

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

**“Εξέταση της φυσικής αλληλεπίδρασης
μεταξύ των πρωτεϊνών TTG1 και
SPL4/SPL5 του Arabidopsis”**



ΚΟΥΤΣΟΥΜΠΕΛΗΣ ΠΡΟΚΟΠΙΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ ΠΟΛΥΔΕΥΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΙΜΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

**“Εξέταση της φυσικής αλληλεπίδρασης
μεταξύ των πρωτεϊνών TTG1 και
SPL4/SPL5 του Arabidopsis”**

ΚΟΥΤΣΟΥΜΠΕΛΗΣ ΠΡΟΚΟΠΙΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ ΠΟΛΥΔΕΥΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Εξέταση της φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών TTG1 και SPL4/SPL5 του Arabidopsis”

ΚΟΥΤΣΟΥΜΠΕΛΗΣ ΠΡΟΚΟΠΙΟΣ

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Κούρτη Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Μέλος)

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με Γενική Συνέλευση του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 21/10/15, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή διατριβής.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες καταρχάς στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που με εμπιστεύτηκε και με δέχθηκε στο πολύ ενδιαφέρον και πρωτοποριακό πρόγραμμα μεταπτυχιακού με αντικείμενο τη βιολογία συστημάτων.

Ευχαριστώ από καρδιάς τον επικεφαλής του εργαστηρίου του τμήματος, Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την πολύτιμη γνώση που μας μετέφερε καθώς και για το ενδιαφέρον, την ενθάρρυνση και την καθοδήγηση που μας προσέφερε από την πρώτη ημέρα μέχρι και την ολοκλήρωση της προσπάθειάς μας.

Επίσης ευχαριστώ τον Επίκουρο καθηγητή κ. Ρήγα Σταμάτη για την γενική επίβλεψη της πορείας της μελέτης και το αμέριστο ενδιαφέρον, καθώς και τον Ντικράν Τσιτσεκιάν που στάθηκε δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια και σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας και του οποίου η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξε ανεκτίμητη για την πρόοδο και ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην επίκουρη καθηγήτρια, κα Δήμητρα Μηλιώνη και τον Δρ. Δάρρα, κα που αφιέρωσαν σημαντικό χρόνο και παρείχαν πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές σε ακαδημαϊκό και πρακτικό επίπεδο. Συνολικά, το προσωπικό του εργαστηρίου, με την γνώση και εμπειρία τους συνέβαλαν σημαντικά στην υλοποίηση του πειράματος, με καθημερινές επισημάνσεις και συμβουλές.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου για την υλική και ηθική υποστήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	7
------------------	---

2. Εισαγωγή

• <i>Cistus creticus</i>	8
• <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
• Μηχανισμός του TTG1.....	11
• Η πρωτεΐνη TTG1 του <i>Cistus creticus</i> αλληλεπιδρά με 2 πρωτεΐνες της οικογένειας SPL.....	14
• Σκοπός – Στόχος του πειράματος.....	16

3. Υλικά και μέθοδοι

• Φυτικό υλικό.....	18
• Συνθήκες καλλιέργειας του <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
• Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από το <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
• Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από το <i>A. Thaliana</i>	19
• RT-PCR.....	20
• Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA).....	21
• Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αгарόζης.....	24
• Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα.....	24
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia Coli</i>	25
• Δημιουργία δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> (Competent cells DH5α).....	27
• Πλασμιδιακοί φορείς.....	28
• Agroinfiltration σε φύλλα καπνού.....	31
• Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών.....	32

4.Αποτελέσματα

- Απομόνωση του cDNA των γονιδίων AtTTG1, AtSPL4 και AtSPL5.....36
- Ποσοτικοποίηση του ολικού RNA που απομονώθηκε από οφθαλμούς και φύλλα.....37
- Απομάκρυνση υπολειμμάτων γενομικού DNA με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου DNάση I και επανεκτίμηση ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών.....37
- Κλωνοποίηση των cDNA στο φορέα pUC19.....38
- Κλωνοποίηση στους φορείς pSPYNE-pSPYCE.....39
- Έλεγχος αλληλεπιδράσεων.....41

5.Συζήτηση.....44

6.Βιβλιογραφία.....46

Περίληψη

Περίληψη

Το φυτό *Cistus creticus* διαθέτει αδενικά επιδερμικά τριχώματα που λειτουργούν ως αποφύσεις που συσσωρεύουν και εκκρίνουν δευτερογενείς μεταβολίτες.

Η ρητίνη που εκκρίνεται από τους αδένες αυτούς, γνωστή και ως λάδανο, χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για τις φαρμακευτικές και αρωματικές της ιδιότητες. Αυτές οι παραδοσιακές εφαρμογές επιβεβαιώθηκαν από ευρήματα, τα οποία δείχνουν ότι τα συστατικά λαβδανικού τύπου της ρητίνης, εμφάνισαν ισχυρή *in vitro* κυτταροτοξικότητα η κυτταροστατικότητα σε διάφορες μορφές ανθρώπινου καρκίνου.

Ο μεταγραφικός παράγοντας *TTGI* αποτελεί ένα κομβικό γονίδιο, υπεύθυνο για τη μορφογένεση των τριχωμάτων στα φύλλα, των ριζικών τριχιδίων αλλά και για τη βιοσύνθεση των флаβονοειδών. Απομονώθηκε το ομόλογο γονίδιο του *AtTTGI* από το *Cistus creticus* (*CcTTGI*) το οποίο συμπληρώνει τον πλειοτροπικό φαινότυπο του μεταλλάγματος *ttg1* του *Arabidopsis* αποκαθιστώντας το σχηματισμό τριχώματος, την πυκνότητα ριζικών τριχιδίων και τη βιοσύνθεση των флаβονοειδών.

Με τη χρήση της τεχνικής Yeast two-hybrid, διαπιστώθηκε πως το *CcTTGI* αλληλεπιδρά με δύο μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας των SPL (Squamosa Promoter Binding Like transcription factors), τις *CcSPLA* και *CcSPLB*. Οι πρωτεΐνες *CcSPLA* και *CcSPLB* παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τις πρωτεΐνες *AtSPL4* και *AtSPL5* του *Arabidopsis thaliana*.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας, είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων *AtSPL4* και *AtSPL5* με την πρωτεΐνη *AtTTGI* και η οπτικοποίηση της όποιας αλληλεπίδρασης με BiFC-split GFP.

Εισαγωγή

Εισαγωγή

Cistus Creticus

Το φυτό *Cistus creticus* ανήκει στην οικογένεια των κιστιδών (*Cistaceae*). Η οικογένεια *Cistaceae* περιλαμβάνει 8 γένη και 180 περίπου είδη, είναι φυτά των παραμεσόγειων περιοχών και της Αμερικής ([Papaefthimiou et al., 2014](#)). Στην Ελλάδα υπάρχει το γένος *Cistus* με 5 αυτοφυή είδη. Τα αυτοφυή Ελληνικά είδη είναι τα ακόλουθα:

- *Cistus creticus* subsp. *creticus* L.
- *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* L.
- *Cistus parviflorus* L.
- *Cistus monspeliensis* L.
- *Cistus salviifolius* L.

Τα φυτά αυτά απαντώνται σε ξηρές περιοχές και καλύπτουν μεγάλες εκτάσεις. Είναι φυτά ποώδη, πολύκλαδοι θάμνοι με ύψος που υπερβαίνει το ένα μέτρο. Τα φύλλα είναι συνήθως κυματοειδή, απλά αδιαίρετα, αντίθετα η κατ' εναλλαγή με παράφυλλα τα οποία φέρουν απλές αστεροειδείς τρίχες η σε δέσμες ([Falara et al., 2008](#)).

Πιο αναλυτικά, το τρίχωμα αυτό, που υπάρχει στην επιφάνεια των φύλλων, αποτελείται από μη αδενικά (αστεροειδή) και αδενικά, μακριά, με σφαιρική κεφαλή, πολυκύτταρα τριχώματα (Εικ.1). Τα αδενικά τριχώματα αποτελούνται από ένα μακρύ πολυκύτταρο μίσχο που υπερβαίνει τα 200 μm και στην κορυφή τους συναντάται μια μικρή αδενική κυτταρική κεφαλή. Επιπλέον, υπάρχουν δύο είδη μη αδενικών τριχωμάτων, τα πολυκύτταρα αστεροειδή και οι απλές μονοκυτταρικές αιχμές.



Εικόνα1. Το τρίχωμα του *Cistus creticus*
GT: αδενικά τριχώματα, ST: αστεροειδή τριχώματα

Το έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο φυτό, προέκυψε από την ιδιότητα των αδενικών τριχωμάτων με τη μικρή κυτταρική κεφαλή να εκκρίνουν μια ρητίνη, το λάβδανο. Το λάβδανο είναι γνωστό από την αρχαιότητα και έχει φαρμακευτικές και αρωματικές ιδιότητες. Επίσης, από πιο πρόσφατες εφαρμογές, τα συστατικά λαβδανικού τύπου της ρητίνης, εμφάνισαν ισχυρή *in vitro* κυτταροτοξικότητα ή κυτταροστατικότητα σε διάφορες μορφές ανθρώπινου καρκίνου (Falara *et al.*, 2010). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν δημοσιευθεί αποτελέσματα που αφορούν την αντιμικροβιακή της δράση.

Arabidopsis thaliana

Η περιγραφή του φυτού *Arabidopsis thaliana*, έγινε για πρώτη φορά κατά το έτος 1577, από ένα Γερμανό φυσικό, ονομαζόμενο Johanness Thal (1542-1583). Το φυτό εντοπίστηκε σε κάποια τοποθεσία στα βουνά Harz και του απέδωσε την ονομασία *Pilosella siliquosa*. Στη συνέχεια το φυτό μετονομάστηκε σε *Arabis thaliana* από τον Carl Linnaeus, προς τιμήν του Johanness Thal. Η σημερινή ονομασία του φυτού ωστόσο, αποδίδεται σε ένα Γερμανό βοτανολόγο, τον Gustav Heynhold, ο οποίος καθιέρωσε το νέο γένος *Arabidopsis*, βασίζοντας την ονομασία του στην προγενέστερη του Carl Linnaeus (*Arabisopsis*).

Το φυτό *Arabidopsis thaliana* αυτοφύεται στην Ευρώπη, στην Ασία και στη Βορειοδυτική Αφρική. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη του σε περιοχές όπως η Βόρεια Αμερική, το Νότιο τμήμα της Λατινικής Αμερικής, Κεντρική Αφρική, Νότιος Αφρική και Ωκεανία.

Το *Arabidopsis thaliana* είναι ένα μικρό, μη βρώσιμο φυτό που ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae ή Cruciferae.

Η επιλογή του ως φυτό μοντέλο, έγινε με συγκεκριμένα κριτήρια.

- Το γονιδιώμα του συγκριτικά με άλλα φυτά είναι μικρότερο, αποτελούμενο από 1×10^8 ζεύγη βάσεων νουκλεοτιδίων.
- Το γονιδιώμα του είναι διπλοειδές και όχι ιδιαίτερα πολύπλοκο, έχοντας για παράδειγμα λίγες επαναλήψεις μη-κωδικού DNA.

- Η γονιδιώματική του ακολουθία έχει αποκωδικοποιηθεί πλήρως και έχει δημοσιευθεί το Δεκέμβριο του 2000, ως αποτέλεσμα της συλλογικής συνεργασίας μεταξύ ερευνητικών ομάδων Arabidopsis Genome Initiative (AGI, 2000).
- Τα κύτταρα του φυτού μπορεί να είναι δεκτικά στο μετασχηματισμό με *Agrobacterium tumefaciens*.
- Το μικρό μέγεθος του φυτού, που μας επιτρέπει τη διατήρηση σε ελεγχόμενες συνθήκες ακόμα και μεγάλου αριθμού φυτών για διεξαγωγή πειραμάτων.
- Ο μικρός βιολογικός του κύκλος. Απαιτούνται περίπου έξι εβδομάδες από τη βλάστηση του σπέρματος έως την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου και την παραγωγή απογόνων.

Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων και της λειτουργίας τους στο Arabidopsis και η εύρεση παράλληλα, ομόλογων γονιδίων με παρόμοιες λειτουργίες σε άλλες οικογένειες φυτών, παρέχουν πληροφορίες για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη φυσιολογία των φυτών, με δυνατότητα βιοτεχνολογικών εφαρμογών στη γενετική βελτίωση των φυτών με ιδιαίτερη οικονομική σημασία.

Λόγω του βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγει το φυτό *Cistus creticus* και ειδικότερα το λάδανο, χρήζει ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος το αναπτυξιακό μονοπάτι που ελέγχει τη μορφογένεση και τη διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων. Στο φυτό μοντέλο για τη Μοριακή Βιολογία Arabidopsis thaliana, το οποίο παράγει μονοκύτταρες μη αδενώδεις τρίχες στην επιδερμίδα των φύλλων του, έχουν βρεθεί πολλά γονίδια και μοριακά δίκτυα που ελέγχουν και ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση (Hulskamp *et al.*, 1999; Balkunde *et al.*, 2010; Tominaga *et al.*, 2011).

Η πρωτεΐνη TTG1 (Transparent Testa Glabra 1) αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή που ελέγχει την κυτταρική διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων στο Arabidopsis (Galway *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1999). Το μετάλλαγμα ttg1 παρουσιάζει έναν πλειοτροπικό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από την έλλειψη τριχωμάτων στα φύλλα, παραγωγή εκτοπικών ριζικών τριχιδίων και πρόβλημα στη

βιοσύνθεση των φλαβονοειδών (Koornneef, 1981; Walker *et al.*, 1999; Ioannidi *et al.*, in preparation).

Μηχανισμός του TTG1

Η πρωτεΐνη Transparent Testa Glabra 1 (TTG1) φέρει μια περιοχή, τη WD40, η οποία αποτελεί ένα μικρό δομικό μοτίβο, που κατά προσέγγιση αποτελείται από 40 αμινοξέα. Τα αμινοξέα αυτά συνήθως λήγουν σε ένα διπεπτιδίο τρυπτοφάνης – ασπαρτικού οξέος. Παράλληλα αντίγραφα των επαναλήψεων αυτών, ομαδοποιούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζουν μια κυκλική πρωτεϊνική περιοχή που ονομάζεται τομέας WD40.

Η πρωτεΐνη TTG1 βρίσκεται σε όλα τα επικαλυπτόμενα ρυθμιστικά δίκτυα που ελέγχουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων. (Walker *et al.*, 1999)

Στη ρίζα του *Arabidopsis thaliana* το TTG1 συμμετέχει στο σχηματισμό δύο διακριτών MYB-bHLH-WD40 δικτύων τα οποία καθορίζουν τη δόμηση των επιδερμικών κυττάρων μέσω ενός ειδικού ρυθμιστικού μηχανισμού αναστολής. (Schiefelbein *et al.*, 2009, Schiefelbein *et al.*, 2014)

Η επιδερμίδα της ρίζας των φυτών αποτελείται από 2 κυτταρικούς τύπους τους τριχοβλάστες, που παράγουν ριζικά τριχίδια και τους ατριχοβλάστες, που δεν παράγουν.

Στους ατριχοβλάστες, η πρωτεΐνη TTG1 σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη WEREWOLF (WER), που ανήκει στους MYB μεταγραφικούς παράγοντες (Lee and Schiefelbein, 1999) και ενός εκ των bHLH μεταγραφικών παραγόντων GLABRA3 (GL3) ή ENHANCER of GLABRA3 (EGL3) (Bernhardt *et al.*, 2003; Bernhardt *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2013), σχηματίζουν ένα σταθερό τριμερές σύμπλοκο, WER-GL3/EGL3-TTG1 που ενεργοποιεί την έκφραση του HD-Zip μεταγραφικού παράγοντα GLABRA2 (GL2), ο οποίος καταστέλλει τη μεταγραφική γονιδίων που προάγουν τη δημιουργία τριχώματος στα κύτταρα. (Di Cristina *et al.*, 1996; Masucci *et al.*, 1996; Costa and Shaw, 2006; Bruex *et al.*, 2012)

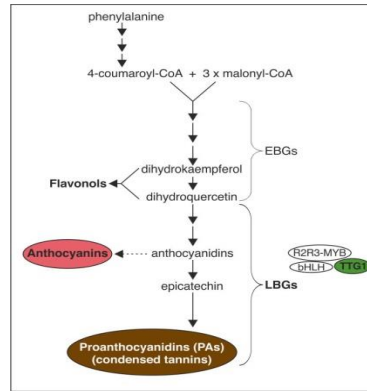
Μια σειρά από μικρές, MYB πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, αναστέλλουν εξ ολοκλήρου τη πρόσδεση της πρωτεΐνης

WEREWOLF στο σύστημα GL3/EGL3 bHLH του συμπλέγματος MBW. Οι περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης είναι οι CAPRICE (CPC), TRIPTYCHON (TRY), and ENHANCER OF TRY AND CPC1 (ETC1). (Kirik *et al.*, 2004; Schellmann *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 1997)

Το σύμπλεγμα αυτό δεν προάγει την έκφραση του GL2. Έτσι προάγει τη διαφοροποίηση του κυττάρου σε ριζικό τρίχωμα.

Στα τριχώματα των φύλλων, σε αντίθεση με τα ριζικά τριχίδια, το γονίδιο GL2 είναι θετικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαφοροποίησης (Masucci *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2008). Το τριμερές σύμπλοκο MBW αποτελείται και εδώ από τις πρωτίνες TTG1, GL3 ή EGL3 (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003) και από τον R2R3-MYB μεταγραφικό παράγοντα GLABRA1 (GL1) (Kirik *et al.*, 2005), ενεργοποιώντας την έκφραση του αρνητικού ρυθμιστή της κυτταρικής διαφοροποίησης *TRIPTYCHON (TRY)* (Schellmann *et al.*, 2002). Η πρωτεΐνη TRY διαχέεται στα γειτονικά κύτταρα και ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη GL1 ως προς τη θέση πρόσδεσης στο τριμερές σύμπλοκο MBW. Συνεπώς, το τριμερές TRY-GL3/EGL3/TTG1 δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή του *GL2*, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δημιουργία τριχώματος (Schnittger *et al.*, 1999; Esch *et al.*, 2004).

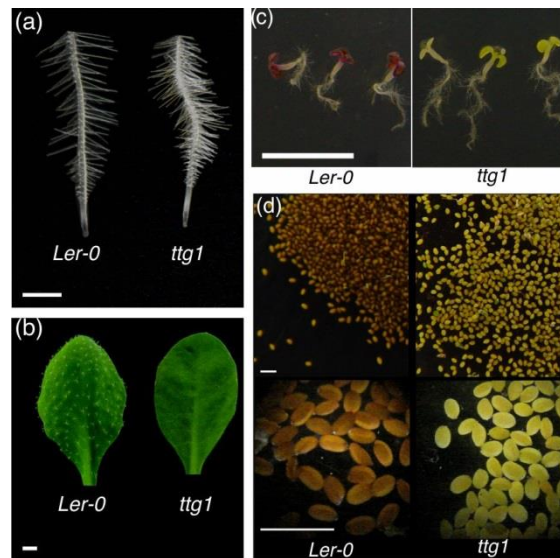
Το τριμερές σύμπλοκο μεταγραφικής ενεργοποίησης MBW ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών (Εικ. 2). Η έκφραση των γονιδίων αυτών οδηγεί στη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών στα υπέργεια όργανα του φυτού και στη συσσώρευση των προανθοκυανιδινών στο περισπέρμιο, προσδίδοντας το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα στα σπέρματα (Harborne and Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2001; Li, 2014; Xu *et al.*, 2015). Η απενεργοποίηση του γονιδίου TTG1 οδηγεί στην απώλεια των ανθοκυανινών στο λαιμό των φυτών μεταξύ υποκοτυλίου - κοτυληδόνων και στο σχηματισμό κίτρινων σπερμάτων, λόγω της μη σύνθεσης προανθοκυανιδινών στα σπέρματα (Koornneef, 1981; Walker *et al.*, 1999).



Η έκφραση των LBGs απαιτεί την μεταγραφική ενεργοποίηση του συμπλέγματος bHLH, TTG1, R2R3-MYB

Εικόνα 2. Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών

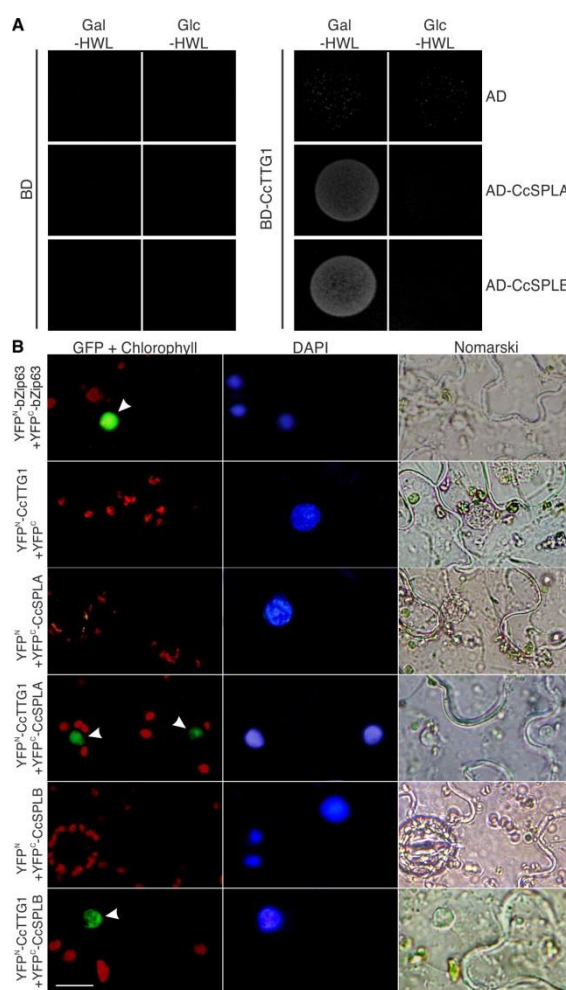
Στην Εικόνα 3 φαίνεται ο πλειοτροπικός φαινότυπος που παρουσιάζουν φυτά που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο TTG1. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η σταθεροποίηση του τριμερούς μεταγραφικού συμπλόκου MBW από την πρωτεΐνη TTG1 σχετίζεται με την προστασία του φυτού έναντι παθογόνων, καθώς οι ανθοκυανίνες με το χρώμα που προσδίδουν στο φυτικό σώμα απωθούν τα παθογόνα, ενώ τα τριχώματα, εξοπλίζουν το φυτό με ένα μηχανισμό μηχανικής και χημικής άμυνας.



Εικόνα 3. Ο πλειοτροπικός φαινότυπος της μετάλλαξης *ttg1* παρουσιάζει: a) εκτοπικά ριζικά τριχίδια b) απουσία τριχώματος στα φύλλα c) δεν βιοσυνθέτει ανθοκυανίνες και d) προανθοκυανιδίνες.

Η πρωτεΐνη TTG1 του *Cistus creticus* αλληλεπιδρά με 2 πρωτεΐνες της οικογένειας SPL

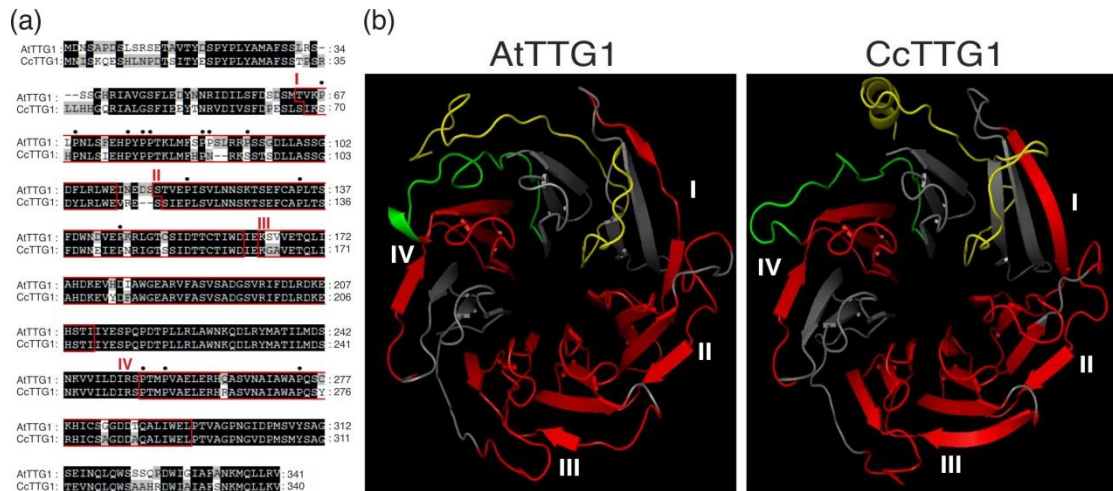
Σε προηγούμενη μελέτη (Ioannidi et al., in preparation), απομονώθηκε μια WD40 repeat πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί λειτουργικό ομόλογο της πρωτεΐνης AtTTG1 του *A. Thaliana*, καθώς, η πρωτεΐνη αυτή είναι ικανή να αναστρέψει τον πλειοτροπικό φαινότυπο της μετάλλαξης *ttg1*. Στην ίδια μελέτη, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη CcTTG1 αλληλεπιδρά με 2 πρωτεΐνες που ανήκουν στην ομάδα των SPL (Squamosa Promoter binding Like) μεταγραφικών παραγόντων, τις CcSPLA και CcSPLB (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Η πρωτεΐνη CcTTG1 αλληλεπιδρά με δύο πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των SPL μεταγραφικών παραγόντων. Α) Αλληλεπίδραση με το σύστημα Yeast two hybrid και Β) αλληλεπίδραση *in planta* με το σύστημα παροδικής έκφρασης split-YFP σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana*

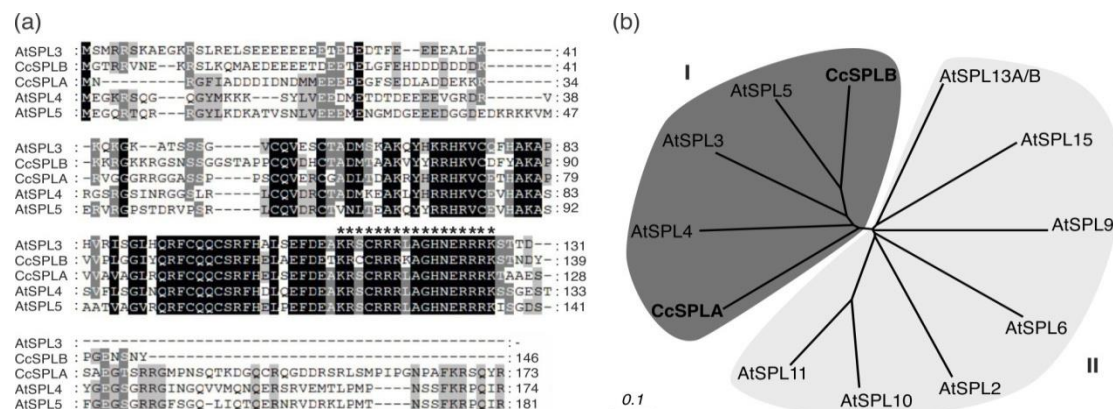
Οι πρωτεΐνες AtTTG1 και CcTTG1 παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους, της τάξεως του 88%, όσον αφορά την πρωτοταγή τους δομή, ενώ

αντίστοιχα μεγάλες ομοιότητες παρουσιάζουν και σε επίπεδο τριτοταγούς δομής (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Οι πρωτεΐνη TTG1 παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό ομοιότητας μεταξύ του *A. Thaliana* και του *C. creticus* και σε πρωτοταγή δομή (a) και σε τριτοταγή δομή (b). Η μαύρη σκίαση απεικονίζει τα αμινοξέα που είναι ταυτόσημα, ενώ η ελαφριά γκρι σκίαση αντιπροσωπεύει τα υπολείμματα αμινοξέων με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι περιοχές (I - IV) που βρίσκονται σε πλαίσιο δείχνουν τις συντηρημένες WD - επαναλήψεις. Τα υπολείμματα προλίνης σημειώνονται με τελείες.

Όσον αφορά τους μεταγραφικούς παράγοντες SPL, το *Arabidopsis* έχει 17 γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια των SPL μεταγραφικών παραγόντων. Η έκφραση των 11 από τα 17 αυτά γονίδια ρυθμίζονται από το miR156 (Xing *et al.*, 2010). Οι πρωτεΐνες CcTTGA και CcTTGB του *Cistus*, παρουσιάζουν σχετικά υψηλό ποσοστό ομοιότητας με τις αντίστοιχες AtSPL3/4/5 και ομαδοποιούνται με αυτές, όπως φαίνεται στο φυλογενετικό δέντρο της Εικ. 6.



Εικόνα 6. Οι πρωτεΐνες CcSPLA και CcSPLB έχουν ομοιότητα με τις AtSPL3/4/5 (a) και ομαδοποιούνται με αυτές όπως φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο (b). Στο (a) Ο κεντρικός SBP-τομέας, που αποτελείται από τον τομέα πρόσδεσης του DNA και την επικαλυπτόμενη αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS: Nuclear Localization Sequence) εμφανίζουν εξαιρετικό επίπεδο συντήρησης μεταξύ των ειδών.

Σκοπός – Στόχος του πειράματος

Σκοπός του πειράματος είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης των AtSPL4 και AtSPL5 με την πρωτεΐνη AtTTG1. Με βάση την αλληλεπίδραση των CcSPLA και CcSPLB με την πρωτεΐνη CcTTG1 και λαμβάνοντας υπ' όψιν το μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των CcTTG1-AtTTG1 και CcSPLA/B-AtSPL3/4/5, καθώς και το ότι ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης θα γίνει *in planta* με τη μέθοδο BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation assay, Walter et al., 2004), όπου θα γίνει παροδικός μετασχηματισμός επιδερμικών κυττάρων φύλλων καπνού *Nicotiana benthamiana*, με διαγονιδιακές κατασκευές που θα φέρουν σε μεταγραφική σύντηξη το cDNA του γονιδίου AtTTG1 με το άμινο άκρο της πρωτεΐνης μάρτυρα YFP (Yellow Fluorescent Protein), ενώ τα cDNA των γονιδίων AtSPL4 και AtSPL5 ενώθηκαν με το καρβόξυ-άκρο του YFP.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* οικοτύπου Columbia το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών – Brassicaceae (Crucifereae) και το φυτό *Nicotiana benthamiana* της οικογένειας Solanaceae.

Συνθήκες καλλιέργειας του *Arabidopsis thaliana*

Για την ανάπτυξη των φυτών κάτω από ασυπτικές συνθήκες, τα σπέρματα ενυδατώνονται για 24 ώρες στους 4°C και αποστειρώνονται σε 20% διάλυμα χλωρίνης, 0.01% TritonX-100. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάτω από ασυπτικές συνθήκες σε τρυβλία, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 22 °C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι). Με την πάροδο 2 εβδομάδων τα φυτά μεταφυτεύονται στο χώμα και τοποθετούνται στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από το *Arabidopsis thaliana*

- Φρέσκο φυτικό υλικό (επιλέχθηκαν οφθαλμοί και φύλλα από φυτά *Arabidopsis*) ομογενοποιείται παρουσία υγρού άζωτου με κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης.
- Μετά τη λειοτρίβηση, η σκόνη μοιράστηκε σε eppendorf tubes (περίπου 400 μL σε κάθε eppendorf), τα οποία στη συνέχεια μεταφερθήκανε σε θερμό με άζωτο μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία της απομόνωσης.
- Στα 400 μL σκόνης, προστέθηκαν 600μL Phenol και 600μL RNA Extraction Buffer (100 mM Tris-HCl pH:9 – 0.5% SDS). Ακολουθεί δυνατή ανάδευση με το χέρι για 2-3 min.
- Φυγοκέντρηση σε maxspeed για 10min στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται (600 μL+όγκος της σκόνης) σε νέο eppendorf tube και ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο Phenol/SEVAG

(300 μ L Phenol/ 300 μ L SEVAG). Ακολουθεί δυνατή ανάδευση με το χέρι για 2-3 min.

- Φυγοκέντρηση σε maxspeed για 10min στους 4⁰C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται (600 μ L+όγκος της σκόνης) σε νέο erpendorf tube και ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με ίσο όγκο Phenol/SEVAG(300 μ L Phenol/ 300 μ LSEVAG). Ακολουθεί δυνατή ανάδευση με το χέρι για 2-3 min.
- Φυγοκέντρηση σε maxspeed για 10min στους 4⁰C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorftube χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση και προστίθεται ίσος όγκος SEVAG. Ακολουθεί δυνατή ανάδευση με το χέρι για 2-3 min.
- Φυγοκέντρηση σε maxspeed για 10min στους 4⁰C.
- Το υπερκείμενο (600 μ L) μεταφέρεται ισόποσα σε 2 erpendorf tube (300 μ L) για το precipitation.
- Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων, στο υπερκείμενο προστέθηκαν 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% (750 μ L) και 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa pH:4.8 (30 μ L) και τοποθετήθηκαν τα δείγματα στους -20⁰C overnight.
- Το επόμενο πρωί ακολουθεί φυγοκέντρηση σε maxspeed για 30min στους 4⁰C.
- Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί shortspin και αφαιρείται όλη η αιθανόλη με πιπέτα.
- Τα δείγματα παραμένουν για 5min σε ηρεμία ώστε να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης και επαναδιαλύονται σε 50 μ L ddH₂O (Ο τελικός όγκος επαναδιάλυσης εξαρτάται από την ποσότητα του pellet, αρχικού ιστού κλπ.).
- Μετά την προσθήκη νερού τα δείγματα μεταφέρονται αμέσως στον πάγο.

Ακολουθούν μικρά bursts με vortex. Γίνεται επανένωση των δειγμάτων σε ένα tube. Μια μικρή ποσότητα (2-3 μ L) πηγαίνει για μέτρηση στο nanodrop. Γίνεται μια αραιώση 1:4 για να χρησιμοποιηθεί σε agarose gel 0.8%. Το υπόλοιπο δείγμα παγώνεται στους -80⁰C άμεσα, μέχρι την επόμενη χρήση.

Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από το Arabidopsis thaliana

CTAB DNA Miniprep (Joseph D.Clark)

Φρέσκο φυτικό υλικό ομογενοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτρίβησης ή μέσα σε erpendorf tube με μικρό γουδί.

- Το ρυθμιστικό διάλυμα CTAB τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 65°C.
- Προστίθεται ένας όγκος (200μL) ζεστού CTAB και τοποθετούνται τα erpendorf στο υδατόλουτρο στους 65°C για 10-30 λεπτά.
- Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG(χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)) και το μείγμα αναδεύεται ελαφρά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13000 στροφές/λεπτό).
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf tube.
- Προστίθενται 0.7 του όγκου (140μL) ισοπροπανόλης, γίνεται ανάδευση με το χέρι και το δείγμα παραμένει σε ηρεμία για 10λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπεται φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις μέγιστες στροφές/λεπτό.
- Το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται με προσθήκη 0.5 mL 100% αιθανόλης και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13000 στροφές
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο
- Επαναιωρείται το ίζημα σε 100μL H₂O ή T.E.

RT-PCR

Απομονώνεται ολικό RNA από ολόκληρα φυτά ή διάφορα φυτικά όργανα. Με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου μετράμε την ποσότητα που περιέχεται σε κάθε δείγμα.

Από κάθε δείγμα ολικού RNA παίρνουμε 25μγκαι χρησιμοποιώντας το ένζυμο DNάση I καταστρέφουμε το DNA που περιέχεται στο δείγμα για να μη

χρησιμοποιηθεί ως μήτρα στις αντιδράσεις PCR. Τα συστατικά της αντίδρασης και οι τελικές συγκεντρώσεις είναι τα ακόλουθα.

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης I	10x	6μL	1x
DNάση (Promega)	2 units/μL	7μL	14 units
Αναστολέας RNάσης (Promega)	30 units/μL	1μL	30 units
Ολικό RNA	-	-	25μg
ddH ₂ O	-	Έως τα 60 μL	-
Τελικός όγκος αντίδρασης 60 μL			

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 45min.

Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, πραγματοποιείται καθαρισμός με φαινόλη και στη συνέχεια προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa, pH 4.8 και 2 όγκους 100% αιθανόλη. Το μείγμα ανακατεύεται καλά και τοποθετείται στους -20°C για 12 ώρες.

Το ολικό RNA ελεύθερο από DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30min στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα διαλύεται σε περίπου 25μL ddH₂O. Από αυτά 2μL αναλύονται σε gel αгарόζης για να επιβεβαιώσουμε πραγματικά ότι δεν έχει καταστραφεί το RNA αλλά μόνο το DNA και 2μL αραιώνονται με ddH₂O 1:250, η αραιώση χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε τη συγκέντρωση του RNA με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου.

2μg ολικού RNA ελεύθερο από DNA μεταγράφεται ανάστροφα σε μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία γίνεται σε δυο βήματα.

Στο πρώτο βήμα το ολικό RNA ελεύθερο από DNA και εξειδικευμένοι εκκινητές, αποδιατάσσονται στους 65°C για 10min και τοποθετούνται στους 4°C. Τα

συστατικά και οι συγκεντρώσεις σ' αυτό το βήμα δίδονται από τον ακόλουθο πίνακα.

Συστατικά πρώτου βήματος	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ολικό RNAελεύθερο από DNA	-	2 µg
Εκκινητές για ανάστροφη μεταγραφή (12.5µM)	4µL	50 pmoles
ddH ₂ O	Έως τα 10 µL	
Όγκος πρώτου βήματος 10µL		

Στο δεύτερο βήμα προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά:

Συστατικά δεύτερου βήματος	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
5x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης μεταγραφάσης	4µL	1x
100mM DTT	2µL	10mM
10mM dNTPs	2µL	1mM
Αναστολέας RNάσης 30units/µL (Promega)	1µL	30 units
Expand Ανάστροφη μεταγραφάση 50 units/µL (Roche)	1µL	50 units

Όγκος δεύτερου βήματος 10µL

Τελικός όγκος αντίδρασης (όγκος πρώτου και δεύτερου βήματος) 20µL

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 42°Cγια 60 min.

Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, διατηρείται στους 4°C. Γίνεται αραίωση 1/5 και χρησιμοποιούνται 3µLγια αντίδραση PCR.

Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA)

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε γελαγαρόζης. 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 μιας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο 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%-4% αγαρόζη w/v.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1xTAE.
- Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα καταστεί 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 αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθενται 2μL χρωστικής.
- 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 και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, που ποικίλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της συσκευής και την περιεκτικότητα της σε αγαρόζη.

Η σύσταση της πηκτής αγαρόζης 0.8% είναι η εξής:

0.8g αγαρόζης

2ml 1xTAE

7μL βρωμιούχου αιθιδίου

98 mLH₂O

Τελικός όγκος 100mL

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

20mL 1xTAE

70μL βρωμιούχου αιθιδίου

980mLH₂O

Τελικός όγκος 1000mL

Η σύσταση του μητρικού διαλύματος χρωστικών 5x είναι η εξής:

1.25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

1.25% (w/v) κυανολοξυλαίνιο

H₂O

Στην τελική σύσταση του 1x διαλύματος χρωστικών προστίθεται και 50%(w/v) σουκρόζη.

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 ηλεκτροφορητικά. 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 eppendorf 1.5mL.
- Στη συνέχεια τοποθετείται στους -80°C για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί απομόνωση DNA με βάση το πρωτόκολλο της QIA quick Extraction Kit (Cat No 28704)

Ενοποίηση τμημάτων με κολλώδη άκρα

Ο πλασμιδιακός φορέας καθώς και το κλάσμα DNA, του οποίου η κλωνοποίηση επιδιώκεται απομονώνονται και καθαρίζονται από gel αγαρόζης. Ο τελικός όγκος στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι συνήθως 20μL.

Σε eppendorf tube που βρίσκεται στον πάγο προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το ένθετο. Ο όγκος αυτών των δύο δεν πρέπει να ξεπερνά το 50% του όγκου της αντίδρασης.

Προσθήκη 2μL 10Χρυσθμιστικού διαλύματος T4 της αντίδρασης.

Προσθήκη 1μL DNAT4 λιγάσης (1U/μL, Fermentas [#EL0016]).

Ανάμιξη του δείγματος και επώαση του στους 22°C για 4-12 ώρες.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα Escherichia Coli

- Από το stock γλυκερόλης στρώνεται πάνω σε θρεπτικό μέσο με κατάλληλο αντιβιοτικό για επιλογή.
- Παραμένει στους 37°C ανάποδα.
- Την επόμενη ημέρα σηκώνεται μια και μόνη αποικία και τοποθετείται στην υγρή καλλιέργεια προκειμένου να αναπτυχθεί overnight.
- Ακολουθεί αλκαλική λύση της αποικίας:

1. Μεταφέρεται 1.5 mL από την υγρή καλλιέργεια σε eppendorfs και ακολουθεί φυγοκέντρωση τους για 1-2min στις 13000rpm.

2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και παραμένει το pellet (ίζημα).

3. Προστίθενται 200μL από το P1 και επαναιωρείται το pellet με πιπέτα Gilson προσεκτικά ώστε να αποφευχθούν οι φυσαλίδες.

-Σύσταση P1: 20μL EDTA 0.5M, 50μL Tris-HCl pH:8.0, 10μL RNase, 920 μL ddH₂O (σύνθεση για 1mL)

4. Στη συνέχεια προστίθενται 200μL από το P2 και γίνεται ελαφριά ανάδευση με το χέρι ώστε το δείγμα να γίνει διαυγές και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5min.

-Σύσταση P2: 930μL ddH₂O, 50μL SDS 20%, 20μL NaOH 10N

5. Ακολουθεί προσθήκη 200μL P3 (3MCH₃COOK/5MCH₃COOH) σε realtime που έχει προψυχθεί σε πάγο. Με ελαφρά κίνηση των eppendorf θα πρέπει να διακρίνεται μια λευκή μάζα (κυτταρικά τοιχώματα).

6. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4 °C για 35min.

7. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καινούργιο eppendorf χωρίς να ληφθούν κυτταρικά τοιχώματα.

8. Προστίθενται 2 όγκοι παγωμένης αιθανόλης (EtOH) 100% και γίνεται καλή ανάμιξη.

9. Επώαση για 10min σε rt.

10. Φυγοκέντρηση για 15min στις 13000rpm σε room temperature.

11. Αποβολή του υπερκειμένου.

12. Στέγνωμα για 10min με ανοικτά eppendorfs.

13.Επαναδιάλυση σε 40μL ddH₂O.

14.Τα δείγματα αφήνονται στον πάγο για 10min.

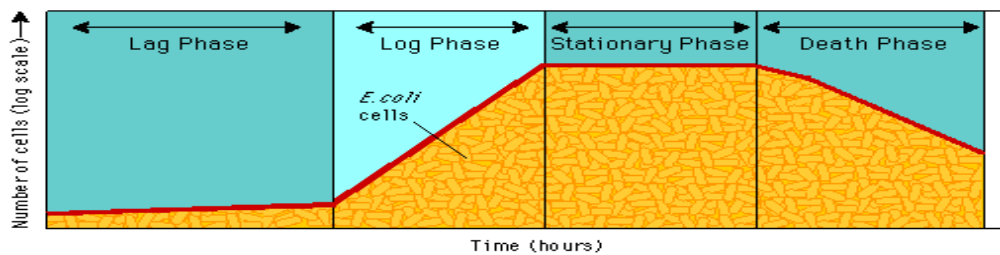
15.Ακολουθεί vortex και shortspin των eppendorf.

16.Αν τα δείγματα δε χρησιμοποιηθούν άμεσα διατηρούνται στους -20 °C.

Δημιουργία δεκτικών κυττάρων E.coli (Competent cells DH5α)

Κύτταρα της Escherichia coli ,από μονή αποικία που έχει ληφθεί από τρυβλίο, καλλιεργούνται σε πλούσιο θρεπτικό υλικό LB, για 12 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν μέχρι O.D.₅₅₀=0.5 για 2-3 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που πλέον βρίσκονται σε εκθετική φάση, παραμένουν στον πάγο για 10-15min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5000rpm για 5min στους 4°C (Sorval CSA κεφαλή). Τα κύτταρα που συλλέγονται από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύονται στο ½ του αρχικού όγκου σε 25mM CaCl₂- 10mM Tris-HCl pH:8.0 (50mL). Η επαναδιάλυση γίνεται στα μεγάλα tubes της Sorval και στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε 4 corex, καθένα από τα οποία θα περιέχει 25mL. Στο σημείο αυτό, πραγματοποιείται νέα φυγοκέντρηση 5000rpm για 5min στους 4°C (Sorval HB-4 κεφαλή). Τα κύτταρα που συλλέγονται από τη φυγοκέντρηση αυτή, επαναδιαλύονται στο 1/15 του αρχικού όγκου, σε 75mM CaCl₂- 10mM Tris-HCl pH:8.0 55% Glycerol (100mL/15=6.66/2=3.33mL και για τα 2 corex). Τα κύτταρα αφήνονται και πάλι στον πάγο για 5min και στη συνέχεια μεταφέρονται σε eppendorfs, τα οποία και παγώνουμε άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύουμε στους -80°C στη συνέχεια. Η επώαση σε ιονικό περιβάλλον σε θερμοκρασία 4 °C καθιστά τα κύτταρα δεκτικά στο DNA. Τα βακτήρια υποβάλλονται σε

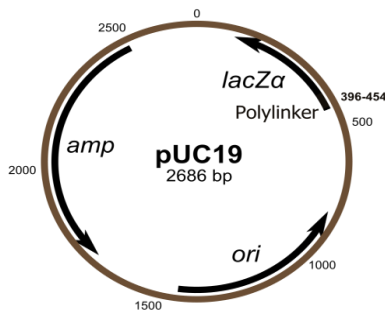
θερμοπληξία που πιθανόν επιτρέπει την αναδιάταξη της βακτηριακής μεμβράνης και την αποτελεσματική είσοδο του DNA μέσα στο κύτταρο.



Εικόνα 7. Η καμπύλη ανάπτυξης εκφράζει την βακτηριακή ανάπτυξη σε συνάρτηση με το χρόνο και διακρίνεται σε τέσσερα κύρια στάδια: τη φάση προσαρμογής, την εκθετική, τη στατική φάση και τη φάση ύφεσης (ή φάση θανάτου).

Πλασμιδιακοί φορείς

1. pUC19



πλασμίδιο.

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pUC19 δημιουργήθηκε από τον Joachim Messing και τους συνεργάτες του. Τα πειράματα για τη δημιουργία του πλασμιδίου διεξήχθησαν στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια (University of California), απ' όπου φέρει και το όνομά του το

πλασμίδιο. Ο pUC19 είναι ένας από τους ευρέως χρησιμοποιούμενους φορείς στη δημιουργία ανασυνδυασμένων τμημάτων του DNA καθώς μας δίνει και οπτικά αποτελέσματα, με χρωματισμό των αποικιών, στο θρεπτικό μέσο που αναπτύσσονται.

Δομή

Το DNA του πλασμιδίου είναι δίκλωνο , κυκλικό και φέρει 2686 ζεύγη βάσεων.

Σημαντικά τμήματα του πλασμιδίου:

- Το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη (amp^R)
- Ένα αμινοξικό τμήμα του β-γαλακτοσιδάσης γονιδίου της *Escherichia coli*.
- Η περιοχή πολλαπλών κλωνοποιήσεων (MCS) αποτελεί μέρος του lacZ γονιδίου υποκαθιστώντας τα κωδικόνια 6 και 7.
- Η περιοχή ori (origin of replication) που προέρχεται από το πλασμίδιο pMB1.

Λειτουργία

Το πλασμίδιο εισάγεται σε ένα βακτηριακό κύτταρο με μια διαδικασία που ονομάζεται μετασηματισμός όπου και μπορεί να πολλαπλασιάζεται και να εκφράζεται. Ωστόσο, λόγω της παρουσίας της περιοχής πολλαπλών κλωνοποιήσεων (MCS) και διαφόρων θέσεων περιορισμού, ένα ξένο τμήμα DNA της επιλογής μας μπορεί να εισαχθεί σε αυτό με ένθεση του στην περιοχή MCS. Τα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο μπορούν να διαχωριστούν από εκείνα που δεν το φέρουν αν αναπτυχθούν σε μέσο με αμπικιλίνη. Μόνο τα κύτταρα με το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη θα επιβιώσουν. Επιπλέον, τα μετασηματισμένα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, μπορούν να διακριθούν σε καλλιέργεια αγαρόζης με IPTG και X-gal.

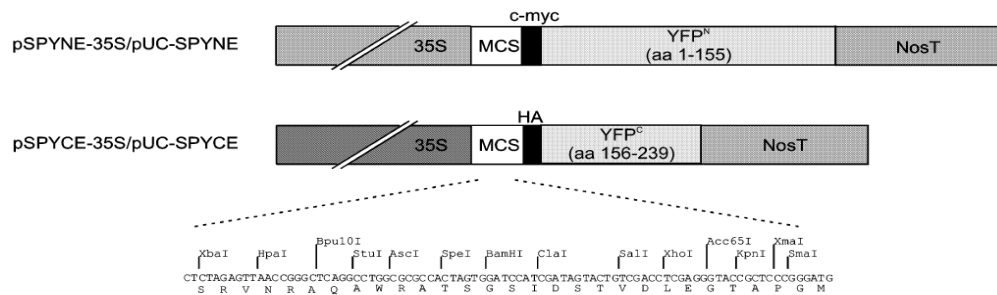
IPTG και X-gal

Για τη διαλογή των κλώνων που περιέχουν ανασυνδιασμένο DNA, ένα υπόστρωμα γνωστό ως x-gal, προστίθεται στο τρυβλίο με την αгарόζη. Αν έχουμε παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης, το X-gal υδρολύεται για να σχηματίσει 5-βρωμο-4-χλωρο-ινδοξυλιο το οποίο διμερίζεται και παράγει μια μπλε χρωστική. Οι αποικίες που σχηματίζονται από μη ανασυνδυασμένα κύτταρα φαίνονται μπλε, ενώ εκείνες που σχηματίζονται από ανασυνδυασμένα κύτταρα, λευκές. Η Ισοπροπυλο-β- D- 1 - θειογαλακτοπυρανοσίδη (IPTG) είναι ένα μη μεταβολιζόμενο ανάλογο της γαλακτόζης που επάγει την έκφραση του γονιδίου lacZ. Η IPTG δεν αποτελεί υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση αλλά επαγωγέα της.

2. pSPYNE-pSPYCE

Για την ανάπτυξη της τεχνολογίας BiFC για την οπτικοποίηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε ζωντανά φυτικά κύτταρα, κατασκευάστηκαν τέσσερα ζεύγη φορέων. Οι φορείς αυτοί ονομάστηκαν pSPYNE και pSPYCE. Κάθε ζεύγος φορέων επιτρέπει την έκφραση πρωτεϊνών ενδιαφέροντος που συντήκονται είτε στο N-τερματικό (N-terminal) άκρο 155 αμινοξέων ή στο C-τερματικό (C-terminal) άκρο 86 αμινοξέων της YFP. Επίσης τα πλασμίδια περιέχουν είτε μια c-myc (pSPYNE) ή μια HA (pSPYCE) ετικέτα συγγένειας για την ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης σύντηξης σε εκχυλίσματα κυττάρων.

Δημιουργήθηκαν δύο σειρές φορέων που βασίζονται στο pUC19 που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για προσεγγίσεις παροδικού μετασχηματισμού φυτικών κυττάρων.



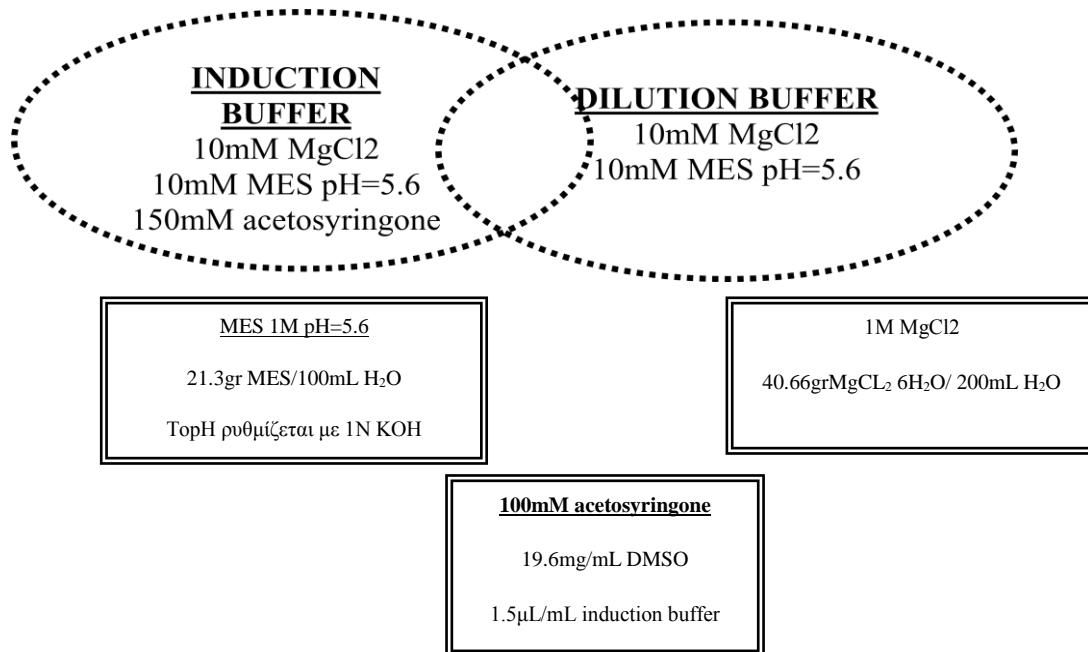
Εικόνα 8. Χάρτης των πλασμιδίων pSPYNE και pSPYCE. Στην εικόνα φαίνεται η θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS), οι θέσεις ενδονουκλεασών περιορισμού καθώς και οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον υποκινητή 35SCaMV, στην αλληλουχία λήξης μεταγραφής Nos, στους επιτόπους c-myc και HA και στα τμήματα της YFP (Walter et al.2004).

Agroinfiltration σε φύλλα καπνού

- Χρησιμοποιείται στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 μετασηματισμένο με πλασμιδιακό φορέα. Ο μετασηματισμός πραγματοποιείται με ηλεκτροπόρωση.
- Μετά την ηλεκτροπόρωση τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB, με τριπλή επιλογή (ριφαμικίνη 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 (ριφαμικίνη Rif, τζενταμικίνη Gen και καναμικίνη Kan). Ανάπτυξη για 1-2 ημέρες, έως ότου θολώσει καλά.
- Spin στις 3500rpm για 10min
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα ξεπλένεται με 1mL dilution buffer (όσος ο όγκος και της αρχικής καλλιέργειας στο erppendorf). Χρειάζεται πολύ προσοχή διότι το βακτηριακό ίζημα μπορεί εύκολα να αποκολληθεί και να χαθεί σημαντικός αριθμός βακτηρίων.
- Ακολούθως φωτομετρούνται σε OD₆₀₀ τα βακτηριακά διαλύματα και αραιώνονται, έτσι ώστε να έχουν τελικά την επιθυμητή οπτική πυκνότητα για το infiltration.

- Απομακρύνεται το dilution buffer και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 1mL induction buffer (όσος ο όγκος και της αρχικής καλλιέργειας στο erppendorf), όπου αφήνεται για 3h σε RT ή overnight.
- pBIN61/GFP OD:0.7
p19 OD:1

expression peak in 48-56h p.i.(post infiltration)



Υδατικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα βακτηριακών κυττάρων και φυτών

1. Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων-σχετικά αντιδραστήρια

- **LB υγρό θρεπτικό μέσο**

0.5% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Πεπτόνη. Σε περίπτωση που θέλουμε να παρασκευάσουμε στερεό θρεπτικό μέσο προστίθεται 1.4% (w/v) άγαρ.

- **IPTG**

(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)

200mg/mL σε dH₂O. Διατηρείται στους -20°C.

- **X-gal**

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

200mg/mL σε διμεθυλ-φοραμίδιο. Αποθηκεύεται στους -20°C.

2. Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

- **P1 ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης**

50mM Tris-HCl pH:8.0, 10mM EDTA pH:8.0 και 100μg/mL RNάσης.

- **P2 ρυθμιστικό διάλυμα λύσης**

0.2N NaOH, 1% (w/v) SDS

- **3M/5M CH₃COOK**

60ml 5M καλίου pH:4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11.5mL οξέος και 28.5mL dH₂O.

- **RNάση**

Διάλυμα RNάσης A 10mg/mL σε 10mM Tris-HCl pH:7.4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15min. Διακοπή για 20min και επανάληψη βρασμού, έτσι ώστε να καταστραφούν τα υπολείμματα DNάσης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

- **T.E. ρυθμιστικό διάλυμα**

10mM Tris-Cl pH:7.5, 1mM EDTA pH:8.0

3. Διαλύματα απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

- **CTAB DNA Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης**

2% (w/v) CTAB, 100mM Tris pH:8.0, 20mM EDTA pH:8.0, 1.4M NaCl, 1% (w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη, M.B. 40000), 2% (w/v) CTAB

- **Sevag**

(24:1) (Χλωροφόρμιο: Ισοαμυλική αλκοόλη)

4. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

- **50xTAE ρυθμιστικού διαλύματος**

24.2gr (w/v) Tris-base, 100mL/L 0.5M EDTA pH:8.0, 57.1mL/L CH₃COOH

- **Βρωμιούχο αιθίδιο**

5mg/ml σε dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου

5. Διαλύματα και θρεπτικά μέσα

- **Θρεπτικό μέσο ½ MS**

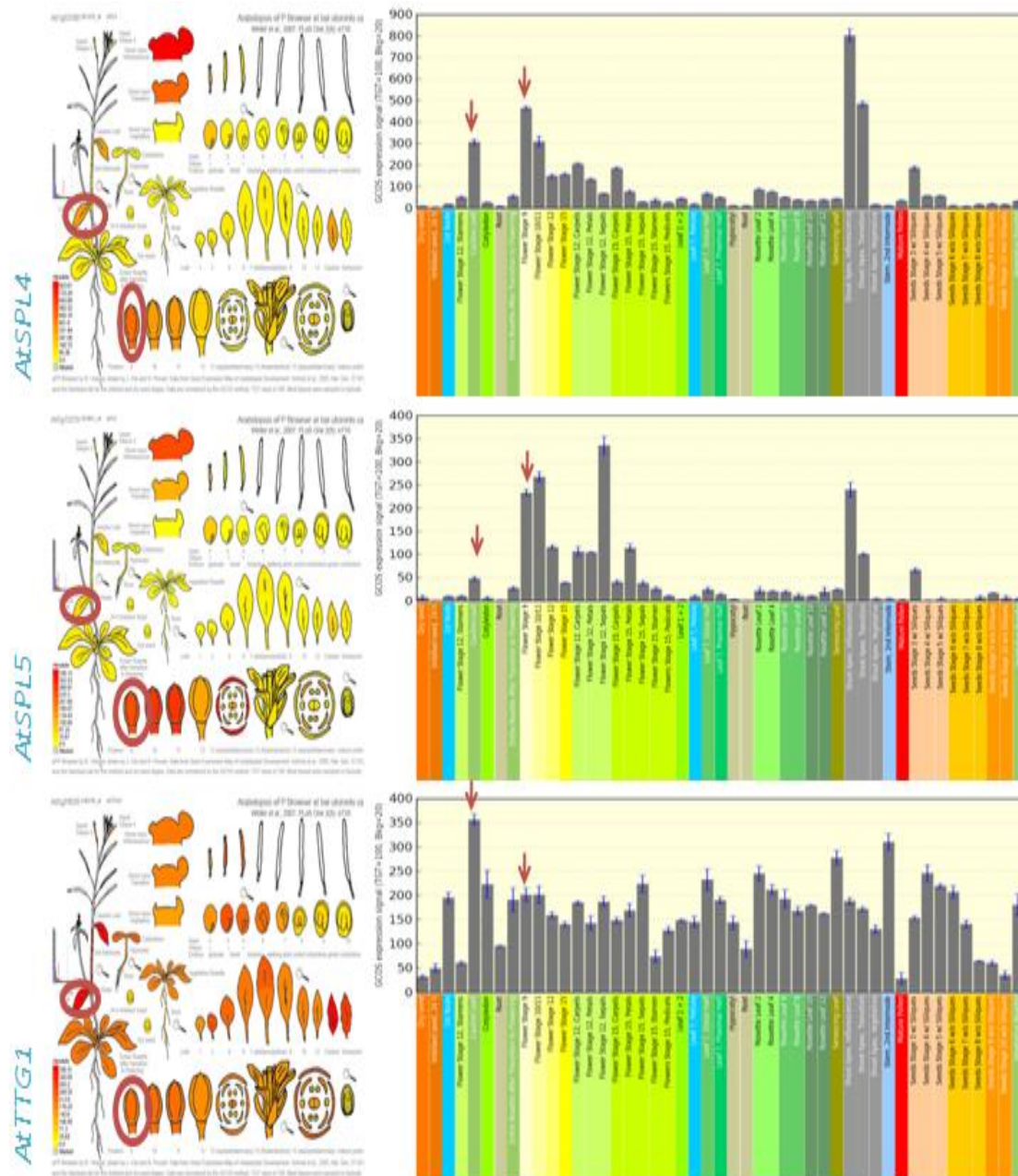
½ xMS Θρεπτικό μέσο που αποτελείται από MSάλατα και βιταμίνες (4.3g/LICN) 2% Σακχαρόζη, 0.5g/LMES, 3g/L Phytigel, pH:5.7

Αποτελέσματα

Αποτελέσματα

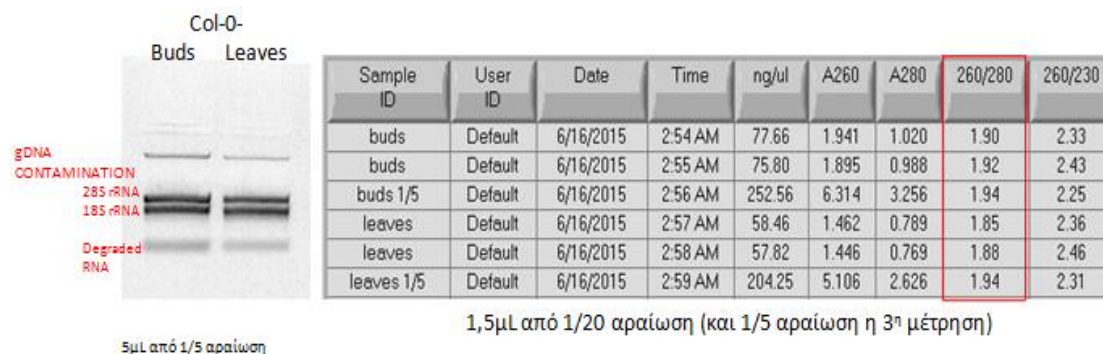
Απομόνωση του cDNA των γονιδίων AtTTG1, AtSPL4 και AtSPL5

Η έκφραση των γονιδίων AtTTG1, AtSPL4 και AtSPL5 παρουσιάζουν μέγιστο στα κλειστά άνθη και στα φύλλα του φυτού *A. thaliana* (Εικ. 9).



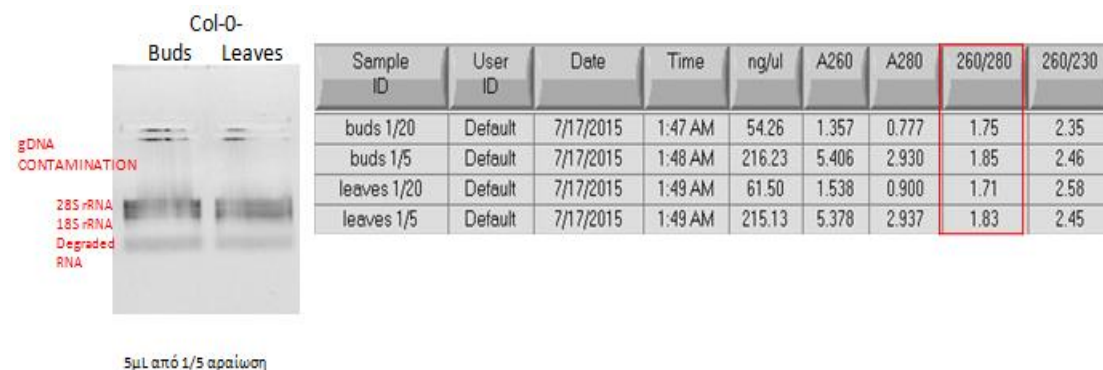
Εικόνα 9. Για να απομονωθεί το cDNA των 3 γονιδίων, έγινε συλλογή κλειστών ανθών και φύλλων από φυτά αγρίου τύπου *A. Thaliana*. Η επιλογή των ιστών έγινε βάσει δεδομένων βιοπληροφορικής ανάλυσης. Οι ιστοί που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη έκφραση των γονιδίων και υπάρχει δυνατότητα χειρισμών τους είναι τα νεαρά φύλλα (cauline leaves) και κλειστοί οφθαλμοί ανθικού σταδίου 9.

Ποσοτικοποίηση του ολικού RNA που απομονώθηκε από οφθαλμούς και φύλλα



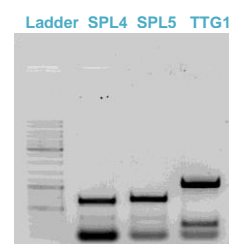
Εικόνα 10. Ο λόγος 260/280 χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του RNA που απομονώθηκε. Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για υψηλής ποιότητας δείγμα θα ακολουθήσει χρήση DNάσης I για απομάκρυνση υπολειμμάτων gDNA.

Απομάκρυνση υπολειμμάτων γενομικού DNA με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου DNάση I και επανεκτίμηση ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών



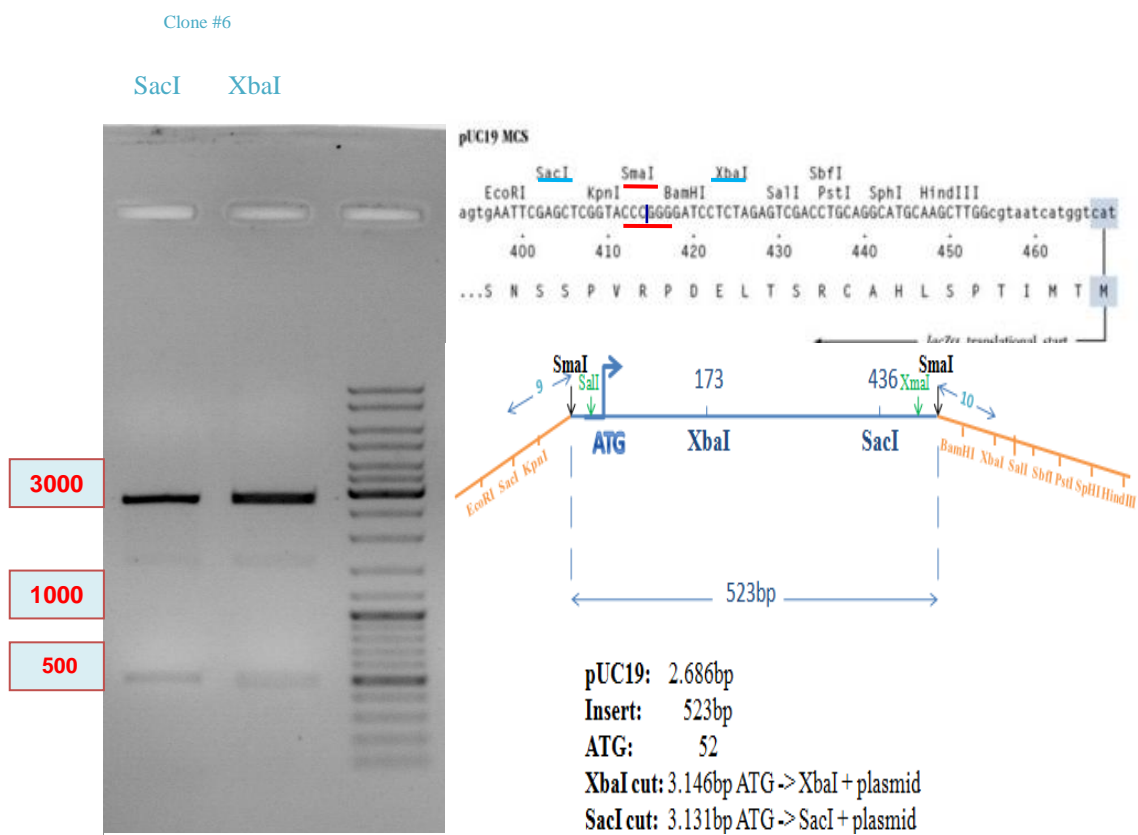
Εικόνα 11. Χαμηλότερη καθαρότητα του RNA έχοντας όμως απομακρώνει υπολείμματα gDNA

Στη συνέχεια ακολούθησε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, έγινε ενίσχυση του cDNA των SPL4, SPL5, TTG1 (Εικ. 10).



Κλωνοποίηση των cDNA στο φορέα pUC19

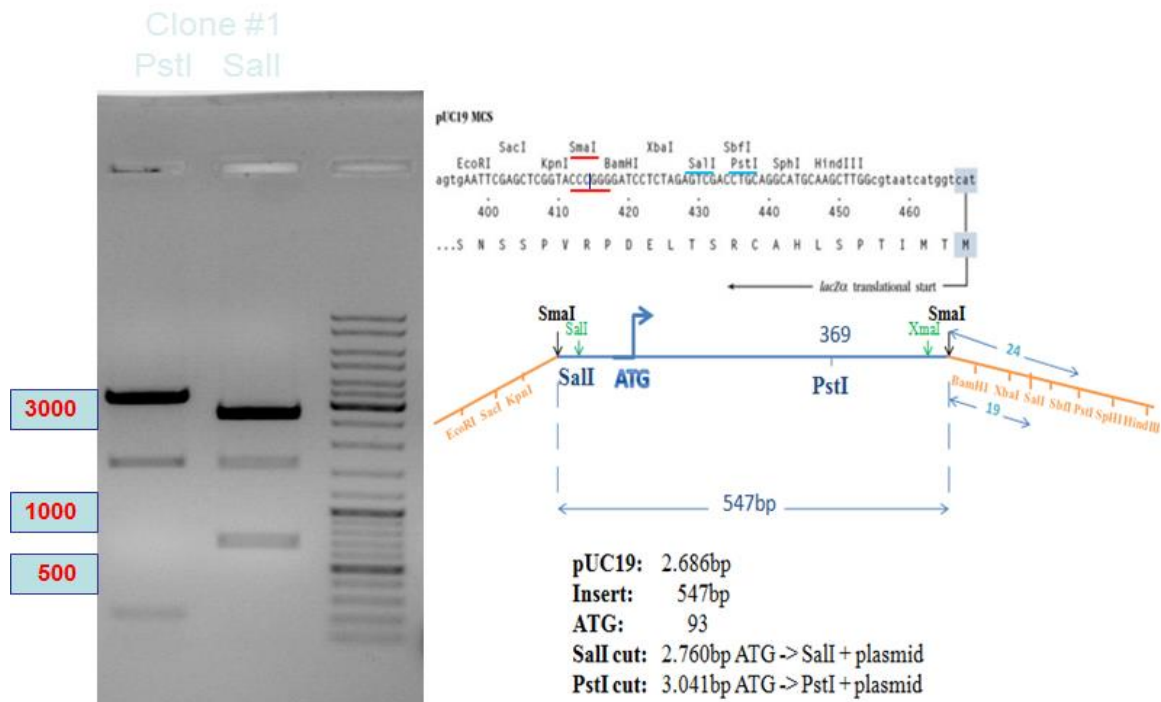
Το προϊόν από τις αντιδράσεις PCR, κλωνοποιήθηκε στη θέση *SmaI* του φορέα κλωνοποίησης pUC19 και ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* DH5a. Έγινε έλεγχος των ενθέσεων με πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και επιλέχθηκαν οι σωστοί κλώνοι. Οι χάρτες των κλώνων καθώς και τα αποτελέσματα από τις πέψεις ελέγχου φαίνονται στις εικόνες 13, 14 και 15.



Εικόνα 13

α. Gel αγαρόζης με πέψη για τον έλεγχο της ένθεσης του *SPLA* στην MCS του πλασμιδίου pUC19.

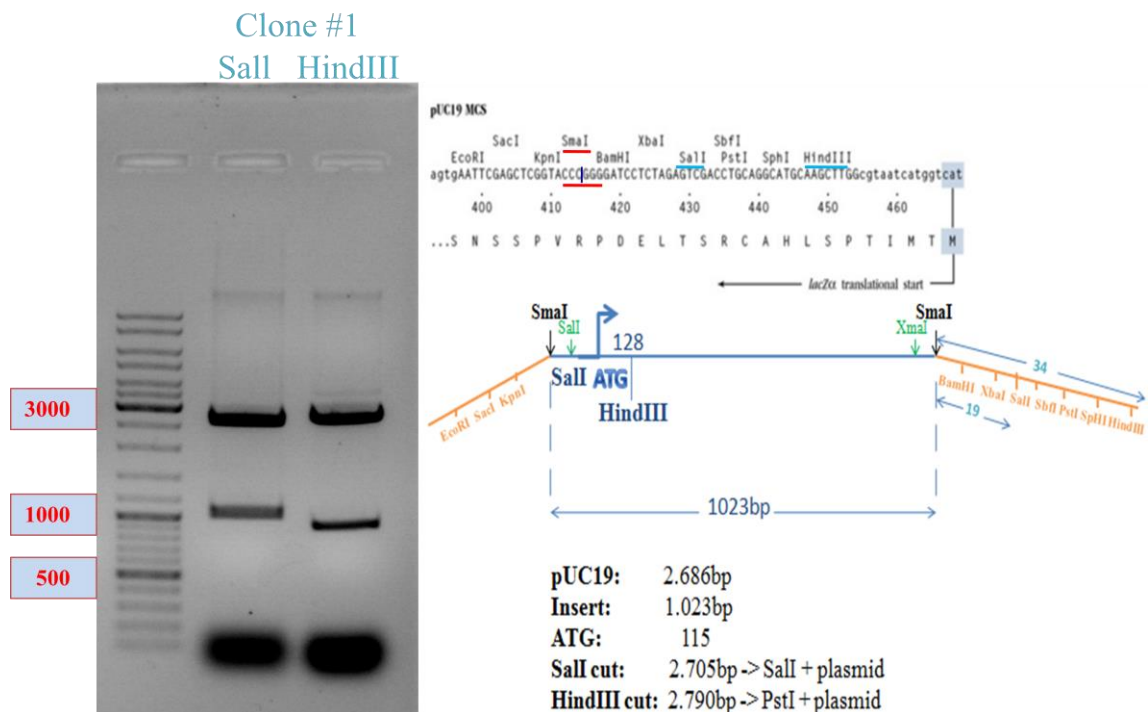
β. Ο αναμενόμενος χάρτης του πλασμιδίου μετά την ένθεση του γονιδίου *SPLA* στην MCS του πλασμιδίου pUC19



Εικόνα 14

α. Gel αγαρόζης με πέψη για τον έλεγχο της ένθεσης του *SPL4* στην MCS του πλασμιδίου pUC19.

β. Ο αναμενόμενος χάρτης του πλασμιδίου μετά την ένθεση του γονιδίου *SPL5* στην MCS του πλασμιδίου pUC19



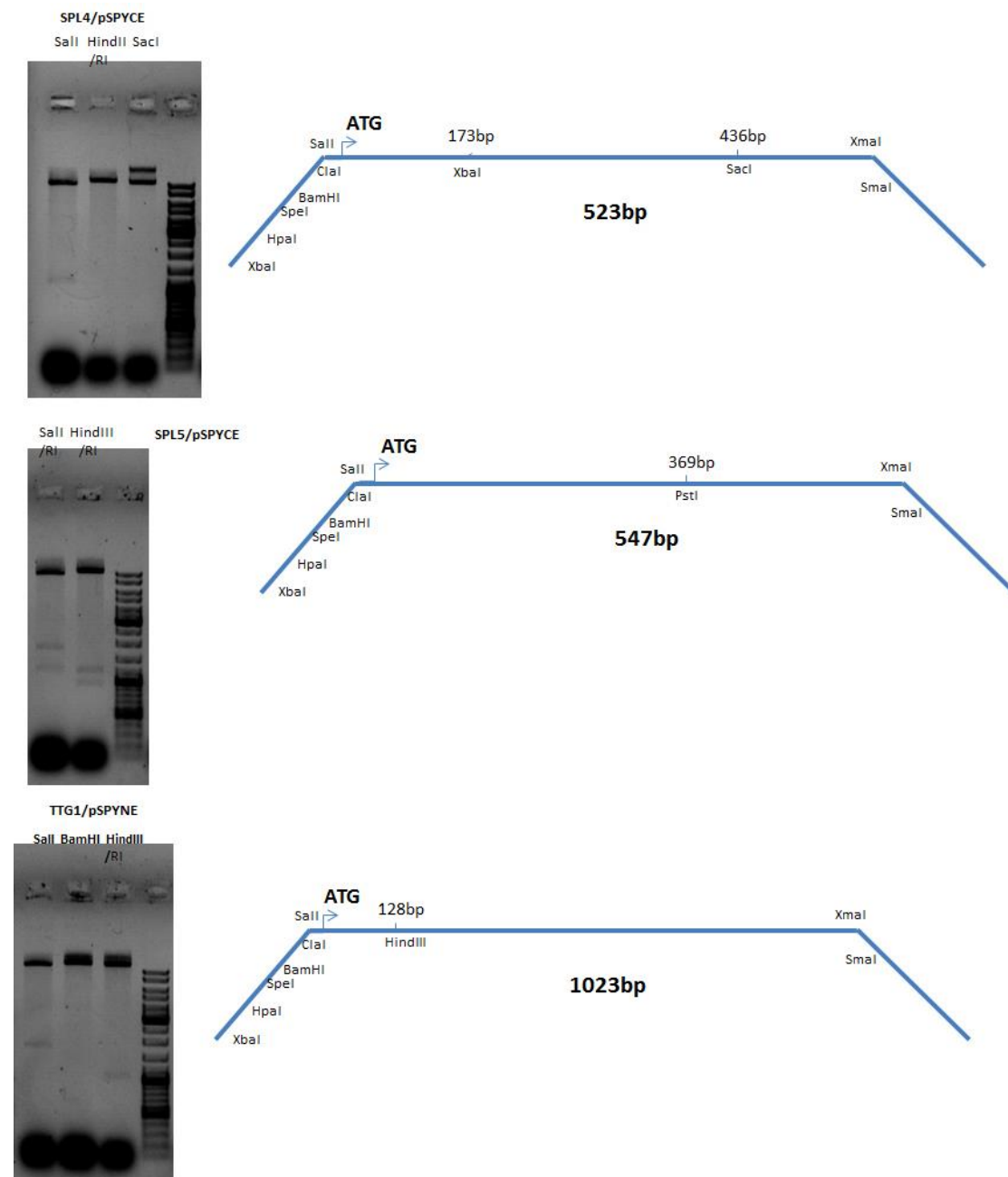
Εικόνα 15

α. Gel αγαρόζης με πέψη για τον έλεγχο της ένθεσης του *TTGI* στην MCS του πλασμιδίου pUC19.

β. Ο αναμενόμενος χάρτης του πλασμιδίου μετά την ένθεση του γονιδίου *TTGI* στην MCS του πλασμιδίου pUC19

Κλωνοποίηση στους φορείς pSPYNE-pSPYCE

Για την κατασκευή των τελικών κλώνων για να γίνει ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων, απομονώθηκαν τα γονίδια AtSPL4, AtSPL5 και AtTTG1 από τους pUC19 φορείς με τα ένζυμα περιορισμού SalI και XmaI και κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις SalI/XmaI του φορέα 35S::pSPYCE τα AtSPL4 και AtSPL5, ενώ το AtTTG1, κλωνοποιήθηκε στις ίδιες θέσεις του φορέα 35S::pSPYNE. Ο έλεγχος και οι τελικοί χάρτες των κλώνων παρουσιάζονται στην Εικ. 16.

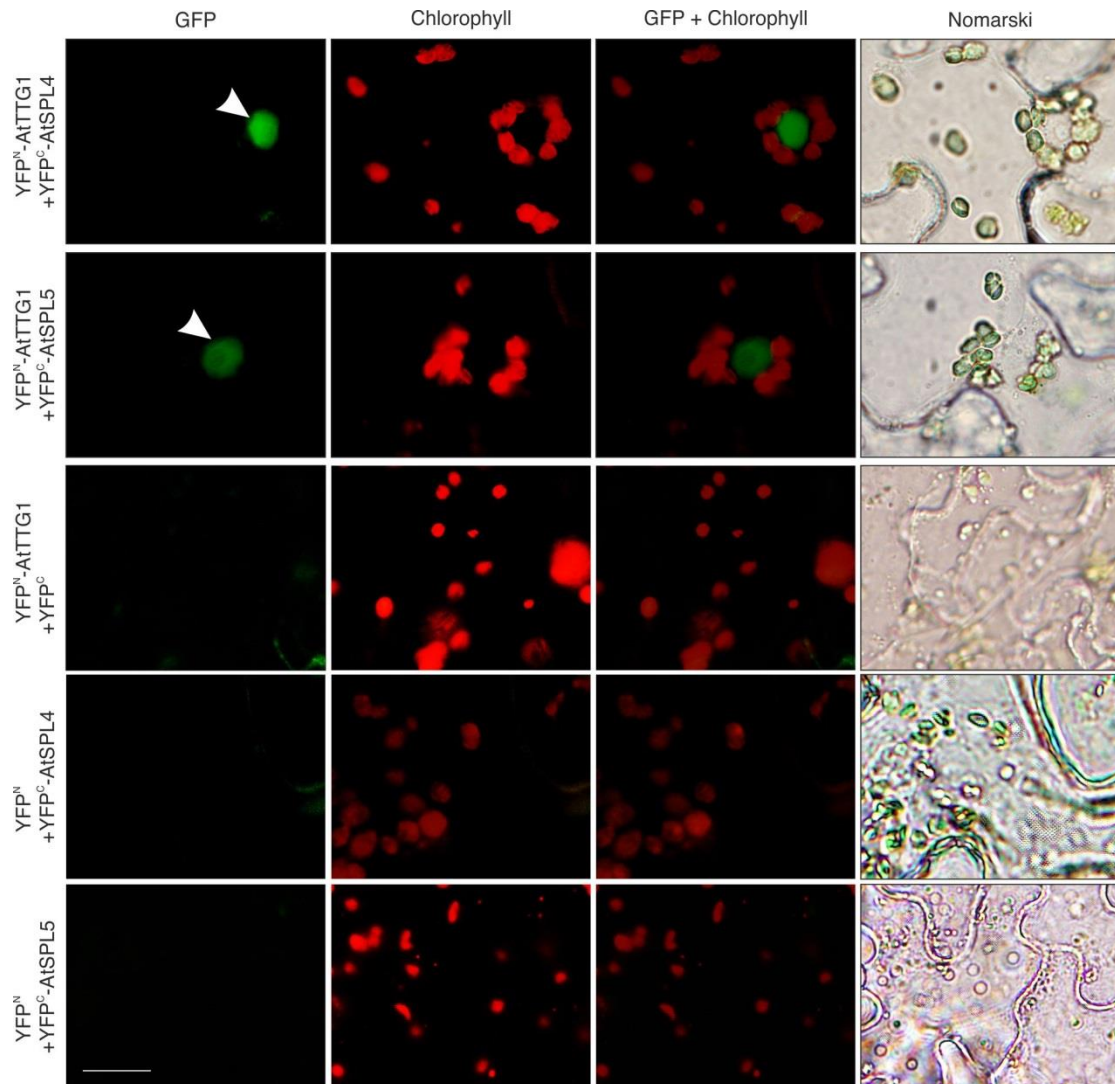


Εικόνα 16. Τα SPL4/SPL5 κλωνοποιήθηκαν στον pSPYCE και το TTG1 στον pSPYNE. Οι χάρτες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του αποτελέσματος και τα gel αγαρόζης για επιβεβαίωση της ορθότητας των ενθέσεων.

Έλεγχος αλληλεπιδράσεων

Η πρωτεΐνη AtTTG1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες AtSPL4 και AtSPL5

Στην Εικ. 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον παροδικό μετασχηματισμό επιδερμικών κυττάρων φύλλων καπνού, με τις κατασκευές, καθώς και τα αντίστοιχα πειράματα ελέγχου.



Με λευκά βέλη επισημαίνονται οι πυρήνες, όπου και εντοπίζεται ο φθορισμός της πρωτεΐνης YFP, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης TTG1, με τις SPL4/5, ενώ στα πειράματα ελέγχου, όπου ο μετασχηματισμός γίνεται μόνο με την μία κατασκευή, δεν παρατηρείται καθόλου πράσινος φθορισμός.

Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη TTG1 αλληλεπιδρά με τις SPL4/5, όπως συμβαίνει και με τις ομόλογες πρωτεΐνες στο φυτό *Cistus creticus*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* υπάρχουν 17 γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες SPL. Η έκφραση των 11 από τα 17 αυτά γονίδια, ελέγχεται από το miR156, το οποίο αποτελεί ρυθμιστή της ανάπτυξης των φυτών (Xing et al., 2010). Τα επίπεδα έκφρασης του miR156 ελαττώνονται καθώς το φυτό μεγαλώνει, ενώ παράλληλα αυξάνεται η έκφραση των SPL γονιδίων. Τα γονίδια SPL ρυθμίζουν μια σειρά από αλλαγές που συμβαίνουν στο φυτό κατά την ανάπτυξη και περιλαμβάνουν τη μετάβαση από τη βλαστική στην ανθική φάση, το χρόνο άνθισης του φυτού, την εμβρυονική ανάπτυξη, το μέγεθος των κυττάρων, τη γονιμότητα και την ωρίμανση των καρπών (Wuand Poethig, 2006; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009; Wang and Wang, 2015). Σχετικά πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα των SPL ρυθμίζει αρνητικά τη βιοσύνθεση και συσσώρευση των ανθοκυανινών, και επιπλέον, τα φυτά αυτά παρουσιάζουν ελαττωμένο τρίχωμα στους βλαστούς και στα άνθη τους. Και τα δύο αυτά φαινόμενα ελέγχονται από το τριμερές σύμπλοκο MBW, μέλος του οποίου είναι και η πρωτεΐνη TTG1, και οι φαινότυποι οφείλονται στο γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα της SPL9αποσταθεροποιούν το σύμπλοκο MBW, καθώς αλληλεπιδρά με τον MYB μεταγραφικό παράγοντα (Yu et al., 2010; Gou et al., 2011). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό και με τα δικά μας αποτελέσματα όπου το TTG1 αλληλεπιδρά με 2 διαφορετικά μέλη της οικογένειας SPL, δίνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση, καθώς θα μπορούσε να παράξει ακόμη περισσότερη γνώση σχετικά με τον μηχανισμό της διαφοροποίησης των επιδερμικών κυττάρων και για τον σημαντικό ρόλο που φαίνεται να παίζουν οι MBW και οι SPL μεταγραφικοί παράγοντες στη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

Balkunde, R., Pesch, M. and Hülskamp, M. (2010) Trichome patterning in *Arabidopsis thaliana* from genetic to molecular models. *Curr. Top. Dev. Biol.* **91**, 299-321.

Bernhardt, C., Lee, M.M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A. and Schiefelbein, J. (2003) The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development* **130**, 6431-6439.

Bernhardt, C., Zhao, M., Gonzalez, A., Lloyd, A. and Schiefelbein, J. (2005) The bHLH genes *GL3* and *EGL3* participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* **132**, 291-298.

Bruex, A., Kainkaryam, R.M., Wieckowski, Y., Kang, Y.H., Bernhardt, C., Xia, Y., Zheng, X., Wang, J.Y., Lee, M.M., Benfey, P., Woolf, P.J. and Schiefelbein, J. (2012) A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **8**, e1002446.

Costa, S. and Shaw, P. (2006) Chromatin organization and cell fate switch respond to positional information in *Arabidopsis*. *Nature* **439**, 493-496.

Di Cristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I. and Morelli, G. (1996) The *Arabidopsis* *Athb-10* (*GLABRA2*) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J.* **10**, 393-402.

Esch, J.J., Chen, M.A., Hillestad, M. and Marks, M.D. (2004) Comparison of *TRY* and the closely related *Atlg01380* gene in controlling *Arabidopsis* trichome patterning. *Plant J.* **40**, 860-869.

Falara, V., Fotopoulos, V., Margaritis, T., Anastasaki, T., Pateraki, I., Bosabalidis, A.M., Kafetzopoulos, D., Demetzos, C., Pichersky, E. and Kanellis,

A.K. (2008) Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Mol. Biol.* **68**, 633-651.

Falara, V., Pichersky, E. and Kanellis, A.K. (2010) A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant Physiol.* **154**, 301-310.

Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W. and Schiefelbein, J.W. (1994) The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev. Biol.* **166**, 740–754.

Gou, J.Y., Felippes, F.F., Liu, C.J., Weigel, D. and Wang, J.W. (2011) Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *Plant Cell* **23**, 1512–1522.

Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504.

Hulskamp, M., Schnittger, A. and Folkers, U. (1999) Pattern formation and cell differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a genetic model system. *Int. Rev. Cytol.* **186**, 147–178.

Kirik, V., Lee, M.M., Wester, K., Herrmann, U., Zheng, Z., Oppenheimer, D., Schiefelbein, J. and Hulskamp, M. (2005) Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development* **132**, 1477-1485.

Kirik, V., Simon, M., Huelskamp, M. and Schiefelbein, J. (2004) The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol.* **268**, 506-513.

Koornneef, M. (1981) The complex syndrome of ttg mutants. *Arabidopsis Inf. Serv.* **18**, 45–51.

Lee, M.M. and Schiefelbein, J. (1999) WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473-483.

Li, S. (2014) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. *Plant Signal Behav.* **9**, e27522.

Masucci, J.D., Rerie, W.G., Foreman, D.R., Zhang, M., Galway, M.E., Marks, M.D. and Schiefelbein, J.W. (1996) The homeobox gene GLABRA2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of Arabidopsis thaliana. *Development* **122**, 1253-1260.

Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S. and Kanellis, A.K. (2014) Genus Cistus: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem.* **2**, 35.

Payne, C.T., Zhang, F. and Lloyd, A.M. (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156**, 1349-1362.

Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jürgens, G. and Hülskamp, M. (2002) TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *EMBO J.* **21**, 5036-5046.

Schiefelbein, J., Huang, L. and Zheng, X. (2014) Regulation of epidermal cell fate in Arabidopsis roots: the importance of multiple feedback loops. *Front Plant Sci.* **5**, 47.

Schiefelbein, J., Kwak, S.H., Wieckowski, Y., Barron, C. and Bruex, A. (2009) The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **60**, 1515-1521.

Schnittger, A., Folkers, U., Schwab, B., Jurgens, G. and Hulskamp, M. (1999) Generation of a spacing pattern: the role of triptychon in trichome patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 1105–1116.

Simon, M., Bruex, A., Kainkaryam, R.M., Zheng, X., Huang, L., Woolf, P. and Schiefelbein, J. (2013) Tissue-specific profiling reveals transcriptome alterations in Arabidopsis mutants lacking morphological phenotypes. *Plant Cell* **25**, 3175-3185.

Simon, M., Lee, M.M., Lin, Y., Gish, L. and Schiefelbein, J. (2007) Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Dev Biol.* **311**, 566-578.

Szymanski, D.B., Jilk, R.A., Pollock, S.M. and Marks, M.D. (1998) Control of GL2 expression in Arabidopsis leaves and trichomes. *Development* **125**, 1161–1171.

Tominaga-Wada, R., Ishida, T. and Wada, T. (2011). New insights into the mechanism of development of Arabidopsis root hairs and trichomes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **286**, 67-106.

Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1997) Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC. *Science* **277**, 1113-1116.

Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. and Gray, J.C. (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**,1337–1350.

Wang, H. and Wang, H. (2015) The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. *Mol Plant*. **8**, 677-688.

Wang, J.W., Czech, B. and Weigel, D. (2009) miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**, 738–749.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.

Wu, G. and Poethig, R.S. (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* **133**, 3539-3547.

Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.W., Weigel, D. and Poethig, R.S. (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* **138**, 750-759.

Xing, S., Salinas, M., Höhmann, S., Berndtgen, R. and Huijser, P. (2010) miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 3935-3950.

Xu, W., Dubos, C. and Lepiniec, L. (2015) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci.* **20**, 176-185.

Yamaguchi, A., Wu, M.F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R.S. and Wagner, D. (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Dev Cell.* **17**, 268-278.

Yu, N., Cai, W.J., Wang, S., Shan, C.M., Wang, L.J. and Chen, X.Y. (2010) Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 2322–2335.

Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T. and Lloyd, A. (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development* **130**, 4859-4869.

Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E. and Lloyd, A. (2008) The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* **135**, 1991–1999.