα ενδοσώματα είναι ο πρώτος σταθμός διαλογής των εσωτερικευμένων υποδοχέων. Από αυτό το σημείο και έπειτα, κάποιοι υποδοχείς ανακυκλώνονται στην πλασματική μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης, ενώ κάποιοι άλλοι στέλνονται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, η οποία διευκολύνεται με την ουμπικουιλίνωση των υποδοχέων (Gruenberg J, 2001). Το πρότυπο ανακύκλωσης που ακολουθούν οι υποδοχείς των μπρασσινοστεροειδών ορμονών (BRI1) είναι μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης, τα οποία τους επιτρέπουν να επιστρέφουν και πάλι στην πλασματική μεμβράνη (Geldner N and Robatzek S, 2008).

Έχοντας ήδη αποδείξει ότι η πρωτεΐνη HSP90.1 αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1a) και ότι η πρωτεΐνη HSP90.3 αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1b) κρίθηκε σκόπιμο σε επόμενο βήμα να μελετηθεί και το στάδιο εμπλοκής των HSP90 με τον υποδοχέα BRI1. Όπως φαίνεται, από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των BR ορμονών, ο διμερισμός του υποδοχέα BRI1 είναι ένα κομβικό σημείο για τη μεταφορά ή μη των ορμονικών σιγνάλων μέσα στο κύτταρο. Έτσι αποφασίστηκε να ελεγχθεί αν το Hsp90 σύστημα επιτελεί κάποιο ρόλο στον ομοδιμερισμό του υποδοχέα BRI1.

3.1 Ο ρόλος του HSP90 συστήματος στον ομο-διμερισμό του υποδοχέα των BR ορμονών, BRI1

Τα αποτελέσματα του SPLIT-GFP σε πρωτοπλάστες έδειξαν ότι απουσία της ορμόνης BL η εξωκυτταρική περιοχή (BRI1a) του υποδοχέα BRI1 εντοπίζεται σε διμερή διαμόρφωση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των πρωτοπλαστών. Χειρισμός των πρωτοπλαστών με την ορμόνη BL προκαλεί μετατόπιση του σήματος σε κυτταρικά οργανίδια των πρωτοπλαστών. Η μετατόπιση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην ανάγκη ανακύκλωσης των μορίων του υποδοχέα έπειτα από την εκπλήρωση της λειτουργικής τους δράσης ως υποδοχείς της ορμόνης BL. Έτσι, από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι αρχικά η ορμόνη BL προσδένεται στην ομο-διμερή περιοχή BRI1a του υποδοχέα που εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του πρωτοπλάστη, ενεργοποιώντας τον για τη μεταγωγή του σήματος. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της ενδοκύττωσης της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα, σύμφωνα με το πρότυπο ενδοκύττωσης των υποδοχέων των αυξητικών ορμονών (EGFR) στα ζωικά κύτταρα, για τη μεταφορά του στα ενδοσώματα όπου και ανακυκλώνεται. Χειρισμός των πρωτοπλαστών με τον καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA, έδειξε ότι η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα BRI1a εντοπίζεται και πάλι σε διμερή διαμόρφωση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των πρωτοπλαστών, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τον μάρτυρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το Hsp90 σύστημα δεν επηρεάζει τον ομο-διμερισμό του BRI1a.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε ο έλεγχος του ρόλου των HSP90 πρωτεϊνών στο διμερισμό της κυτταροπλασματικής περιοχής (BRI1b) του υποδοχέα BRI1. Τα αποτελέσματα του SPLIT-GFP σε πρωτοπλάστες έδειξαν ότι απουσία της ορμόνης BL η κυτταροπλασματική περιοχή (BRI1b) του υποδοχέα BRI1 εντοπίζεται σε διμερή διαμόρφωση στο κυτταρόπλασμα των πρωτοπλαστών. Χειρισμός των πρωτοπλαστών με την ορμόνη BL προκαλεί μετατόπιση του σήματος στην κυτταρική μεμβράνη των πρωτοπλαστών. Ενώ χειρισμός των πρωτοπλαστών με τον καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA, έδειξε ότι η κυτταροπλασματική περιοχή (BRI1b) του υποδοχέα BRI1 εντοπίζεται και πάλι σε διμερή διαμόρφωση στο κυτταρόπλασμα των πρωτοπλαστών, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τον μάρτυρα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το Hsp90 σύστημα δεν επηρεάζει τον ομο-διμερισμό του BRI1b.

Ενώ φαίνεται ότι η πρωτεΐνη HSP90.1 αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1a) και ότι η πρωτεΐνη HSP90.3 αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 (BRI1b), δε φαίνεται οι HSP90 πρωτεΐνες να εμπλέκονται στον ομοδιμερισμό καμιάς από τις δύο περιοχές του υποδοχέα BRI1. Αυτό συνεπάγεται την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης του σημείου αλληλεπίδρασης των HSP90 πρωτεϊνών με τον υποδοχέα BRI1. Το επόμενο βήμα θα μπορούσε να αφορά τη μελέτη της εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών κατά την ανακύκλωση του υποδοχέα BRI1 στα ενδοσώματα.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μελέτη είναι προφανής η εμπλοκή των HSP90 πρωτεϊνών στην ανάπτυξη των φυτών. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός πολύ καλά συντηρημένου μηχανισμού δράσης των HSP90 πρωτεϊνών ο οποίος φαίνεται να διαδραματίζει

καθοριστικό ρόλο σε όλα τα στάδια ρύθμισης της μεταγωγής των σημάτων μέσα στο φυτό. Οι HSP90 πρωτεΐνες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για τη συνεργασία των σηματοδοτικών μονοπατιών των BR και GA ορμονών, καθώς βρίσκονται στο επίκεντρο της λειτουργίας των δύο αυτών μονοπατιών αλληλεπιδρώντας με μια πληθώρα κομβικών μορίων.

Βιβλιογραφία

- **Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Van Der Straeten D, Genschik P, Moritz T and Harberd N.P.** 2007. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:6.484–9.
- **Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P and Genschik P.** 2008. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell.* 20:2.117-29.
- **Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beebster G.T and Genschik P.** 2009. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 19:1.188–93.
- **Alabadi D, Blazquez M.A, Carbonell J, Ferrandiz C, Perez-Amador M.A.** 2009. Instructive roles for hormones in plant development. *Int J Dev Biol.* 53:1.597–608.
- **Albanese V, Yam AY, Baughman J, Parnot C and Frydman J.** 2006. Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell.* 124:75-88.
- **An F, Zhang X, Zhu Z, Ji Y, He W, Jiang Z, Li M and Guo H.** 2012. Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. *Cell Res.* 22:915-27.
- **Ariizumi T and Steber C.M.** 2006. Ubiquitin becomes ubiquitous in GA signaling. *Plant physiology.* Fifth edition.
- **Auluck P.K and Bonini N.M.** 2002. Pharmacological prevention of Parkinson disease in Drosophila. *Nat Med.* 8:1185-6.
- **Auluck P.K, Chan H.Y, Trojanowski J.Q, Lee V.M and Bonini N.M.** 2002. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science.* 295:865-8.
- **Bai M.Y, Shang J.X, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun T.P and Wang Z.Y.** 2012. Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* 14:810-17.
- **Bajguz A and Hayat S.** 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Bioch.* 47:1-8.
- **Baluska F, Hlavacka A, Samaj J, Palme K, Robinson D.G, Matoh T, McCurdy D.W, Menzel D and Volkmann D.** 2002. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from Brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol.* 130:422–31.
- **Becker J and Craig EA.** 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 219:11-23.
- **Belkhadir Y and Chory J.** 2006. Brassinosteroid Signaling: A Paradigm for Steroid Hormone Signaling from the Cell Surface. *Science.* 314:1.410-11.
- **Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K and Scheres B.** 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature.* 433:39–44.
- **Bolle C.** 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta.* 218:683-92.

- **Boston R.S, Viitanen P.V and Vierling E.** 1996. Molecular chaperons and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*. 32:191-222.
- **Brian P.W.** 1959. Effects of gibberellins on plant growth and development. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 34:37–84.
- **Brierley-Hobson S.** 2008. Binding of (-)-epigallocatechin-3-gallate to the Hsp70 ATPase domain may promote apoptosis in colorectal cancer. *Biohorizons*. 1:9-18.
- **Bücherl C.A, van Esse G.W, Kruis A, Luchtenberg J, Westphal A.H, Aker J, van Hoek A, Albrecht C, Borst J.W and de Vries S.C.** 2013. Visualization of BRI1 and BAK1(SERK3) Membrane Receptor Heterooligomers during Brassinosteroid Signaling. *Plant Physiology*. 162:1.911-25.
- **Buchner J.** 1999. Hsp90 & Co. – a holding for folding. *TIBS*. 24:136-41.
- **Cadepond F, Jibard N, Binart N, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I and Baulieu E-E.** 1994. Selective deletions in the 90 kDa heat shock protein (Hsp90) impede heterooligomeric complex formation with the glucocorticosteroid receptor (GR) or hormone binding by GR. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 48:361-7.
- **Calderwood S.K, Khalegue M.A, Sawyer D.B and Ciocca D.R.** 2006. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 31:164-72.
- **Camberg J.L, Doyle S.M, Johnston D.M and Wickner S.** 2013. Molecular Chaperones. *Science Direct*. 456-60.
- **Cao D, Cheng H, Wu W, Soo H.M and Peng J.** 2006. Gibberellin mobilizes distinct DELLA dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 142:509–25.
- **Caplan A.J.** 1999. Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trnds Cell Biol*. 9:262-8.
- **Centenera M.M, Fitzpatrick A.K, Tilley W.D and Butler L.M.** 2013. Hsp90: Still a viable target in prostate cancer. *ScienceDirect*. 2:211-8.
- **Chandler P.M, Marion-Poll A, Ellis M and Gubler F.** 2002. Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol*. 129:181-90.
- **Cheminant S, Wild M, Bouvier F, Pelletier S, Renou J.P, Erhardt M, Hayes S, Terry M.J, Genschik P and Achard P.** 2011. DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetio- lation in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23:1.849–60.
- **Chen S and Smith D.F.** 1998. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem*. 273:35.194-200.
- **Chen S, Sullivan W.P, Toft D.O and Smith D.F.** 1998. Differential interactions of p23 and the TPRcontaining proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaperones*. 3:118-29.
- **Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards D.E, Cao D, Luo D, Harberd N.P and Peng J.** 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development*. 131:1055-64.
- **Clouse S.D.** 2011. Brassinosteroid signal transduction: From receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell*. 23:1219–30.
- **Clouse S.D, Langford M and McMorris T.C.** 1996. A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol*. 111:671-8.

- **Cyr D.M, Hohfeld J and Patterson C.** 2002. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci.* 27:368-75.
- **Daviere J-M and Achard P.** 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development.* 140:1147-51.
- **De Jong I.C, Ekkel E.D, Van de Burgwal J.A, Lambooj E, Korte S.M, Ruis M.A.W, Koolhaas J.M and Blokhuis H.J.** 1998. Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs. *Physiol. Behav.* 64:303-10.
- **Devin-Leclerc J, Meng X, Delahaye F, Leclerc P, Baulieu E.E and Catelli M.G.** 1998. Interaction and Dissociation by Ligands of Estrogen Receptor and Hsp90: The Antiestrogen RU 58668 Induces a Protein Synthesis-Dependent Clustering of the Receptor in the Cytoplasm. *Molecular Endocrinology.*
- **Dhaubhadel S, Browning K.S, Gallie D.R and Krishna P.** 2002. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J.* 29:681-91.
- **Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson K.F and Krishna P.** 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of Brassica napus and tomato seedlings. *Plant Mol Biol.* 40:333-42.
- **Djakovic-Petrovic T, De Wit M, Voesenek L.A and Pierik R.** 2007. DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J.* 51:117–126.
- **Dill A, Jung H.S and Sun T.P.** 2000. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 98:14162-14167.
- **Dill A and Sun T-p.** 2001. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI functions in Arabidopsis thaliana. *Genetics.* 159:777-85.
- **Dill A, Thomas S.G, Hu J, Steber CM and Sun T.P.** 2004. The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell.* 16:1392–405.
- **Ding D, Parkhutst S.M, Halsell S.R and Lipshitz H.D.** 1993. Dynamic Hsp83 RNA localization during Drosophila oogenesis and embryogenesis. *Molecular and Cellular Biology.* 13:3773-81.
- **Dobson C.M.** 2003. Protein folding and misfolding. *Nature.* 426:884-90.
- **Echeverria P.C and Picard D.** 2010. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim Biophys Acta.* 1803:641-9.
- **Echeverria P.C, Mazaira G, Erlejman A, Gomez-Sanchez C, Piwien Pilipuk G, Galigniana M.D.** 2009. Nuclear import of the glucocorticoid receptor-Hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin β . *Mol Cell Biol.* 29:4788–97.
- **Elbi C.C, Walker D.A, Romero G, Sullivan W.P, Toft D.O, Hager G.L, DeFranco D.B.** 2004. Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:2879-81.
- **Ellis R.J and SM van der Vies.** 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60:321-47.
- **Feder M.E and Hofmann G.E.** 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243-82.
- **Felsheim R.F and Das A.** 1992. Structure and expression of a heat-shock protein 83 gene of Pharbitis nil. *Plant Physiol.* 100:1764-71.

- **Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz J.M, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan L-M and Deng X-W.** 2008. Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature*. 451:475-9.
- **Filardo F.F and Swain S.M.** 2002. SPYing on GA Signaling and Plant Development. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22:163-75.
- **Fleet C.M and Sun T.P.** 2005. A DELLAcate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*. 8:77–85.
- **Fleet C.M, Yamaguchi S, Hanada A, Kawaide H, David C.J, Kamiya Y and Sun T.P.** 2003. Overexpression of AtCPS and AtKS in Arabidopsis confers increased ent-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiol*. 132:830–9.
- **Freeman B.C and Morimoto R.I.** 1996. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp71 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J*. 15:2969-79.
- **Fu X, Richards D.E, Fleck B, Xie D, Burton N and Harberd N.P.** 2004. The Arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*. 16:1406–18.
- **Gallego-Bartolomé J, Minguet E.G, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas S.G, Alabá D and Blázquez M.A.** 2012. Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109:13446-51.
- **Gallego-Bartolomé J, Minguet E.G, Marvín J.A, Prat S, Blázquez M.A and Alabá D.** 2010. Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Mol. Biol. Evol*. 27:1247-56.
- **Gampala S.S, Kim T.W, He J.X, Tang W, Deng Z, Bai M.Y, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron J.M, Chen H, Shibagaki N, Ferl R.J, Ehrhardt D and Chong K.** 2007. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell*. 13:177-89.
- **Geldner N, Friml J, Stierhof Y.D, Jurgens G and Palme K.** 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*. 413:425–8.
- **Geldner N and Robatzek S.** 2008. Plant Receptors Go Endosomal: A Moving View on Signal Transduction. *Plant Physiology*. 147:65–1574
- **Gendron J.M and Wang Z.Y.** 2007. Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*. 10:436–41.
- **Giacomelli L, Rota-Stabelli O, Masuero D, Acheampong A.K, Moretto M, Caputi L, Vrhovsek U and Moser C.** 2013. Gibberellin metabolism in *Vitis vinifera* L. during bloom and fruit-set: functional characterization and evolution of grapevine gibberellin oxidases. *Exp. Bot. J*. 64:4403-19.
- **Glickman M.H and Ciechanover A.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 82:373-428.

- **Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H and Matsuoka M.** 2004. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.* 37:626–34.
- **Grammatikakis N, Lin J.H, Grammatikakis A, Tschlis P.N and Cochran B.H.** 1999. p50 (cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol.* 19:1661-72.
- **Grebe M, Xu J, Mobius W, Ueda T, Nakano A, Geuze H.J, Rook M.B and Scheres B.** 2003. Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr. Biol.* 13:1378–87.
- **Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z.L, Powers S.J, Gong F, Phillips A.L, Hedden P, Sun T.P and Thomas S.G.** 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell.* 18:3399–414.
- **Gruenberg J.** 2001. The endocytic pathway: A mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:721–30.
- **Gubler F, Chandler P.M, White R.G, Llewellyn D.J and Jacobsen J.V.** 2002. Gibberellin signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* 129:191–200.
- **Hackett R.W and Lis J.T.** 1983. Localization of the hsp83 transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63B heat shock locus of *D. melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 11:7011-30.
- **Haralampidis K, Milioni D, Rigas St and Hatzopoulos P.** 2002. Combinational interaction of cis elements specifies the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiology.* 129:1138-49.
- **Harst A, Lin H and Obermann W.M.** 2005. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochemical Journal.* 387:789–96.
- **Hartl F.U.** 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 381:571-9.
- **Haubrick L.L and Assmann S.M.** 2006. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant Cell Environ.* 29:446-57.
- **He J.X, Gendron J.M, Sun Y, Gampala S.S, Gendron N, Sun C.Q and Wang Z.Y.** 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Department of Plant Biology.* 307:1634-8.
- **He J.X, Gendron J.M, Yang Y, Li J and Wang Z.Y.** 2002. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:10185-90.
- **Hedden P and Phillips A.L.** 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5:523–30.
- **Hohfeld J, Cyr D.M and Patterson C.** 2001. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* 2:885-90.
- **Holmgren R, Corces V, Morimoto R, Blackman R and Meselson M.** 1981. Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat-shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:3775-8.
- **Hong G.J, Xue X.Y, Mao Y.B, Wang L.J and Chen X.Y.** 2012. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell.* 24:2635-48.

- **Hou X, Lee L.Y, Xia K, Yan Y and Yu H.** 2010. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell.* 19:884-94.
- **Hubbard S.R and Miller W.T.** 2007. Receptor tyrosine kinases: Mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:117–23.
- **Hubert D.A, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K and Dang J.L.** 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO journal.* 22:5679-5689.
- **Hussain A, Cao D.N, Cheng H, Wen Z.L and Peng J.R.** 2005. Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellin-sensitivity of Arabidopsis RGL2 protein. *Plant J.* 44:88–99.
- **Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M and Yamaguchi J.** 2001. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell.* 13:999-1010.
- **Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *PubMed.* 153:163-8.
- **Itoh H, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Hasegawa Y, Minami E, Ashikari M and Matsuoka M.** 2005. Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol.* 46:1392–9.
- **Jacobsen S, Binkowski K and Olszewski N.** 1996. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. *P.N.A.S.* 93:9292-6.
- **Jaillais Y, Belkhadir Y, Balsemão-Pires E, Dangl J.L and Chory J.** 2011a. Extracellular leucine-rich repeats as a platform for receptor/coreceptor complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:8503–7.
- **Jaillais Y and Chory J.** 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol.* 17: 642–5.
- **Jaillais Y, Hothorn M, Belkhadir Y, Dabi T, Nimchuk Z.L, Meyerowitz E.M and Chory J.** 2011b. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev.* 25:232–7.
- **Jiang J, Zhang C and Wang X.** 2013. Ligand Perception, Activation, and Early Signaling of Plant Steroid Receptor Brassinosteroid Insensitive 1. *Plant Biology.* 55:1198-211.
- **Jakob U, Lilie H, Meyer I and Buchner J.** 1995. Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase - implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.* 270:7288-94.
- **Kalmar B and Greensmith L.** 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Science Direct.* 61:310-318.
- **Kamal A, Boehm M.F and Burrows F.J.** 2004. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends in Molecular Medicine.* 10:283-290.
- **Kanno Y, Hanada A, Chiba Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Matsui M, Koshihara T, Kamiya Y and Seo M.** 2012. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:9653–9658.

- **Kim T.W and Wang Z.Y.** 2010. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol.* 61:681–704.
- **King K.E, Moritz T and Harberd N.P.** 2001. Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics.* 159:767–76.
- **Klemenz R, Hultmark D and Gehring W.J.** 1985. Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. *Embo J.* 4:2053-60.
- **Koning A.J, Rose R and Comai L.** 1992. Developmental expression of tomato heat shock cognate protein 80. *Plant Physiology.* 100:801-811.
- **Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester H.J, Martinoia E.** 2012. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature.* 483:341–344
- **Krishna P.** 2003. Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *J Plant Growth Regul.* 22:289-297.
- **Krishna P and Gloor G.** 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell.* 6:238-246.
- **Krishna P, Reddy R.K, Sacco M, Frappier J.R and Felsheim R.F.** 1997. Analysis of the native forms of the 90 kDa heat shock protein (Hsp90) in plant cytosolic extracts. *Plant Mol Biol.* 33:457-466.
- **Krishna P, Sacco M, Cherutti J.F and Hill S.** 1995. Cold-Induced Accumulation of hsp90 Transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 107:915-923.
- **Krone P.H, Evans T.G and Blechinger S.R.** 2003. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 14:267-274.
- **Krukenberg K.A, Street T.O, Lavery L.A and Agard D.A.** 2011. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 44:229-55.
- **Lai B.T, Chin N.W, Stanek A.E, Keh W and Lanks K.W.** 1984. Quantitation and intracellular localization of the 85 K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol Cell Biol.* 4:2802–2810.
- **Lee S, Cheng H, King K.E, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd N.P and Peng J.** 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes Dev.* 16:646-58.
- **Lewin B.** 2004. Genes VIII. Published by Pearson Education Inc. Upper Saddle River, NJ 07458.
- **Li J and Nam K.H.** 2002. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGYlike kinase. *Science.* 295:1299-1301.
- **Liang P and MacRae T.H.** 1997. Molecular chaperons and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science.* 110:1431-40.
- **Linguist S and Craig E.A.** 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-77.
- **Luo J and Benovic J.L.** 2003. G protein-coupled receptor kinase interaction with Hsp90 mediates kinase maturation. *J Biol Chem.* 278:50908-14.
- **Marrs K.A, Casey E.S, Capitant S.A, Bouchard R.A, Dietrich P.S, Mettler I.J and Sinibaldi R.M.** 1993. Characterization of two maize hsp90 heat shock protein genes and expression during heat shock, embryogenesis and pollen development. *Developmental Genetics.* 14:27-41.

- **Mason C.A, Dunner J, Indra P and Colangelo T.** 1999. Heat-induced expression and chemically induced expression of the Escherichia coli stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol.* 65:3433-40.
- **McLaren A.** 1999. Too late for the midwife toad: stress, variability and Hsp90. *Trends Genet.* 15:169-71.
- **McLellan C.A, Turbyville T.J, Wijeratne E.M.K, Kerschen A, Vierling E, Queitsch C, Whitesell L and Gunatilaka A.A.L.** 2007. A rhizosphere fungus enhances Arabidopsis thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor. *Plant Physiol.* 145:174-82.
- **Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe S.M, Vaughan C.K, Vlasic I, Panaretou B, Piper P.W and Pearl L.H.** 2004. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J.* 23:1402-10.
- **Middleton A.M, Úbeda-Tomás S, Griffiths J, Holman T, Hedden P, Thomas S.G, Phillips A.L, Holdsworth M.J, Bennett M.J, King J.R and Owen M.R.** 2013. Mathematical modeling elucidates the role of transcriptional feedback in gibberellin signaling. *PNAS.* 109:7571-6.
- **Milioni D and Hantzopoulos P.** 1997. Genomic organization of Hsp90 gene family in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 35:955-61.
- **Millson S.H, Chua C-S, Mark Roe S, Polier S, Solovieva S, Pearl L.H, Sim T-S, Prodromou C and Piper P.W.** 2011. Features of the Streptomyces hygrosopicus HtpG reveal how partial geldanamycin resistance can arise with mutation to the ATP binding pocket of a eukaryotic Hsp90. *The FASEB journal.* 25:3828-37.
- **Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K and Yahara I.** 1994. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 14:1459-64.
- **Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T and Bishop G.J.** 2002. Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *Plant Cell.* 14:3163–76.
- **Morimoto R.I.** 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12:3788-96.
- **Morimoto R.I, Tissieres A and Georgopoulos C.** 1994. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Müssig C, Lisso J, Coll-Garcia D and Altmann T.** 2006. Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biol.* 8:291-6.
- **Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim Y.C, Park S.H, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M and Yamaguchi I.** 2006. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellins receptors. *Plant J.* 46:880–889.
- **Nathan D.F, Vos M.H and Lindquist S.** 1997. In vivo functions of the Saccharomyces cerevisiae Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12949–12956.
- **Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd N.P and Jones J.D.** 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* 18:650–5.

- **Nemhauser J.L and Chory J.** 2004. BRING it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *J Exp Bot.* 55:265-70.
- **Nover L and Scharf K.D.** 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 53:80-103.
- **Ogawa M, Kusano T, Katsumi M and Sano H.** 2000. Rice gibberellins insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene.* 245:21-9.
- **Olszewski N, Sun T and Gubler F.** 2002. Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *The Plant Cell.* 14:S61-S80.
- **Orlandi I, Cavadini P, Popolo L and Vai M.** 1996. Cloning, sequencing and regulation of a cDNA encoding a small heat-shock protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta.* 1307:129-31.
- **Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2005. Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17:1105-19.
- **Owens-Grillo J.K, Czar M.J, Hutchison K.A, Hoffman K, Perdew G.H and Pratt W.B.** 1996. A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J. Biol. Chem.* 271:13468-75.
- **Pai K.S, Mahajan V.B, Lau A and Cunningham D.D.** 2001. Thrombin receptor signaling to cytoskeleton requires Hsp90. *J Biol Chem.* 276:32642-7.
- **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.* 27:437-96.
- **Pawson T.** 2004. Specificity in signal transduction: From phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell.* 116:191–203.
- **Pearl L.H and Prodromou C.** 2000. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:46-51.
- **Peng J, Richards D.E, Moritz, T, Cano-Delgado A and Harberd N.P.** 1999. Extragenic suppressors of the *Arabidopsis gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiology.* 119:1199-208.
- **Picard D.** 2002. Heat shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sc.* 59:1640-8.
- **Picard D, Khursheed B, Garabedian M.J, Fortin M.G, Lindquist S and Yamamoto K.R.** 1990. Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature.* 348:166-8.
- **Perez-Perez J.M, Ponce M.R and Micol J.L.** 2002. The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. *Devel Biol.* 242:161-73.
- **Pirkkala L, Nykanen P and Sistonen L.** 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J.* 15:1118-31.
- **Piskurewicz U, Tureckova V, Lacombe E and Lopez-Molina L.** 2009. Far-red light inhibits germination through DELLA- dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO J.* 28:2259–71.
- **Prækelt U.M and Meacock P.A.** 1990. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet.* 223:97-106.

- **Pratt W.B and Toft D.O.** 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med.* 228:111-33.
- **Prodromou C, Roe S.M, Piper P.W and Pearl L.H.** 1997. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nature Struct. Biol.* 4:477-82.
- **Pysh L.D, Wysocka-Diller J.W, Camilleri C, Bouchez D and Benfey P.N.** 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal.* 18:111-9.
- **Qian-Feng L and Jun-Xian H.** 2013. Mechanisms of signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins. *Plant Signaling & Behavior.* 8:e24686.
- **Qin F, Kodaira K.S, Maruyama K, Mizoi J, Tran L.S, Fujita Y, Morimoto K, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K.** 2011. SPINDLY, a negative regulator of gibberellic acid signaling, is involved in the plant abiotic stress response. *Plant physiology.* 147:1900-13.
- **Queitsch C, Hong S.W, Vierling E and Lindquist S.** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 12:479-92.
- **Queitsch C, Sangster T.A and Lindquist S.** 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature.* 417:618-24.
- **Reddy R, Chaudhary S, Patil P and Krishna P.** 1998. The 90 kDa heat shock protein (hsp90) is expressed throughout Brassica napus seed development and germination. *Plant Science.* 131:131-7.
- **Retzlaff M, Hagn F, Mitschke L, Hessling M, Gugel F, Kessler H, Richter K, Buchner J.** 2010. Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Molecular Cell.* 37:344–54.
- **Riggs D.L, Roberts P.J, Chirillo S.C, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D and Smith D.F.** 2003. The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *Embo J.* 22:1158-67.
- **Roos M.D and Hanover J.A.** 2000. Structure of O-linked GlcNAc transferase: Mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:275–80.
- **Rusinova E, Borst J.W, Kwaaitaal M, Caño-Delgado A, Yin Y, Chory J and de Vries S.C.** 2004. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell.* 16:3216-29.
- **Rutherford S.L and Lindquist S.** 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* 396:336-42.
- **Ragni L, Nieminen K, Pacheco-Villalobos D, Sibout R, Schwechheimer C and Hardtke C.S.** 2011. Mobile gibberellin directly stimulates Arabidopsis hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell.* 23:1322–36.
- **Richards D.E, King K.E, Ait-Ali T and Harberd N.P.** 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52:67–88.
- **Rieu I, Eriksson S, Powers S.J, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benloch R, Nilsson O, Thomas S.G, Hedden P, Phillips A.L.** 2008. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellins inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell.* 20:2420–36.

- **Rutherford S.L.** 2003. Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nat Rev Genet.* 4:263-74.
- **Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S and Hwang I.** 2007. Nucleocytoplasmic Shuttling of BZR1 Mediated by Phosphorylation Is Essential in Arabidopsis Brassinosteroid Signaling. *Plant Cell in press.* 19:2749–62.
- **Samakovli D, Thanou A, Valmas C and Hatzopoulos P.** 2007. Hsp90 canalizes developmental perturbation. *J Exp Bot.* 58:3513-24.
- **Sangster T.A and Queitsch C.** 2005. The Hsp90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Cur Plan Biol.* 8:86-92.
- **Sangster T.A, Lindquist S and Queitsch C.** 2004. Under cover: Causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. *BioEssays.* 26:348-62.
- **Sangster T.A and Queitsch C.** 2005. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Cur Plan Biol.* 8:86-92.
- **Sato K and Siomi H.** 2010. Is canalization more than just a beautiful idea? *Genome Biology.* 11:109.
- **Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl F.U and Moarefi I.** 2000. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell.* 101:199-210.
- **Schirmer E.C, Lindquist S and Vierling E.** 1994. An Arabidopsis heat stress protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell.* 6:1899–909.
- **Schlesinger M.J.** 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem.* 265:12111-4.
- **Shani E, Weinstain R, Zhang Y, Castillejo C, Kaiserli E, Chory J, Tsien R.Y and Estelle M.** 2013. Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of Arabidopsis root. *PNAS.* 110:4834-9.
- **Shiu S.H, Karlowski W.M, Pan R, Tzeng Y.H, Mayer K.F and Li W.H.** 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *Plant Cell.* 16:1220–34.
- **Silverstone A.L, Tseng T-S, Swain S.M, Dill A, Jeong S.Y, Olszewski N.E and T-p Sun.** 2007. Functional Analysis of SPINDLY in Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 143:987-1000.
- **Smulders R.H, van Boekel M.A and de Jong W.W.** 1998. Mutations and modifications support a 'pitted-flexiball' model for alpha-crystallin. *Int J Biol Macromol.* 22:187-96.
- **Sorger P.K and Pelham H.R.** 1987. The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J Mol Biol.* 194:341-344.
- **Sothorn R.B, Tseng T.S, Orcutt S.L, Olszewski N.E and Koukkari W.L.** 2002. GIGANTEA and SPINDLY genes linked to the clock pathway that controls circadian characteristics of transpiration in Arabidopsis. *Chronobiology International.* 19:1005–22.
- **Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, Palumbo G, Pimpinelli S, Bozzetti M.P.** 2010 Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature.* 463:662-5.
- **Sponsel V.** 2006. Negative Regulators of GA Response. Plant physiology. Fifth edition.

- **Sun T.P.** 2004. Gibberellin signal transduction in stem elongation and leaf growth. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 3:304-20.
- **Sun T.P.** 2011. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol*. 21:338–45.
- **Swain S, Tseng T, Thornton T, Golparaj M and Olszewski N.** 2002. SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiology*. 129:605-15.
- **Taipale M, Jarosz D.F and Lindquist S.** 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 11:515–28.
- **Tang H, Liu Y, Madabusi L and Gilmour D.S.** 2000. Promoter-proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila melanogaster* depends on the upstream regulator. *Mol Cell Biol*. 20:2569-80.
- **Takahashi A, Casais C, Ichimura K and Shirasu K.** 2003. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2 mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:11777-82.
- **Tanaka K, Nakamura Y, Asami T, Yoshida S, Matsuo T and Okamoto S.** 2003. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of Arabidopsis: Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *J Plant Growth Regul*. 22:259–71.
- **Thomas S.G, Rieu I and Steber C.M.** 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam and Horm*. 72:289–337.
- **Truscott K.N, Brandner K and Pfanner N.** 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*. 13:326-37.
- **Tseng T.S, Salome P.A, McClung C.R and Olszewski N.E.** 2004. SPINDLY and GIGANTEA interact and act in Arabidopsis thaliana pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *The Plant Cell*. 16:1550–63.
- **Tyler L, Thomas S.G, Hu J, Dill A, Alonso J.M, Ecker J.R and Sun T.P.** 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 135:1008-19.
- **Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T.Y, Hsing Y.I, Kitano H, Yamaguchi I and Matsuoka M.** 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*. 437:693–8.
- **Vanaja D.K, Mitchell S.H, Toft D.O and Young C.Y.** 2002. Effect of geldanamycin on androgen receptor function and stability. *Cell Stress Chaperones*. 7:55-64.
- **Vanneste S and Friml J.** 2009. Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell*. 136:1005–16.
- **Vert G and Chory J.** 2006. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*. 441:96–100.
- **Vert G, Nemhauser J.L, Geldner N, Hong F and Chory J.** 2005. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:177-201.
- **Vernoux T and Benfey P.N.** 2005. Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Curr Opin Genet Dev*. 15:388-94.

- **Voegelé A, Linkies A, Müller K and Leubner-Metzger G.** 2011. Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Exp. Bot. J.* 62:5131–47.
- **Waddington C.H.** 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution.* 7:118–26.
- **Waddington C.H.** 1956. Genetic assimilation of bithorax phenotype. *Evolution.* 10:1–13.
- **Walter S and Buchner J.** 2002. Molecular chaperones—cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie.* 41:1098–113.
- **Wang Z.Y, Bai M.Y, Oh E and Zhu J.Y.** 2012. Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet.* 46:701–24.
- **Wang F and Deng X.W.** 2011. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Nature.* 21:1286–94.
- **Wang Z.Y and He J.X.** 2004. Brassinosteroid signal transduction—choices of signals and receptors. *Trends Plant Sci.* 9:91–6.
- **Wang Z.Y, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T and Chory J.** 2002. Nuclear-localized *BZR1* mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell.* 2:505–13.
- **Wang W, Vinocur B and Shoseyov-Oded A.A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response. *Trends in plant science.* 9:244–52.
- **Wells L, Vosseller K and Hart G.W.** 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: Signal transduction and O-GlcNAc. *Science.* 291:2376–8.
- **Whitesell L, Sutphin P.D, Pulcini E.J, Martinez J.D, and Cook P.H.** 1998. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol.* 18:1517–24.
- **Wickner S, Gottesman S, Skowrya D, Hoskins J, McKenney K and Maurizi M.R.** 1994. A molecular chaperone, *ClpA*, functions like *DnaK* and *DnaJ*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:12218–22.
- **Wickner S, Maurizi M.R and Gottesman S.** 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science.* 286:1888–93.
- **Wild M, Daviere J.M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P and Achard P.** 2012. The *Arabidopsis* *DELLA* *RGALIKE3* is a direct target of *MYC2* and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell.* 24:3307–19.
- **Wilén R.W, Sacco M, Gusta L.V and Krishna P.** 1995. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiol Plant.* 95: 195–202.
- **Wiley H.S.** 2003. Trafficking of the *ErbB* receptors and its influence on signaling. *Exp. Cell Res.* 284:78–88.
- **Willige B.C, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann E.M.N, Maier A and Schwechheimer C.** 2007. The *DELLA* domain of *GA INSENSITIVE* mediates the interaction with the *GA INSENSITIVE DWARF1A* gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19:1209–20.

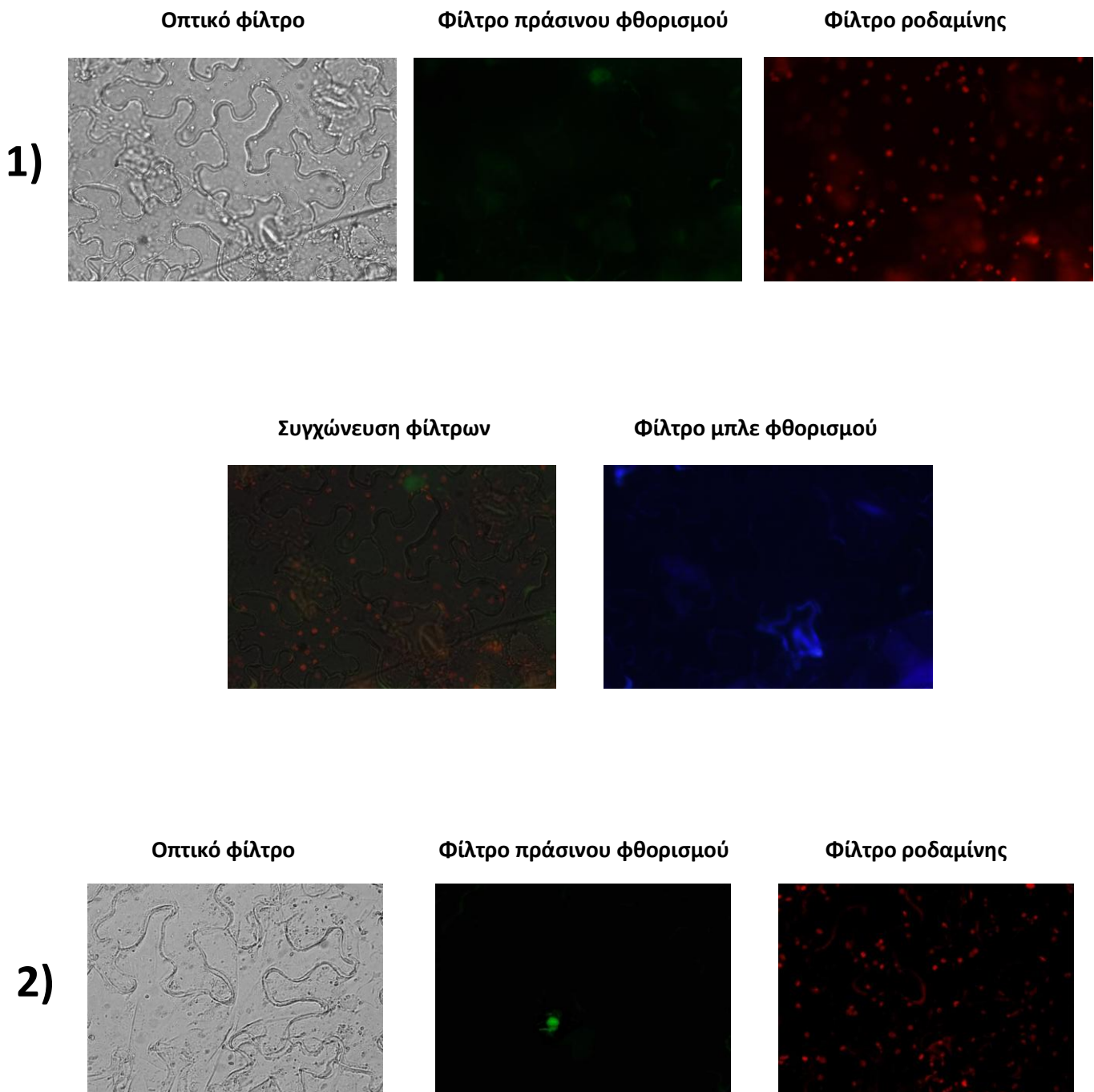
- **Wu C.H, Madabusi L, Nishioka H, Emanuel P, Sykes M, Arkhipova I and Gilmour D.S.** 2001. Analysis of core promoter sequences located downstream from the TATA element in the hsp70 promoter from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* 21:1593-602.
- **Xu Y and Lindquist S.** 1993. Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7074-7078.
- **Yabe N, Takahashi T, Komeda Y.** 1994. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiology.* 35:1207-19.
- **Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol.* 59:225–51.
- **Yang D.L, Yao J, Mei C.S, Tong X.H, Zeng L.J, Li Q, Xiao L.T, Sun T.P, Li J, Deng X-W, Lee C.M, Thomashow M.F, Yang Y, He Z and He S-Y.** 2012. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:1192-200.
- **Yarchuk O, Jacques N, Guillerez J and Dreyfus M.** 1992. Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *J Mol Biol.* 226: 581-96.
- **Yin Y, Wang Z.Y, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T and Chory J.** 2002. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell.* 109:181-91.
- **Young J.C, Hoogenraad N.J and Hartl F.U.** 2003. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell.* 112:41-50.
- **Young J.C, Agashe V.R, Siegers K and Hartl F.U.** 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:781-91.
- **Young, J.C, Schneider C and Hartl F.U.** 1997. In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.* 418:139–143.
- **Young J.C, Obermann W.M.J and Hartl F.U.** 1998. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem.* 273:18007-10.
- **Zentella R, Zhang Z.L, Park M, Thomas S.G, Endo A, Murase K, Fleet C.M, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y and Sun T-p.** 2007. Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19:3037-57.
- **Zhang Z.L, Ogawa M, Fleet C.M, Zentella R, Hu J, Heo J.O, Lim J, Kamiya Y, Yamaguchi S and Sun T.P.** 2011. Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:2160-5.
- **Zhao R, Davey M, Hsu Y.C, Kaplanek P, Tong A, Parsons A.B, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt G, Boone C, Emili A and Houry W.A.** 2005. Navigating the chaperon network: An integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperon. *Cell.* 120:715-27.
- **Zhao J, Peng P, Schmitz R.J, Decker A.D, Tax F.E and Li J.** 2002. Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* 130:1221-9.
- **Zhou A, Wang H, Walker J.C and Li J.** 2004. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant J.* 40:399-409.

- **Zuehlke A and Johnson J.L.** 2010. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers*. 93:211-7.
- **Χαραλαμπίδης Κ.** 2009. Αναπτυξιακή Μοριακή Βιολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.

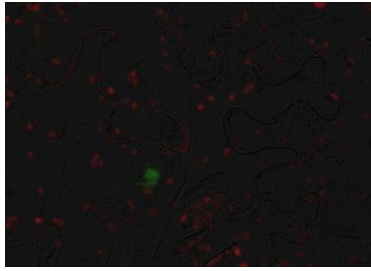
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Εικόνα A1: Συμπληρωματικές φωτογραφίες υποδερμίδων φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τον εξής συνδυασμό: $rSPYNE:RGA$, $rSPYCE:HSP90.1$, $p19$.

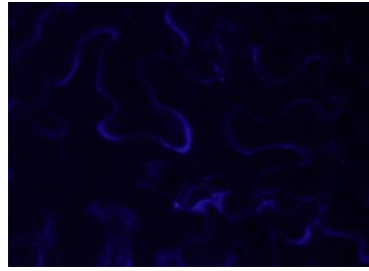
Οι επιπλέον φωτογραφίες από τις επαναλήψεις του πειράματος επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών $HSP90.1$ και RGA σε πυρήνες μετασχηματισμένων φύλλων καπνού. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης πάρθηκαν φωτογραφίες από διαφορετικά φίλτρα.



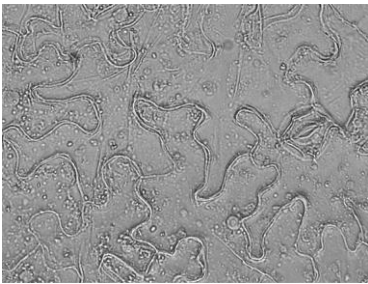
Συγχώνευση φίλτρων



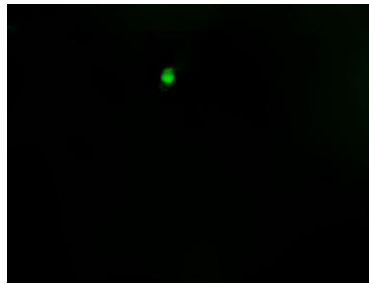
Φίλτρο μπλε φθορισμού



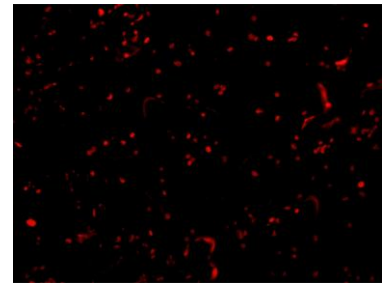
Οπτικό φίλτρο



Φίλτρο πράσινου φθορισμού

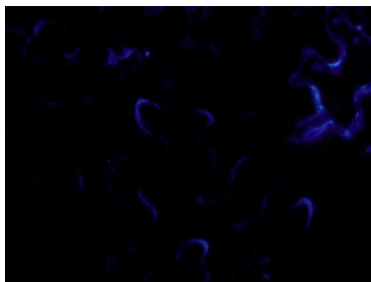


Φίλτρο ροδαμίνης

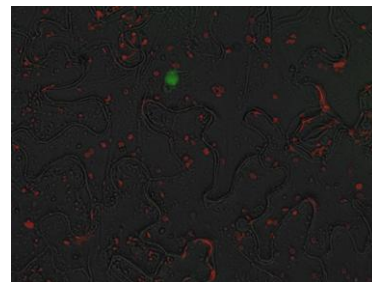


3)

Συγχώνευση φίλτρων

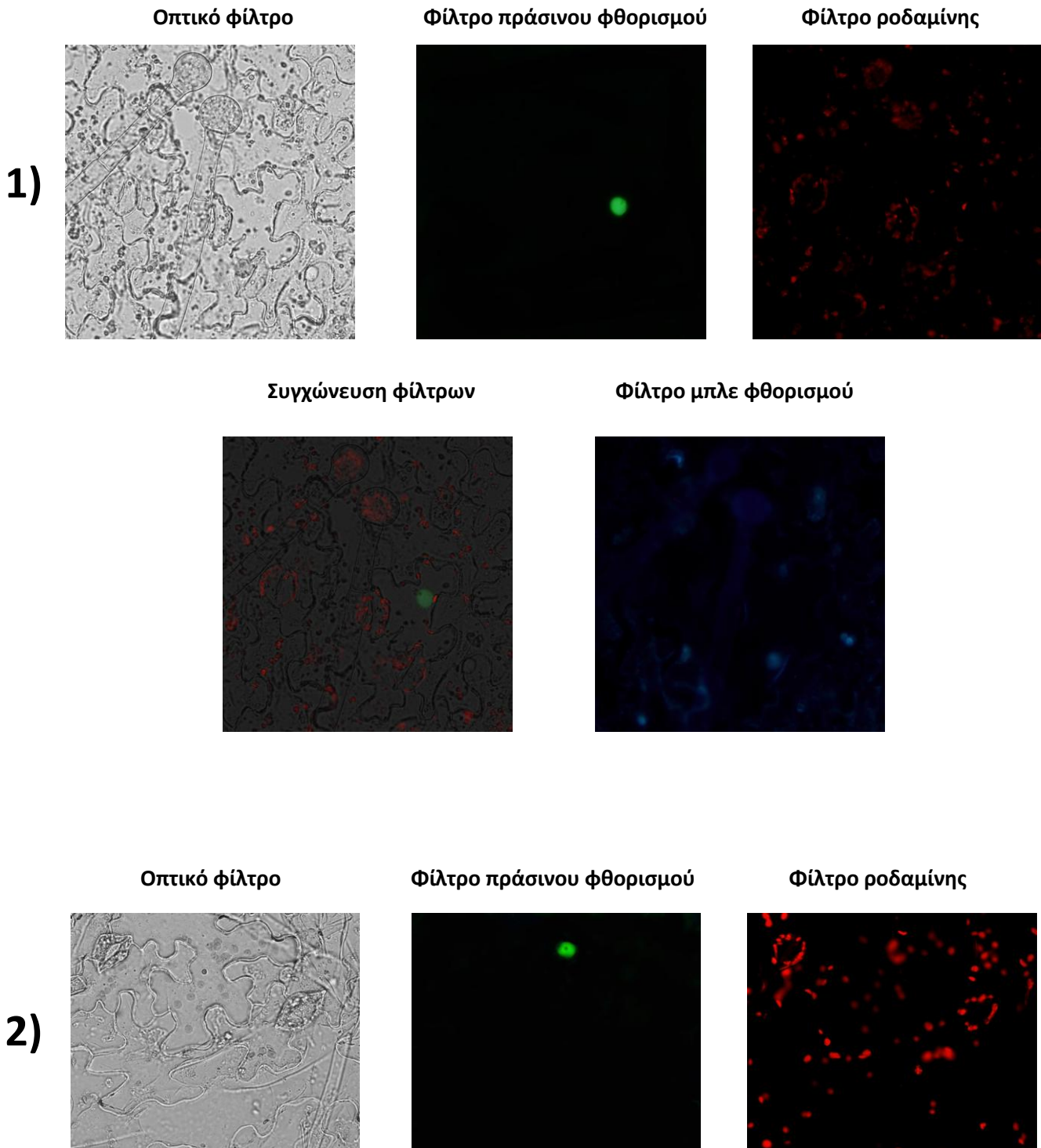


Φίλτρο μπλε φθορισμού

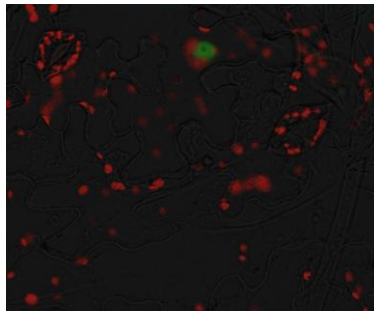


Εικόνα A2: Συμπληρωματικές φωτογραφίες υποδερμίδων φύλλων καπνού στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασχηματισμός με τον εξής συνδυασμό: rSPYNE:RGA, rSPYCE:HSP90.3, p19.

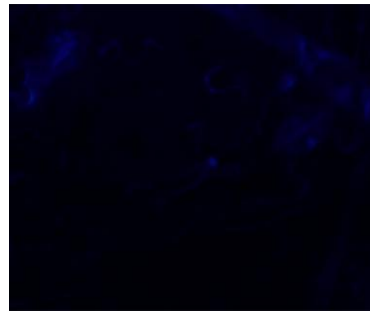
Οι επιπλέον φωτογραφίες από τις επαναλήψεις του πειράματος επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HSP90.3 και RGA σε πυρήνες μετασχηματισμένων φύλλων καπνού. Για τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης πάρθηκαν φωτογραφίες από διαφορετικά φίλτρα.



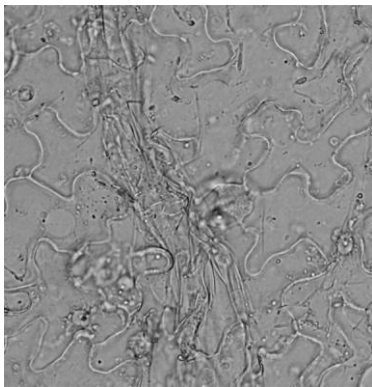
Συγχώνευση φίλτρων



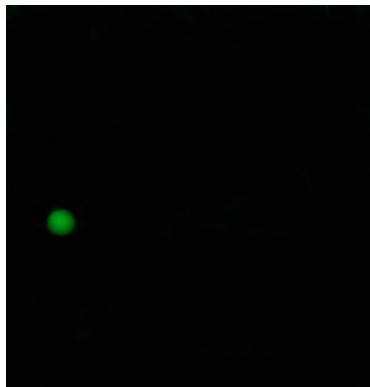
Φίλτρο μπλε φθορισμού



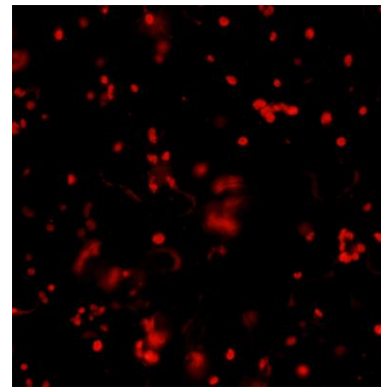
Οπτικό φίλτρο



Φίλτρο πράσινου φθορισμού

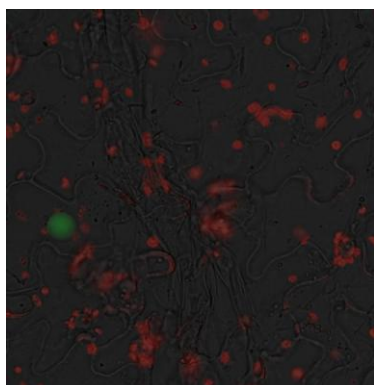


Φίλτρο ροδαμίνης

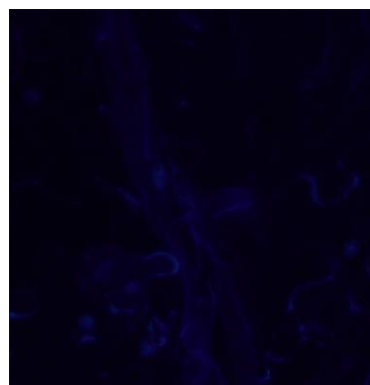


3)

Συγχώνευση φίλτρων

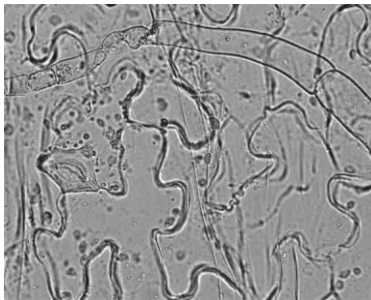


Φίλτρο μπλε φθορισμού



4)

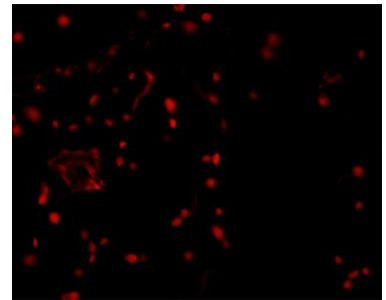
Οπτικό φίλτρο



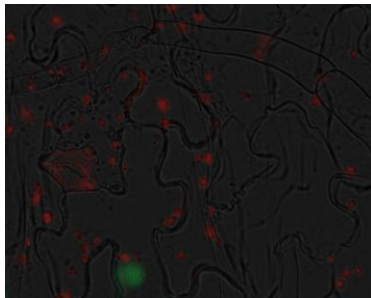
Φίλτρο πράσινου φθορισμού



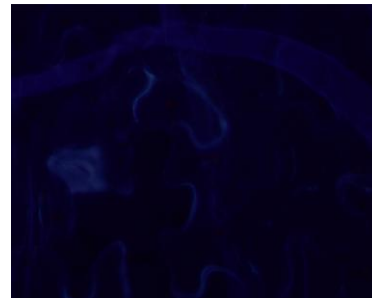
Φίλτρο ροδαμίνης



Συγχώνευση φίλτρων

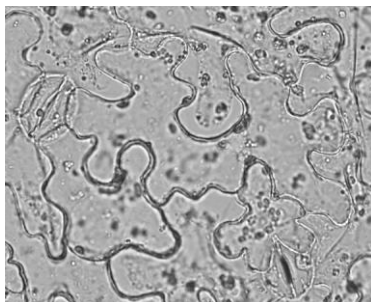


Φίλτρο μπλε φθορισμού

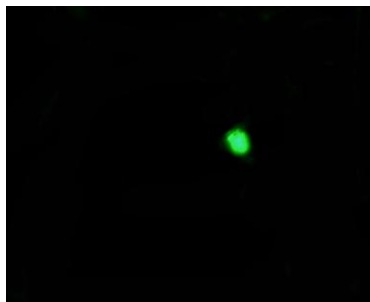


5)

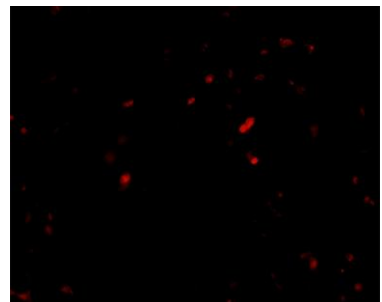
Οπτικό φίλτρο



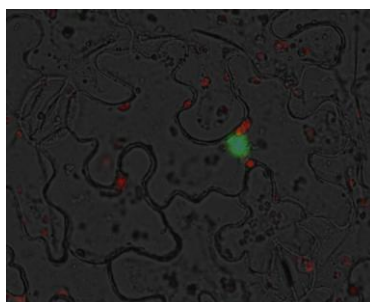
Φίλτρο πράσινου φθορισμού



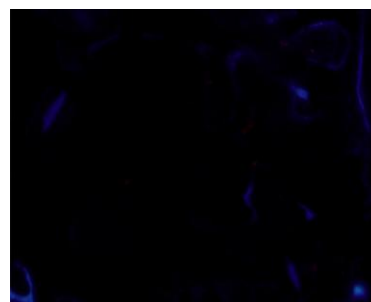
Φίλτρο ροδαμίνης



Συγχώνευση φίλτρων



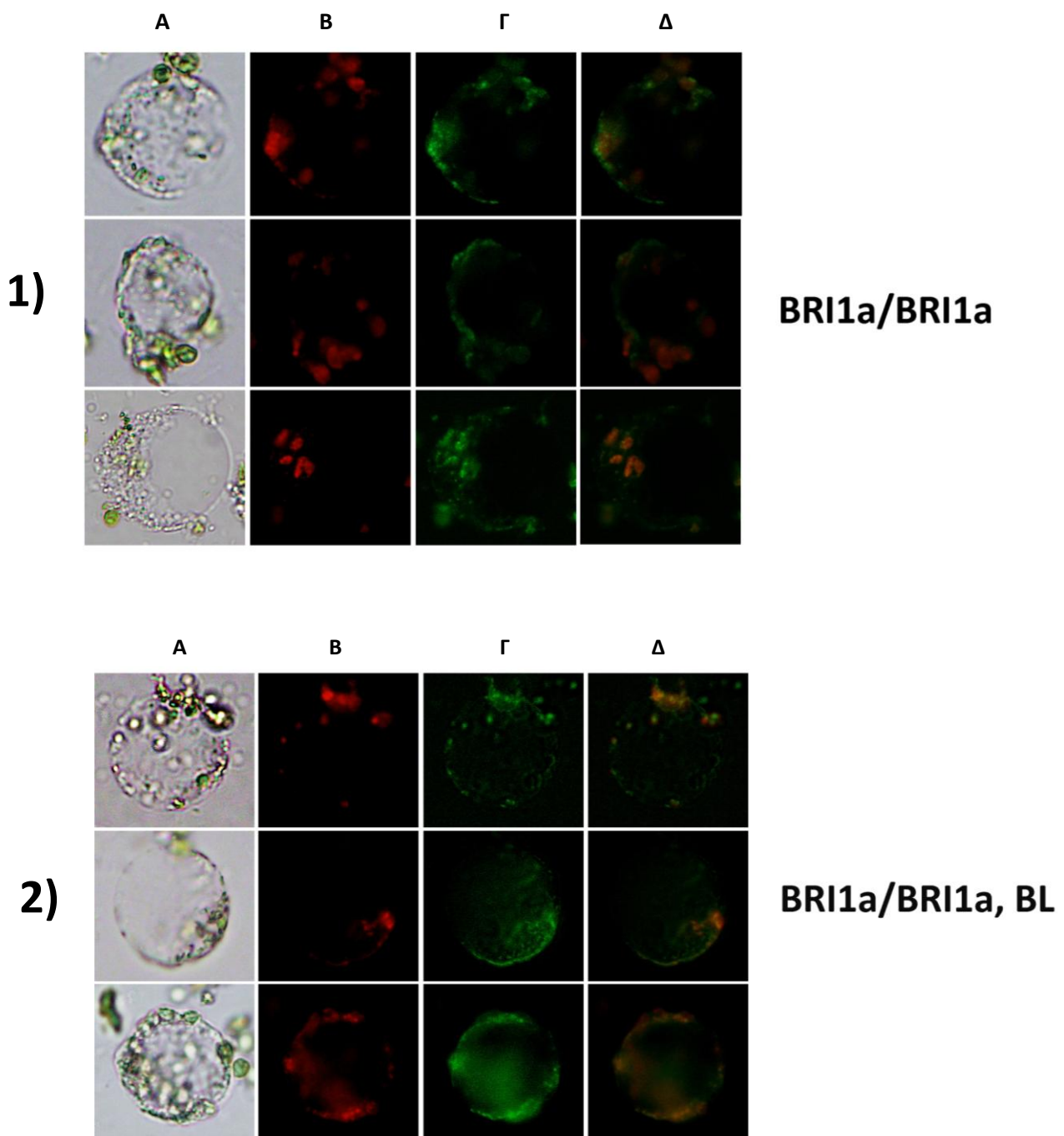
Φίλτρο μπλε φθορισμού

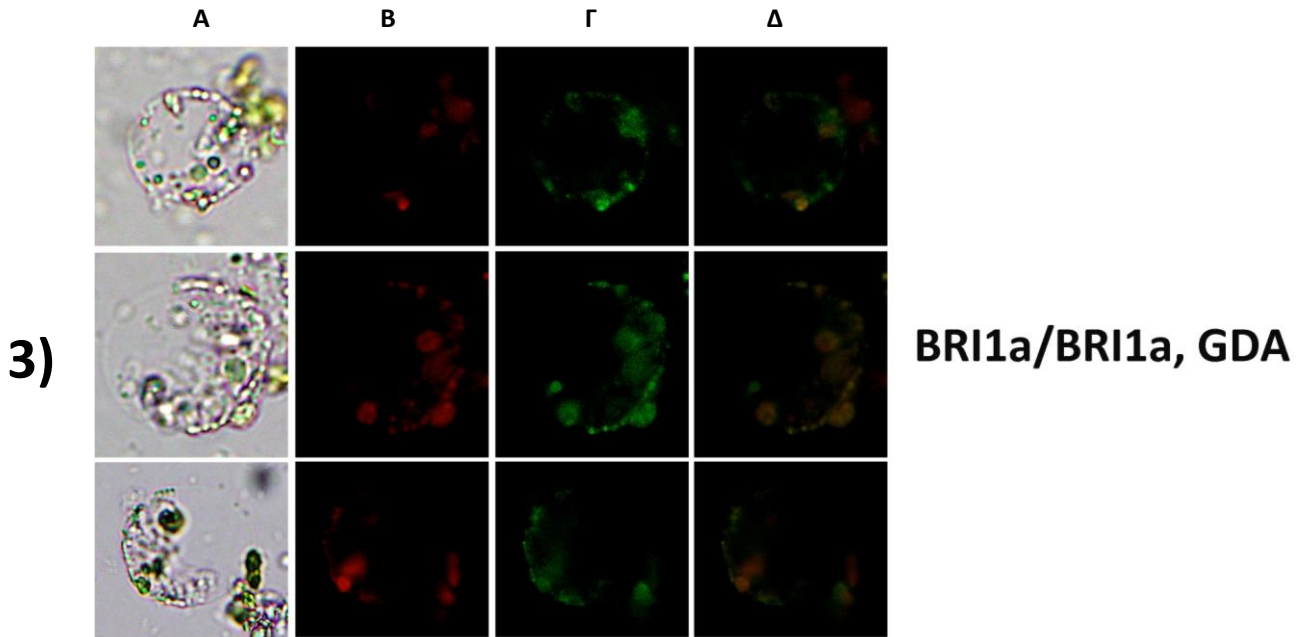


Εικόνα Β1. Συμπληρωματικές φωτογραφίες μετασηματισμένων πρωτοπλαστών στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασηματισμός με τον εξής συνδυασμό: pSPYNE:BR11a/pSPYCE:BR11a/p19.

Οι φωτογραφίες δείχνουν το διμερισμό μεταξύ των εξωκυτταρικών περιοχών της πρωτεΐνης BR11 σε πρωτοπλάστες μετασηματισμένων φύλλων καπνού 1) απουσία της ορμόνης BL, 2) παρουσία διαλύματος ορμόνης BL σε συγκέντρωση 10 μM για 2h και 3) παρουσία του καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA, σε συγκέντρωση 10 μM για 4h.

Συγκεκριμένα στις φωτογραφίες της στήλης: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (γ) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των δύο φίλτρων (πράσινου και ροδαμίνης).





Εικόνα Β2. Συμπληρωματικές φωτογραφίες μετασηματισμένων πρωτοπλάστων στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί παροδικός μετασηματισμός με τον εξής συνδυασμό: pSPYNE:BRI1b/pSPYCE:BRI1b/p19.

Οι φωτογραφίες δείχνουν το διμερισμό μεταξύ των εξωκυτταρικών περιοχών της πρωτεΐνης BRI1 σε πρωτοπλάστες μετασηματισμένων φύλλων καπνού 1) απουσία της ορμόνης BL, 2) παρουσία διαλύματος ορμόνης BL σε συγκέντρωση 10 μM για 2h και 3) παρουσία του καταστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA, σε συγκέντρωση 10 μM για 4h.

Συγκεκριμένα στις φωτογραφίες της στήλης: (α) χρησιμοποιήθηκε το οπτικό φίλτρο για την καταγραφή του ορατού μήκους κύματος, (β) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο ροδαμίνης για την καταγραφή του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, (γ) χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο πράσινου φθορισμού για την ανίχνευση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP, (δ) έγινε αλληλοεπικάλυψη των δύο φίλτρων (πράσινου και ροδαμίνης).

