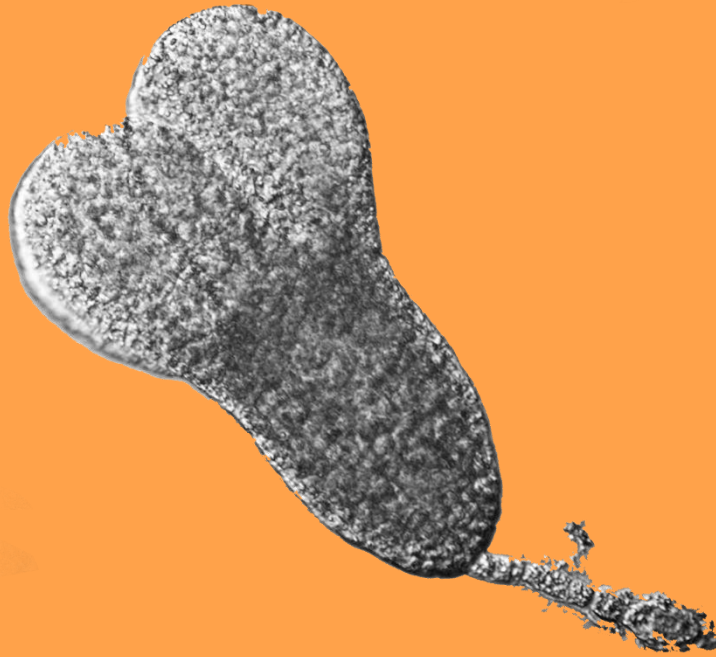


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HSP90 ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΩΝ ΣΙΝΙΑΛΩΝ  
ΣΤΟ ΦΥΤΟ *A. Thaliana***

**ΠΜΣ “ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΔΗΜΗΤΡΑ Γ. ΣΠΑΝΟΥ**

**Επ. Καθ. Δήμητρα Μηλιώνη**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

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

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HSP90 ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΩΝ ΣΙΝΙΑΛΩΝ  
ΣΤΟ ΦΥΤΟ *A. Thaliana***

**ΠΜΣ “ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΑ Γ. ΣΠΑΝΟΥ**

**Επ. Καθ. Δήμητρα Μηλιώνη**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

Η ανάθεση του θέματος της παρούσας πτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της γενικής συνέλευσης του τομέα Βιοχημείας, Ενζυμικής Τεχνολογίας, Μικροβιολογίας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας (27.11.17) κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

“Ο ρόλος των HSP90 στην αντίληψη αναπτυξιακών σιγνάλων στο φυτό *A. thaliana*”

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Δήμητρα Γ. Σπανού

Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

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





Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ. Με την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επικ. Καθηγήτρια κα Δήμητρα Μηλιώνη για την πολύπλευρη στήριξη και βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τον διευθυντή του εργαστηρίου, Καθηγητή κο Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την εμπιστοσύνη που έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας.

Επίσης ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία μας και την άψογη συμπεριφορά τους απέναντί μου. Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον φίλο και συνεργάτη Τάσο Αλατζά, για την επιμονή και υπομονή που έδειξε κατά τη συνεργασία μας και για τις σημαντικές γνώσεις που με τόση προσήλωση μου μεταλαμπάδευσε.



ПЕРІЛНУН







Οι μοριακοί συνοδοί αποτελούν σημαντικά μόρια για τη ζωή του κυττάρου, μιας και είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της σωστής διαμόρφωσης νεοσυντηθέμενων πολυπεπτιδίων. Στη φύση, απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς, σε σχετική αφθονία στα κύτταρα. Μέχρι στιγμής περισσότερες από 20 οικογένειες πρωτεϊνών έχουν χαρακτηριστεί ως μοριακοί συνοδοί, ανάμεσα στις οποίες βρίσκονται και οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες HSPs.

Ανάμεσα στις θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες, τα μέλη της υποοικογένειας των HSP90 είναι από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες ενός κυττάρου. Αποτελούν ένα σύστημα μοριακού συνοδού και συμμετέχοντας σε πλήθος κυτταρικών διαδικασιών όπως η σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η σταθεροποίηση των πρωτεϊνών ενάντια παραγόντων στρες και η αποδόμηση πρωτεϊνικών μορίων. Επιπλέον συμμετέχουν στη σταθεροποίηση συγκεκριμένου αριθμού πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δημιουργία όγκου, γεγονός που εξηγεί γιατί οι παρεμποδιστές των HSP90 έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι HSP90 ανιχνεύονται σε ποσοστό 1-2% των συνολικών πρωτεϊνών του κυττάρου ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε συνθήκες στρες αυξάνεται στο 4-6%.

Επτά μέλη της υποοικογένειας HSP90 έχουν βρεθεί στο φυτό *Arabidopsis*, τέσσερα από τα οποία είναι κυτταροπλασματικά (HSP90.1-4), ένα χλωροπλαστικό (HSP90.5), ένα μιτοχονδριακό (HSP90.6) και ένα που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (HSP90.7).

Στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου των HSP90 στην αντίληψη αναπτυξιακών σιγνάλων, στο φυτό *Arabidopsis*.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των HSP90 στην πλαστικότητα της ανάπτυξης δημιουργώντας ένα δίκτυο που υπεισέρχεται σε εύρος αναπτυξιακών μονοπατιών καθορίζοντας κάθε πτυχή του αναπτυξιακού προγράμματος (Samakovli, 2007). Επιπλέον η συμβολή των HSP90 στη μεταγωγική οδό στεροειδών ορμονών είναι ήδη γνωστή τόσο για τα φυτά όσο και για τα ζώα. Επιπρόσθετα είναι γνωστή η σημασία των ίδιων πρωτεϊνών στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των CLAVATA (προσωπικά στοιχεία).

Η παρούσα μελέτη έρχεται να συμπληρώσει και να επιβεβαιώσει προηγούμενα ευρήματα που υποδεικνύουν τη συμβολή των HSP90 πρωτεϊνών στο μονοπάτι CLAVATA-WUSCHEL μέσω του οποίου ελέγχεται η ανάπτυξη και η διατήρηση του ανθικού μεριστώματος.

Για το λόγο αυτό εξετάζεται η αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών μελών HSP90.1 και HSP90.3 με τις πρωτεΐνες CLV1, CLV2 και CRN που έχουν ρόλο υποδοχέων στο μονοπάτι CLAVATA. Παράλληλα εξετάζεται η σημασία των HSP90 στην αντίληψη του πεπτιδίου-σιγνάλου CLV3 του ίδιου μονοπατιού.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: HSP90, AMB, CLAVATA, ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ, ΣΥΜΠΛΟΚΑ**



Molecular chaperons are really important cell components as they control the proper conformation of newly synthesized polypeptides. Molecular chaperones are present in both prokaryotes and eukaryotes cells, in abundance. So far, more than 20 families have been characterized as molecular chaperones, with HSPs being among them.

HSP90 subfamily members are among the most abundant cell proteins. Having a molecular chaperone role, they are involved in a variety of cell processes, including protein folding, protein stabilization against stress conditions and protein degradation. In addition they are involved in stabilization of tumor-associated proteins, explaining why HSP90 inhibitors are of great interest as anticancer agents.

HSP90 are detected at 1-2% of total cell proteins under normal conditions, while the corresponding level is getting increased at 4-6% under stress.

Seven HSP90 members have been identified in *Arabidopsis*. Among those members there are four cytoplasmic (HSP90.1-4), a chloroplastic member (HSP90.5), a mitochondrial member (HSP90.6) and one located in endoplasmic reticulum (HSP90.7).

The purpose of the present study is the investigation of HSP90 role in developmental signals perception, in *Arabidopsis*.

Based on previous studies, HSP90 seem to have an important role in developmental plasticity creating a network that involves every developmental aspect (Samaovli, 2007). In addition, the contribution of HSP90 to steroid hormone transduction pathway is already known, both in plants and animals. It is also known the importance of HSP90 in CLAVATA signal transduction pathway.

The current study complements and confirms previous findings which suggest the contribution of HSP90 to the CLAVATA-WUSCHEL pathway through which the development of shoot apical meristem is controlled.

Thus, it is examined the interaction between cytoplasmic HSP90 members (HSP90.1 and HSP90.3) and CLV1, CLV2 and CRN proteins, which act as receptors of CLAVATA pathway. At the same time it is examined the importance of HSP90 in the perception of CLV3 signal-peptide, which is also part of CLAVATA pathway.

**KEY WORDS: HSP90, SAM, CLAVATA, SIGNAL TRANSMISSION, COMPLEXES**



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
1.1	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ (Molecular Chaperones) .....	20
1.2	ΘΕΡΜΟΕΠΙΓΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (Heat Shock Proteins, HSPs).....	24
1.2.1	smHSPs (small Heat Shock Proteins).....	27
1.2.2	HSP60 (Heat Shock Proteins 60) / Τσαπερονίνες.....	27
1.2.3	HSP70 (Heat Shock Proteins 70) / DnaK.....	28
1.2.4	HSP100 (Heat Shock Proteins 100) / Clp.....	28
1.2.5	HSP90 (Heat Shock Proteins 90).....	29
1.3	ΤΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΑ.....	34
1.3.1	ΑΚΡΑΙΟ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑ ΤΟΥ ΒΛΑΣΤΟΥ (Shoot Apical Meristem, SAM). 34	
1.4	ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CLAVATA .....	36
1.5	ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ CLAVATA-WUSCHEL .....	39
1.6	ΠΕΠΤΙΔΙΑ CLE.....	40
1.6.1	CLV3.....	40
1.7	ΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ Arabidopsis.....	42
2	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
2.1	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	48
2.1.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ .....	48
2.1.2	ΣΤΕΡΕΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ MS (Murashige and Skoog) 49	
2.1.3	ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΚΑΠΝΟΥ.....	49
2.2	Co-IP .....	50
2.3	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ .....	52
2.3.1	ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ .....	52
2.4	ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	55
2.4.1	ΧΡΩΣΗ ΜΕ Coomassie Brilliant Blue .....	55
2.5	ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western Blot) .....	56
2.5.1	ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF (Western Transfer) 56	
2.5.2	ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ .....	58
2.5.3	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ .....	59
2.5.4	ΧΡΩΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	60
2.6	ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΓΕΘΩΝ.....	61
2.7	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ pSPYNE και pSPYCE.....	62
2.8	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΑΠΟ SILIQUES ARABIDOSPIS.....	64
2.9	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕ GDA.....	64
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	66

3.1	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ <i>Arabidopsis</i> με GDA.....	68
3.2	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ CLV1, CLV2 και CLV3.....	71
3.3	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΙΣ HSP90.3 ΚΑΙ CRN.....	74
3.4	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ CLV2.....	76
3.5	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΙΣ HSP90.3 ΚΑΙ CLV2....	77
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86







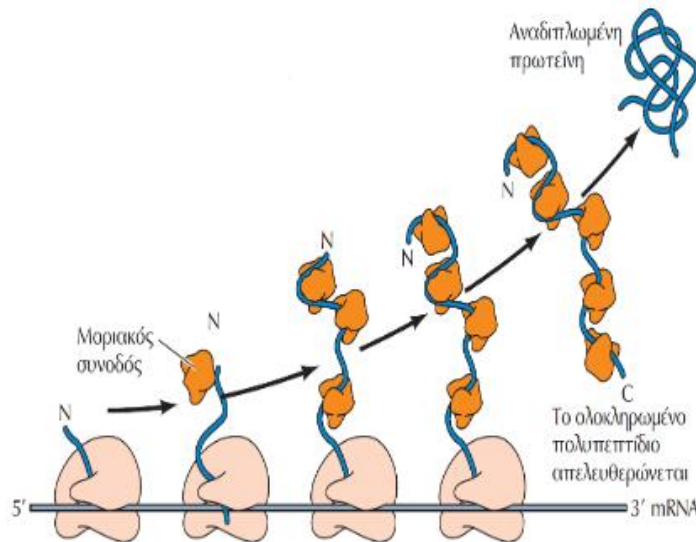
ΕΙΣΑΓΩΓΗ





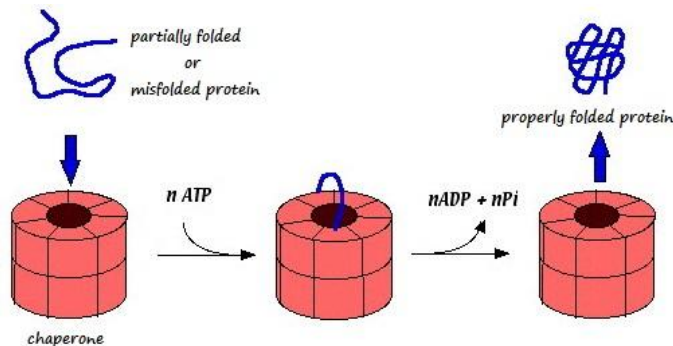
## 1.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ (Molecular Chaperones)

Τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια που απελευθερώνονται από τα ριβοσώματα, θα πρέπει να αποκτήσουν σωστή τρισδιάστατη διαμόρφωση την οποία και θα διατηρήσουν καθ' όλη τη χρονική διάρκεια ζωής τους προκειμένου να παραμείνουν βιολογικά λειτουργικά. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνουν κατά κύριο λόγο οι μοριακοί συνοδοί (**Εικόνα 1**).



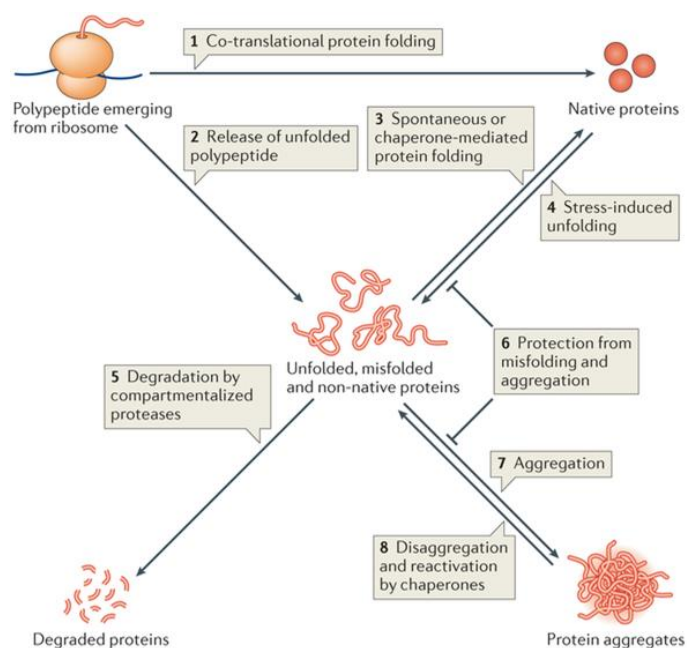
**Εικόνα 1:** Οι μοριακοί συνοδοί συνδέονται στο νεοσυντιθέμενο πολυπεπτίδιο αποτρέποντας τη λανθασμένη αναδίπλωση ή το σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων του άμινο-τελικού τμήματος του πολυπεπτιδίου, πριν ολοκληρωθεί η σύνθεσή του (Cooper and Hausman, 2000).

Ως **μοριακός συνοδός** χαρακτηρίζεται μια πρωτεΐνη που συνδέεται και σταθεροποιεί μια άλλη πρωτεΐνη, που διαφορετικά θα ήταν ασταθής, μέσω ελεγχόμενης δέσμησης και αποδέσμησης της πρωτεΐνης υποστρώματος (Liang and MacRae, 1997).



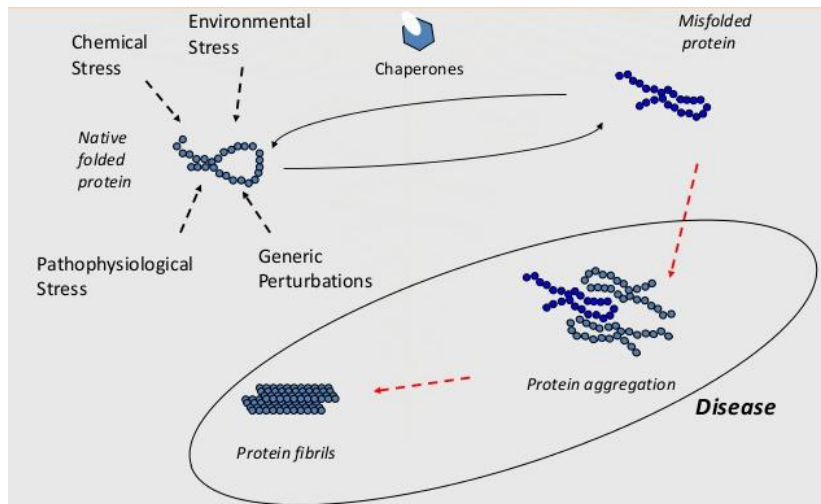
**Εικόνα 2:** Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν υδρόφοβα τμήματα των “προβληματικών” πρωτεϊνών, τα οποία είναι εκτεθειμένα. Μέσω αυτών των τμημάτων συνδέονται με τις πρωτεΐνες και συμβάλλουν στη σωστή αναδίπλωσή τους, αποτρέποντας την αποικοδόμησή τους.

Οι μοριακοί συνοδοί και οι πρωτεάσες, αποτελούν τα δύο είδη μορίων που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της δομής και της λειτουργικότητας των πολυπεπτιδίων. Η δράση τους οφείλεται κυρίως στην ικανότητα τόσο των μοριακών συνοδών όσο και των πρωτεασών, να αναγνωρίζουν εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές των λάθος-αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων (Wickner *et al.*, 1999).



**Εικόνα 3:** Σύστημα ελέγχου της δομής των πρωτεϊνών. Το δίκτυο ελέγχου των της ποιότητας και της δομής των πρωτεϊνών συνδυάζει τις δράσεις πολλών τσαπερονίων στοχεύοντας στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, αποτρέποντας τη λάθος αναδίπλωση και επιδιορθώνοντας τις λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Doyle *et al.*, 2013).

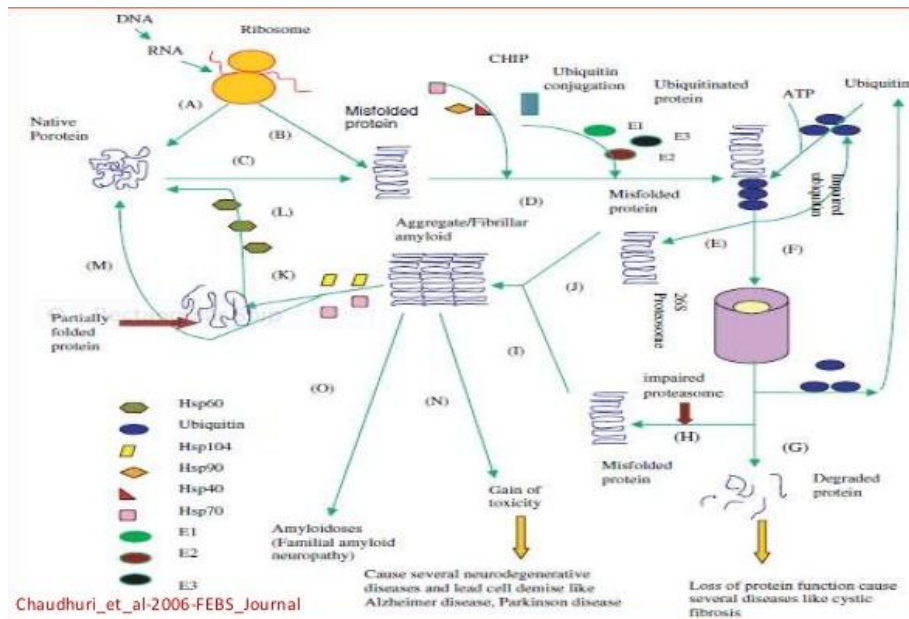
Από τη μία οι μοριακοί συνοδοί προάγουν την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών αποτρέποντας έτσι τη συσσώρευση των μη επιθυμητών, λάθος-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Από την άλλη, οι ενεργειακά-εξαρτώμενες πρωτεάσες εξαλείφουν τα πολυπεπτιδία που έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη καταστροφή. Σε περίπτωση αδυναμίας δράσης των δύο αυτών μηχανισμών οι κατεστραμμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα τα οποία σχετίζονται με την πρόκληση διάφορων ασθενειών (αμυλοειδείς ασθένειες) (Wickner *et al.*, 1999).



**Εικόνα 4:** Αλλαγές στη διαμόρφωση ενός πολυπεπτιδίου μπορεί να είναι επιβλαβείς για το κύτταρο. Η συσσώρευση περίσσειας ποσότητας τέτοιων πρωτεϊνών λόγω αυξημένης παραγωγής ή δυσλειτουργίας των μοριακών συνοδών μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό ινιδίων που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση ασθενειών οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν και στον κυτταρικό θάνατο .

Οι μοριακοί συνοδοί βρίσκονται σε αφθονία στα κύτταρα, τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, αν και στους ευκαρυώτες είναι πολυπληθέστεροι, παρουσιάζοντας υψηλό βαθμό ομολογίας. Επιπλέον στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: **(α)** μοριακοί συνοδοί που είναι ενεργοί σε συνθήκες καταπόνησης και **(β)** μοριακοί συνοδοί που σχετίζονται με την παραγωγή και ωρίμανση νέων πρωτεϊνών (Albanese *et al.*, 2006).

Οι μοριακοί συνοδοί συνεισφέρουν σημαντικά στην ομοιοστάση των κυττάρων, τόσο σε αντίξοες όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες, και αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες-στόχους συμμετέχουν σε πλήθος ενδοκυτταρικών λειτουργιών όπως: **(α)** η *de novo* αναδίπλωση πολυπεπτιδίων (Boston *et al.*, 1996; Hartl, 2002), **(β)** η επαναδίπλωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, λόγω καταπονήσεων (Nollen and Morimoto, 2002), **(γ)** η μεταφορά πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια διά μέσω των μεμβρανών (Boston *et al.*, 1996; Rapoport, 2007), **(δ)** η πρωτεολυτική αποδόμηση ορισμένων πρωτεϊνών (Karschinski, 2004).



**Εικόνα 5:** Η μοίρα των λάθος αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων. Το νεοσυντιθέμενο πολυπεπτιδίο μετατρέπεται σε αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες προκαλούν στρες στο κύτταρο με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να αποκτήσει λάθος αναδίπλωση. Οι πρωτεΐνες HSP40, HSP70 και HSP90 είναι αυτές που δε πρώτο στάδιο θα οδηγήσουν την πρωτεΐνη στο πρωτεάσωμα. Σε επόμενο στάδιο γίνεται ουβικουιτίνωση του πολυπεπτιδίου με τη βοήθεια ενζύμων. Αδυναμία των δύο αυτών μηχανισμών οδηγεί σε συσσωμάτωση της πρωτεΐνης, μόρια των HSP100 διασπών το συσσωμάτωμα και δημιουργούν με τη βοήθεια των HSP70 μερικώς αναδιπλωμένα μονομερή. Η δράση των HSP60 οδηγεί την πρωτεΐνη στο να αποκτήσει τη σωστή της αναδίπλωση. Συσσώρευση των συσσωματωμάτων και των ινιδίων που σχηματίζονται είναι τοξικά για το κύτταρο και οδηγούν στην εμφάνιση ασθενειών ή/και θάνατο (Chaudhuri *et al.*, 2006).

Περισσότερες από 20 οικογένειες έχουν χαρακτηριστεί ως “μοριακοί συνοδοί”, ανάμεσα στις οποίες βρίσκονται και οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες HSPs. Κάθε οικογένεια αναγνωρίζει ποικίλες ενδιάμεσες καταστάσεις πολυπεπτιδίων με μη επιθυμητή διαμόρφωση και οι μηχανισμοί σύνδεσης-αλληλεπίδρασης των μοριακών συνοδών με τις πρωτεΐνες-πελάτες (client proteins) διαφέρουν για κάθε οικογένεια και τη χαρακτηρίζουν.

## 1.2 ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (Heat Shock Proteins, HSPs)

Όλοι οι ευκαρυωτικοί και προκαρυωτικοί οργανισμοί, αναπτύσσονται και εξελίσσονται σε ένα περιβάλλον που μεταβάλλεται συνεχώς. Οι συνεχόμενες αυτές μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών, ασκούν πίεση στους οργανισμούς αναγκάζοντάς τους να αναπτύξουν μηχανισμούς προσαρμογής, που συνοδεύονται με μορφολογικές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μοριακές αλλαγές, για να επιβιώσουν.

Οι πιέσεις που δέχονται οι οργανισμοί αφορούν τόσο βιοτικούς (π.χ. μολύνσεις από παθογόνα) όσο και αβιοτικούς παράγοντες (π.χ. αντίξοες θερμοκρασίες, έλλειψη ύδατος κ.α.). Από τους παραπάνω παράγοντες οι αβιοτικοί είναι και οι πιο σημαντικοί καθώς προκαλούν αποδιάταξη της δομής διάφορων πρωτεϊνών και δυσλειτουργία τους (Wang *et al.*, 2004).

Οποιαδήποτε διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου καλείται κυτταρικό στρες. Ο μηχανισμός προσαρμογής του κυττάρου που επάγεται κατά το θερμικό στρες είναι από τους πιο μελετημένους και αποτελεί ένα σηματοδοτικό μηχανισμό που συντελεί στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου κάτω από συνθήκες στρες. Η απόκριση στο θερμικό στρες είναι μια υψηλά συντηρημένη κυτταρική διαδικασία ανάμεσα στους οργανισμούς. Από τις σημαντικότερες αλλαγές που παρατηρούνται στη δραστηριότητα και τη φυσιολογία του κυττάρου κατά την απόκριση στο θερμικό στρες είναι η επαγωγή της έκφρασης των HSPs. Η αυξημένη έκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη και προστατεύει τους οργανισμούς από τις αντίξοες για την επιβίωση θερμοκρασίες ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην προστασία τους από τις βλάβες που οι θερμοκρασίες αυτές προκαλούν.

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (HSPs) ή πρωτεΐνες καταπόνησης, αποτελούν μια ομάδα υψηλά συντηρημένων πρωτεϊνών ανάμεσα σε απομακρυσμένα εξελικτικά είδη, οι οποίες είναι παρούσες σε όλους τους οργανισμούς και όλα τα κύτταρά τους (Lindquist, 1986). Η έκφρασή τους αρχικά συνδέθηκε με τη θερμική καταπόνηση, όπως φαίνεται και από το όνομά τους, όμως αργότερα έγινε γνωστό ότι η σύνθεσή τους επάγεται κάτω από μεγάλο εύρος παραγόντων καταπόνησης όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες, η παρουσία χημικών ουσιών που προκαλούν αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, η υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων κ.α.

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν εντοπιστεί μέλη της οικογένειας των HSP έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές είτε εκφράζονται συνεχώς είτε επάγονται από την επίδραση κάποιου στρεσογόνου παράγοντα (Morimoto, 1998). Το γεγονός αυτό βέβαια δε σημαίνει πως το περιβάλλον που δημιουργείται κατά την επαγωγή της έκφρασής τους είναι ιδανικό για το κύτταρο και τον οργανισμό, αντιθέτως η αυξημένη παραγωγή τους μπορεί να καταστεί τοξική. Έτσι, οι οργανισμοί διαθέτουν ένα μηχανισμό αυτορρύθμισης της παραγόμενης ποσότητας των πρωτεϊνών “πίεσης” (Kalmar and Greensmith, 2009).

Η αυξημένη συγκέντρωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών λόγω του θερμικού στρες φαίνεται να αποτελεί το εναρκτήριο μήνυμα για την παραγωγή HSPs. Η παραγωγή των HSPs συμβάλλει στην απόκτηση ανθεκτικότητας των οργανισμών στο θερμικό στρες (θερμοανθεκτικότητα) προάγοντας έτσι την ανάπτυξή τους και οδηγώντας στην



εξισορρόπηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Εκτός από τη θερμοανθεκτικότητα, οι HSPs προσδίδουν ανθεκτικότητα και σε άλλες συνθήκες καταπόνησης όπως για παράδειγμα η έλλειψη νερού, η υψηλή αλατότητα κ.α.

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, 1998). Η ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις HSPs γίνεται μέσω ενός μηχανισμού που οδηγεί άμεσα σε παραγωγή των πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως τα πρώτα μεταγραφήματα εμφανίζονται περίπου ένα λεπτό μετά το πρώτο επαγωγικό ερέθισμα (Pirkkala *et al.*, 2001).

Η παρουσία των HSP έχει ταυτοποιηθεί τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ανάλογα με το μοριακό τους βάρος ταξινομούνται σε υποοικογένειες όπως φαίνεται παρακάτω (**Πίνακας 1**):

#### ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ HSP

ΟΝΟΜΑ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (kDa)
HSP100	80-115
HSP90	82-96
HSP70	67-76
HSP60	58-65
smHSPs	12-40

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση των HSPs πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Η κάθε οικογένεια αναγνωρίζει συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ανώριμη, ασταθή ή και κατεστραμμένη κατάσταση.

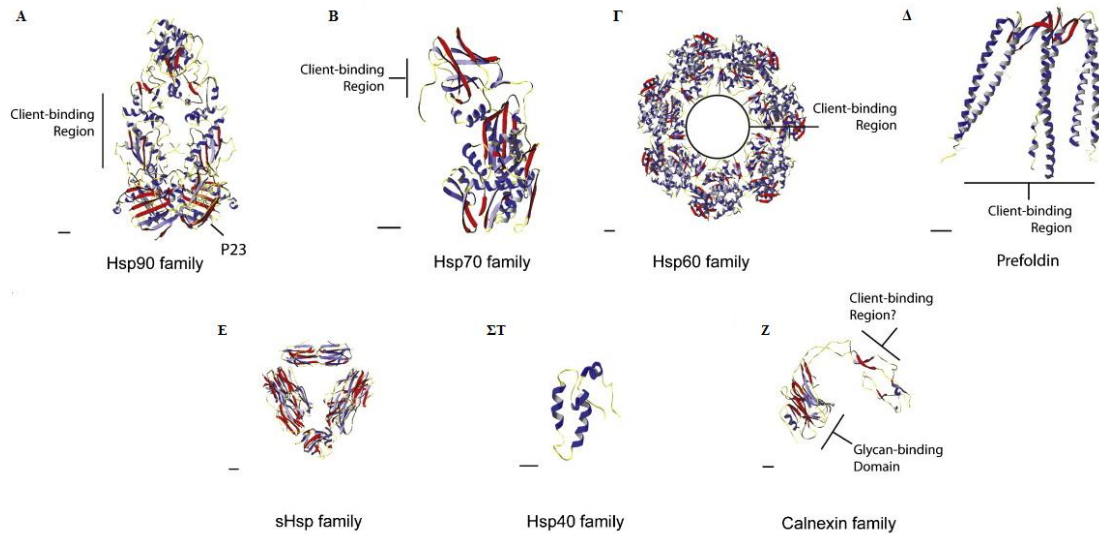
Οι οικογένειες των HSP60, HSP70 και HSP90 εκτός από τη συνεχή τους συμμετοχή στην αναδίπλωση και ωρίμανση των πρωτεϊνών, κατέχουν σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της φαινοτυπικής ποικιλότητας. Από την άλλη, οι μικρές HSPs και οι HSP100 κυρίως εμπλέκονται στην επανάκτηση των πρωτεϊνών μετά από καταστάσεις καταπόνησης (Rutherford, 2003).

Αν και κωδικοποιούνται από πυρηνικά κυρίως γονίδια εντοπίζονται σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες, αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο κλπ) (Wang *et al.*, 2004).

Ως προς το πρότυπο έκφρασής τους ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: **(α)** σε αυτές που εκφράζονται συστατικά και **(β)** σε αυτές που εκφράζονται σε συνθήκες καταπόνησης

Ως μοριακοί συνοδοί, οι HSP διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών, στο σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, στη μεταφορά πρωτεϊνών στα κατάλληλα υποκυτταρικά διαμερίσματα, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών και στην προστασία των κυττάρων από τους παράγοντες στρες.

Οι HSPs συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου τόσο σε συνθήκες καταπόνησης, όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες.



**Εικόνα 6:** Οι διαφορετικές δομικές καταστάσεις των κύριων οικογενειών μοριακών συνοδών, ως προς το σημείο πρόσδεσης των client πρωτεϊνών. Οι διαφορετικές οικογένειες μοριακών συνοδών αλληλεπιδρούν με τα πολυπεπίδια που αναγνωρίζουν, μέσω διαφορετικών τρόπων σύνδεσης (Kosmaoglou *et al.*, 2008).

Chaperone Family	Topology of Binding	Co-chaperone	Known Function
Hsp100		CipP, SepB, Hsp70, Hsp40	<ul style="list-style-type: none"> <li>Works with DnaK in ATP-dependent disaggregation and proteolysis</li> <li>Prevents aggregation, degradation and turnover of unassembled mitochondrial proteins</li> <li>Reactivates heat-damaged proteins</li> <li>Establishes and maintains prion phenotype in yeast</li> </ul>
Hsp90		Hop, Hip, Hsp70, Immunophilins, Grp78	<ul style="list-style-type: none"> <li>Refolds proteins in stressed cells. Probable secretory chaperone in prokaryotes</li> <li>Major cytosolic chaperone in eukaryotes</li> <li>Cytoprotection and intracellular signaling</li> <li>In ER, controls protein homeostasis, folding and assembly of secretory proteins</li> </ul>
Hsp70		Hsp40, GrpE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ubiquitous Principal folding chaperone</li> <li>Works with CipB as disaggregase</li> <li>Folding of newly synthesized proteins</li> <li>Protein transport into ER and mitochondria</li> </ul>
Hsp60 (Group I)		Hsp10	<ul style="list-style-type: none"> <li>Major chaperone for protein folding in prokaryotes</li> <li>Stabilizes proteins during heat stress</li> <li>Promotes folding of over-produced proteins</li> <li>Major chaperone in mitochondria and chloroplast</li> </ul>
Hsp60 (Group II)		Prefoldin/GimC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promotes folding of a cytosolic proteins in eukaryotes</li> <li>Refolding of unfolded polypeptides in vitro</li> </ul>
sHsps		-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stabilizes unfolded polypeptides</li> <li>Prevents aggregation</li> <li>Works with Hsp70 in protein refolding</li> <li>Structural protein of eye lens</li> </ul>

**Εικόνα 7:** Χαρακτηριστικά των διαφορετικών μηχανισμών τσαπερονίων. Οι μοριακοί συνοδοί ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθός τους. Οι πρωτεΐνες HSP100 σχηματίζουν εξαμερή τα οποία δρουν κυρίως σε πρωτεΐνες με λάθος αναδίπλωση και σε συνεργασία με άλλα μόρια όπως οι HSP70, προάγουν είτε τη σωστή αναδίπλωση είτε την αποδόμηση των πρωτεϊνών αυτών. Τα μέλη των HSP90 σχηματίζουν διμερή και με τη βοήθεια του ATP υφίστανται αλλαγή στην διαμόρφωσή τους, προάγοντας τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών που προσδένονται σε αυτές (Kumar *et al.*, 2015).

### 1.2.1 smHSPs (small Heat Shock Proteins)

Οι smHSPs συνιστούν την υποοικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 15-40 kDa και μέλη της έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί, από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο (de Jong *et al.*, 1998). Στη φύση απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς κυρίως ως απόκριση σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις ενώ εκφράζονται και υπό φυσιολογικές συνθήκες σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Waters *et al.*, 1996). Πρόκειται για τη λιγότερο συντηρημένη και την πιο ασαφή λειτουργικά κατηγορία θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Vierling, 1991), με το ποσοστό ομολογίας σε αμινοξικό επίπεδο να ανέρχεται στο 20-30%, ανάμεσα στα μέλη.

Όλες οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής απαντώνται με τη μορφή πολυμερών τα οποία συγκροτούνται από 9-40 μονομερή, ανάλογα με τον οργανισμό και έχουν μοριακό βάρος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 149 και 800 KDa.

Τα πρωτεϊνικά μέλη της οικογένειας smHSPs δεν είναι ικανά από μόνα τους να επάγουν τη σωστή αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Ehrensperger *et al.*, 1997). Λειτουργούν όμως σαν συν-τσαπερόνια και συνδέονται με μετουσιωμένες πρωτεΐνες, μέσω αλληλεπίδρασης των υδρόφοβων περιοχών, παρεμποδίζοντας τη συσσώρευσή τους, ενώ παράλληλα διευκολύνουν τη σωστή αναδίπλωσή τους με βοήθεια κάποιου ATP-εξαρτώμενου συστήματος τσαπερονίων, όπως το DnaK (HSP70) σύστημα.

### 1.2.2 HSP60 (Heat Shock Proteins 60) / Τσαπερονίνες

Τα μέλη της οικογένειας HSP60 είναι πρωτεϊνικά μόρια μοριακού βάρους περίπου 60kDa και εντοπίζονται (**α**) στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, στη μήτρα των μιτοχονδρίων (μιτοχονδριακή Cnp60) και στο στρώμα των χλωροπλαστών (πλαστιδιακή Cnp60) και (**β**) στο κυτταρόπλασμα του *E.coli* (GroEL) (Parsell and Lindquist, 1993). Ανιχνεύονται τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε μη φυσιολογικές όπου συντελούν στην απόκτηση της σωστής διαμόρφωσης νεοσυντιθέμενων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

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). Χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών αυτών αποτελεί η απευθείας αλληλεπίδρασή τους με τα πολυπεπίδια-υποστρώματα.

### 1.2.3 HSP70 (Heat Shock Proteins 70) / DnaK

Η οικογένεια αυτή ανήκει στις πιο συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών, τα μέλη της οποίας έχουν μοριακό βάρος 70kDa περίπου. Είναι μια από τις σημαντικότερες οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ για τους περισσότερους οργανισμούς. Μέλη της HSP70 οικογένειας έχουν ανιχνευθεί σε όλους τους οργανισμούς. Εντοπίζονται σε διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια και συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (πρωτεΐνη BiP) και στον πυρήνα. Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές είναι αποκλειστικά συστατικά του οργανιδίου του πυρήνα, ενώ άλλες κατανέμονται μεταξύ οργανιδίων και κυτταροπλάσματος. 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). Το ποσοστό ομολογίας των ευκαρυωτικών μελών κυμαίνεται μεταξύ 50% και 98%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ανάμεσα σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά μέλη ανέρχεται σε 50% (Craig *et al.*, 1993).

Ανάμεσα στις λειτουργίες τους συμπεριλαμβάνονται η παρεμπόδιση δημιουργίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, η μεταφορά πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα, η συγκρότηση των ριβοσωμάτων και η συμμετοχή στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Συνεπώς έχουν δράση “μοριακών συνοδών” σε διαδικασίες όπως η μετάφραση, η μετατόπιση, η αναδίπλωση και ο ποιοτικός έλεγχος σε φυσιολογικές αλλά και μη φυσιολογικές συνθήκες (Becker and Craig, 1994; Schlesinger, 1990). Ως “μοριακοί συνοδοί” σε συνθήκες καταπόνησης βοηθούν στην παρεμπόδιση της συσσώρευσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών καθώς και στην ορθή αναδίπλωση κακώς αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες συμβάλλουν στην ορθή αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, στην μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου των μεμβρανών, στην αποσυγκρότηση ολιγομερών πρωτεϊνικών δομών, στην αποικοδόμηση μετουσιωμένων πρωτεϊνών και σε μερικές περιπτώσεις στον έλεγχο της βιολογικής δραστηριότητας ρυθμιστικών πρωτεϊνών όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες (Bukau and Horwich, 1998).

### 1.2.4 HSP100 (Heat Shock Proteins 100) / Clp

Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι πρωτεϊνικά μόρια μεγέθους 78-100kDa συνήθως. Το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του τμήματος που συνδέει τις συντηρημένες περιοχές αλλά και ανάλογα το μέγεθος των άμινο-τελικών και καρβόξυ-τελικών τους άκρων (Nover and Scharf, 1997). Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεϊνών της HSP100 οικογένειας αποτελεί η παρουσία δύο συντηρημένων περιοχών μεγέθους 200 περίπου αμινοξέων οι οποίες περιβάλλουν μια θέση δέσμευσης για το ATP. Ανάλογα με τις θέσεις πρόσδεσης νουκλεοτιδίων που διαθέτουν (μία ή δύο), οι HSP100 κατηγοριοποιούνται σε δύο αντίστοιχες ομάδες.

Σε γενικές γραμμές η παρουσία των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι απαραίτητη παρά μόνο κάτω από συνθήκες σοβαρού θερμικού στρες, όπου είναι σημαντικές για την επιβίωση του κυττάρου (Sanchez *et al.*, 1992). Μέλη της οικογένειας HSP100 έχουν απομονωθεί από μύκητες, βακτήρια, φυτά και ζώα.

Συμμετέχουν σε πλήθος διαδικασιών όπως: (α) η αναδίπλωση πρωτεϊνών, (β) η αποικοδόμηση πρωτεϊνών, (γ) η αντιγραφή του DNA, (δ) η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων και (ε) η μεταφορά πρωτεϊνών διά μέσω των μεμβρανών.

Η έκφραση αυτών των πρωτεϊνικών μορίων φαίνεται να ακολουθεί συγκεκριμένα αναπτυξιακά και ιστοειδικά πρότυπα. Ταυτόχρονα όμως επάγεται από διάφορες συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης όπως η αλατότητα, οι αυξημένες θερμοκρασίες, το ψύχος και οι επιδράσεις βαρέων μετάλλων (Schirmer *et al.*, 1994). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχει δειχθεί πως τα μέλη της οικογένειας HSP100 εμπλέκονται άμεσα στον μηχανισμό θερμοανθεκτικότητας (Queitsch *et al.*, 2000).

### 1.2.5 HSP90 (Heat Shock Proteins 90)

Οι HSP90 συνιστούν μια οικογένεια υψηλά συντηρημένων πρωτεϊνών, το μοριακό βάρος των οποίων κυμαίνεται από 82 kDa έως 96 kDa, και απαντώνται σε όλα τα είδη των οργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Το ποσοστό ομολογίας τους σε επίπεδο αμινοξέων φτάνει το 70% στα μέλη των ευκαρυωτικών οργανισμών ενώ η ομοιότητα των μελών ανάμεσα σε ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι της τάξης του 40%. Σε ορισμένα μέλη της οικογένειας η έκφρασή τους ανιχνεύεται συνεχώς και σε φυσιολογικές συνθήκες ενώ η έκφραση κάποιων μελών ανιχνεύεται μόνο σε συνθήκες στρες. Οι HSP90 βρίσκονται στα κύτταρα σε σχετική αφθονία, και σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης αποτελούν το 1-2% των συνολικών διαλυτών κυτταρικών συστατικών (Buchner, 1999 ; Frydman, 2001).

Η σημασία τους για τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μεγάλη γιατί κατέχουν ρόλους «κλειδιά» και συμμετέχουν στην αναδίπλωση και την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταγωγή σημάτων και ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο (Krishna *et al.*, 2001). Ωστόσο, σε αντίθεση με την υποοικογένεια HSP70, οι πρωτεΐνες της υποοικογένειας HSP90 δεν εμπλέκονται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών στα αρχικά τους στάδια (Nathan *et al.*, 1997). Τα μέλη της HSP90 διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα τσαπερόνια γιατί τα περισσότερα υποστρώματά τους είναι πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, όπως οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών και οι πρωτεΐνες τύπου κινασών (Picard *et al.*, 1990 ; Xu and Lindquist, 1993). Είναι επίσης απαραίτητα για τη διατήρηση της δραστηριότητας πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων και στην επικοινωνία ανάμεσα στα κύτταρα. Σε μοριακό επίπεδο οι πρωτεΐνες της υποοικογένειας HSP90 προσδένονται σε πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο αναδίπλωσης και είναι έτοιμες για ενεργοποίηση ή αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες (Jacob *et al.*, 1995).

Αν και η έκφρασή τους αυξάνεται υπό συνθήκες στρες, πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν πως η παρουσία τους είναι απαραίτητη για το κύτταρο και την επιβίωσή του, ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες (Sangster *et al.*, 2004). Επιπλέον, η έκφρασή τους έχει συνδεθεί, εκτός από τους διάφορους στρεσογόνους

παράγοντες, με καρκινικούς όγκους διάφορων ειδών όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παγκρέατος κ.α. (Csermely, 1998).

Γονίδια των HSP90 πρωτεϊνών έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη όπως τα: *Solanum lycopersicum* (κοιν. τομάτα), *Brassica napus* (κοιν. ελαιοκράμβη), *Zea mays* (κοιν. καλαμπόκι), *Secale cereale* (κοιν. σίκαλη), *Arabidopsis thaliana* κ.α. Σύγκριση αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ φυτικών και ζωικών ομολόγων έδειξε ομοιότητα που κυμαίνεται ανάμεσα σε 63% και 71%, ενώ η ομοιότητα μεταξύ ομολόγων διαφορετικών φυτικών ειδών κυμαίνεται ανάμεσα σε 88% και 93%.

Στο φυτό *A. thaliana* η πολυγονιδιακή οικογένεια HSP90 αποτελείται από επτά μέλη (Πίνακας 2): τέσσερα κυτταροπλασματικά (HSP90.1, HSP90.2, HSP90.3, HSP90.4), ένα χλωροπλαστικό (HSP90.5), ένα μιτοχονδριακό (HSP90.6) και ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (HSP90.7) (Krishna and Gloor, 2001).

HSP90			
ΜΕΛΟΣ HSP90	ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ	ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ
HSP90.1 (AT5G52640)	Κυτταρόπλασμα/Πυρήνας	705	V
HSP90.2 (AT5G56010)	Κυτταρόπλασμα/Πυρήνας	699	V
HSP90.3 (AT5G56030)	Κυτταρόπλασμα/Πυρήνας	699	V
HSP90.4 (AT5G56000)	Κυτταρόπλασμα/Πυρήνας	699	V
HSP90.5 (AT2G04030)	Χλωροπλάστης	780	II
HSP90.6 (AT3G07770)	Μιτοχόνδριο	803	III
HSP90.7 (AT4G24190)	Ενδοπλασματικό Δίκτυο	823	IV

Πίνακας 2: Τα μέλη των HSP90 στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*.

### 1.2.5.1 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ HSP90 ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *A. thaliana*

Έχει βρεθεί ότι τα κυτταροπλασματικά μέλη την οικογένειας, στο φυτό *A. thaliana*, εμφανίζουν μεταξύ τους ποσοστό ομολογίας της τάξης του 85% σε αμινοξικό επίπεδο. Το αντίστοιχο ποσοστό για τα οργανιδιακά μέλη της οικογένειας είναι της τάξης του 45% (Krishna and Gloor, 2001). (Πίνακας 3)

HSP90							
	HSP90.1	HSP90.2	HSP90.3	HSP90.4	HSP90.5	HSP90.6	HSP90.7
HSP90.1	100	88	85	87	49	48	53
HSP90.2		100	96	97	48	46	52
HSP90.3			100	96	47	45	51
HSP90.4				100	48	46	52
HSP90.5					100	68	48
HSP90.6						100	49
HSP90.7							100

Πίνακας 3: Ποσοστό % ομολογίας σε αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των μελών της HSP90.

Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας των κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας πιθανώς οδηγεί σε αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες των μελών, χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί μέσω της μελέτης T-DNA μεταλλαγμάτων για κάθε ένα από τα τέσσερα μέλη (Samakovli *et al.*, 2007).

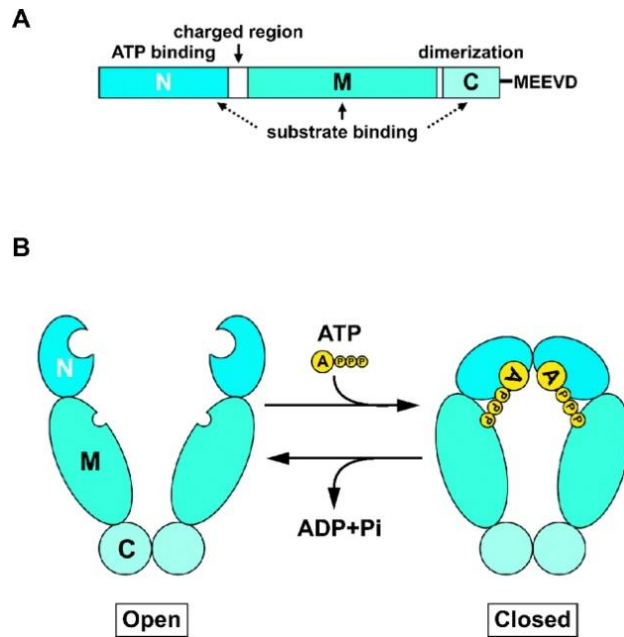
Μελέτη του πρότυπου έκφρασης των γονιδίων HSP90 στο φυτό *Arabidopsis thaliana* υπέδειξε επαγωγή της έκφρασής τους από θερμικό στρες ή εφαρμογή αρσενικού (Miloni and Hatzopoulos, 1997).

Επιπλέον η έκφραση των HSP90 εντοπίζεται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, π.χ. κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Marrs *et al.*, 1993), κατά τη φύτευση του σπόρου (Reddy *et al.*, 1998) ή κατά την ανάπτυξη της γύρης (Haralampidis *et al.*, 2002), αλλά και σε διαφορετικά μέρη του φυτού, π.χ. στις μεριστωματικές ζώνες του βλαστού και της ρίζας (Koning *et al.*, 1992) και στα άνθη (Krishna *et al.*, 1995).

#### **1.2.5.2 Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ HSP90 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

Οι εξελικτικά συντηρημένες αμινοξικές αλληλουχίες αλλά και μελέτες από πρωτεόλυσης υπέδειξαν την παρουσία τριών δομικών περιοχών στις HSP90 πρωτεΐνες. Δομικά, οι HSP90 απαντούν σε ομοδιμερή και κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις ευέλικτες περιοχές: (**α**) το άμινο-άκρο (N), το οποίο έχει ρόλο ATPάσης και μέγεθος 25kDa, (**β**) τη μεσαία δομή (M), με σημαντικό ρόλο για την πρόσδεση πρωτεϊνών, μεγέθους 40kDa και (**γ**) το καρβόξυ-άκρο(C), ένα διμερές, μεγέθους 12kDa (Caplan, 1999).

Με εξαίρεση τις HtpG (*E. coli*) και TRAP1 (άνθρωπος), το άμινο-άκρο και η μεσαία περιοχή συνδέονται με μεταξύ τους με έναν φορτισμένο σύνδεσμο. Η περιοχή αυτή, του φορτισμένου συνδέσμου διαφοροποιείται ανάμεσα στα είδη τόσο σε μέγεθος όσο και σε σύσταση. Στη ξύμη η περιοχή, αυτή, είναι ουσιαστικά για τη ζωτικότητα του κυττάρου (Lounion *et al.*, 1996). Επιπλέον χαρακτηριστικό των κυτταροπλασματικών μελών της HSP90 αποτελεί η παρουσία του συντηρημένου πενταπεπτιδίου MEEVD στο καρβόξυ-άκρο. Το πενταπεπτίδιο MEEVD αποτελεί σημείο πρόσδεσης των TRP επαναλαμβανόμενων περιοχών (TRP repeats) οι οποίες απαντώνται σε πολλά συνταπερόνια που αποτελούν βοηθούς των μοριακών συνοδών (Pratt *et al.*, 2004). Το συντηρημένο πενταπεπτίδιο, MEEVD αποτελεί χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο και των πρωτεϊνών της HSP70 υποοικογένειας (Lindquist and Graig, 1988). **(Εικόνα 8Α)**



**Εικόνα 8** Α. Η άμινο-τελική περιοχή του μορίου περιέχει τη θέση πρόσδεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) καθώς και του αναστολέα τζελνταμυκίνη (GDA). Έχει επίσης συνδεθεί και με τη δέσμευση άλλων υποστρωμάτων (Prodromou *et al.*, 1997). Η κεντρική περιοχή αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος πρόσδεσης των πρωτεϊνών-πελατών (client proteins). Τέλος η καρβόξυ-τελική περιοχή αποτελεί την περιοχή διμερισμού, ενώ το πενταπεπτίδιο MEEVD είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με βοηθητικά συνοδά μόρια (Chen and Smith, 1998). Β. Ανοιχτή και Κλειστή μορφή των διμερών μορίων.

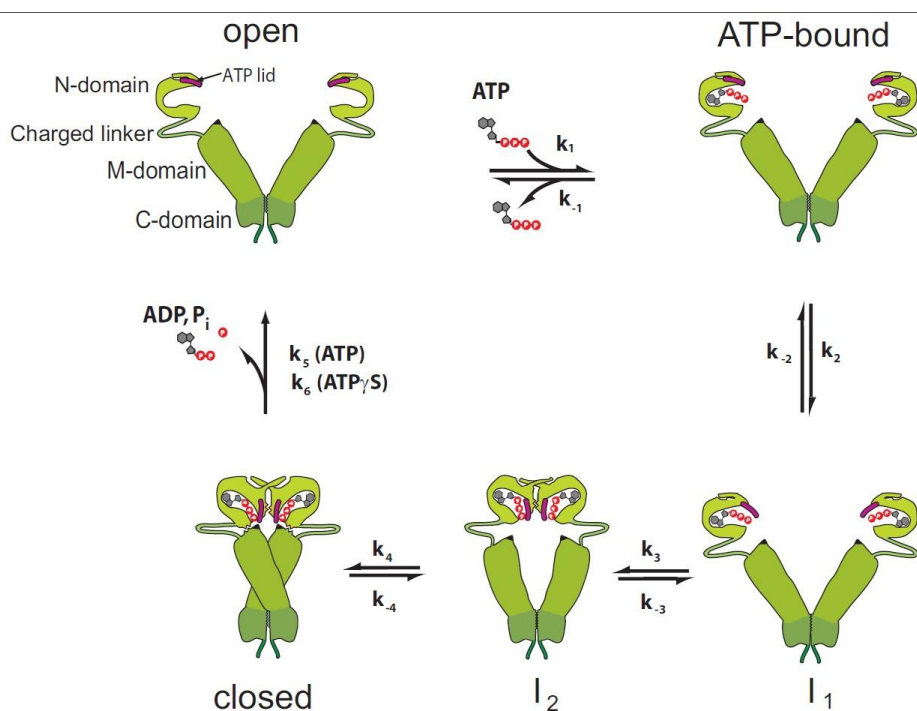
Προκειμένου η ώριμη HSP90 πρωτεΐνη να καταστεί λειτουργική σχηματίζει ένα διμερές μόριο. Ο διμερισμός πραγματοποιείται με τη σύνδεση των καρβόξυ-τελικών άκρων δύο HSP90 πολυπεπτιδικών αλυσίδων και σχηματίζεται ένα επιμήκες μόριο. Τα άμινο-τελικά άκρα έχουν αντίθετες κατευθύνσεις ενώ σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης έρχονται κοντά, προκαλώντας δομικές αλλαγές στο εύκαμπτο μόριο, και δημιουργώντας τριγωνικές δομές (Buchner, 1999). Η παροδική ένωση των δύο άμινο-τελικών περιοχών έχει δείχθει ότι αποτελεί μια ATP-εξαρτώμενη διαδικασία (Prodromou *et al.*, 2000). Η δημιουργία του διμερούς μορίου είναι απαραίτητη για τη βιολογική του δράση. (**Εικόνα 8B**)

Κρυσταλλογραφικές αναλύσεις έδειξαν την ύπαρξη μιας θέσης πρόσδεσης ATP στην αμινοτελική, περιοχή, η οποία ταυτόχρονα εξυπηρετεί και στη σύνδεση της τζελνταμυκίνης (GDA), παρεμποδιστή των HSP90. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε προβληματική, σύνδεση, του ATP στην περιοχή, αυτή, ακυρώνουν τη δράση των HSP90 *in vivo* και *in vitro* (Panaretou *et al.*, 1998 ; Obermann *et al.*, 1998, Grenet *et al.*, 1999).

Εκτιμάται πως οι ενδιάμεσες καταστάσεις που αντιστοιχούν στα στάδια του κύκλου του ATP του συστήματος μοριακού συνοδού HSP90 είναι πέντε (**Εικόνα 9**). Με την πρόσδεση του ATP στο ανοιχτό διμερές, η περιοχή lid περιστρέφεται κατά 120° με αποτέλεσμα να “σκεπάσει” την περιοχή πρόσδεσης του ATP. Εν συνεχεία η αλλαγή της χωροθέτησης της lid περιοχής προκαλεί την ανταλλαγή των άμινο-τελικών β-αλυσίδων κάθε μονομερούς με αποτέλεσμα να δημιουργείται η ένωση των άμινο-τελικών περιοχών. Ο διμερισμός των άμινο-τελικών περιοχών ακολουθείται από επιπλέον αλλαγές στη διαμόρφωση και οδηγεί στο σχηματισμό μιας συμπίεσμένης



σπειροειδούς δομής (Ali *et al.*, 2006). Στο στάδιο αυτό ο καταλυτικός βρόγχος της κεντρικής περιοχής αλληλεπιδρά με τη lid περιοχή. Η αλληλεπίδραση αυτή επιτρέπει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ενεργή περιοχή (Arg380) και στη γ-φωσφορική ομάδα του ATP. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την υδρόλυση του β-γ-φωσφοδιεστερικού δεσμού του ATP η οποία οδηγεί στην επαναφορά του μορίου στην ανοιχτή διαμόρφωση όπου οι αμινο-τελικές περιοχές είναι αποσυνδεδεμένες και η περιοχή lid είναι ελεύθερη. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση που πραγματοποιούνται κατά τον κύκλο του ATP είναι αργές διαδικασίες, σημειώνοντας τη διακίνηση ενός μορίου ATP κάθε λεπτό, για την HSP90 στη ζύμη (Panaretou *et al.*, 1998).



**Εικόνα 9:** Ο ATP κύκλος του συστήματος μοριακού συνοδού HSP90. Με τη βοήθεια μοντέλων κινητικής εκτιμώνται τα πέντε ενδιάμεσα στάδια του διμερούς στο κύκλο του ATP. Πρόσδεση του ATP επάγει την προσέγγιση της περιοχής πρόσδεσης του ATP από την περιοχή lid. Οι αμινο-τελικές προεξέχουσες αλυσίδες κάθε μονομερούς ανταλλάσσονται και ακολουθούν μετέπειτα αλλαγές μέχρι το διμερές να αποκτήσει συμπίεσμένη σπειροειδή κλειστή διαμόρφωση (Li and Buchner, 2013).

Όπως είναι φανερό, προκειμένου οι HSP90 να αποκτήσουν την τελική και λειτουργική τους διαμόρφωση υπόκεινται σε πλήθος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Εκτός από τον κύκλο του ATP, ανάμεσα σε αυτές τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις βρίσκονται: (α) η υπερφωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης, που ρυθμίζουν αρνητικά τη λειτουργία τους (Zhao *et al.*, 2005), (β) η αποφωσφορυλίωση των HSP90 από τη φωσφατάση Ppt1 στη ζύμη (Wandinger *et al.*, 2006) και (γ) οι τροποποιήσεις μέσω ακετυλίωσης (Scroggins *et al.*, 2007).

Αν και έχουν ταχτοποιηθεί αρκετά σημεία φωσφορυλίωσης, μέχρι σήμερα ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί (Ogiso *et al.*, 2004).

### 1.3 ΤΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΑ

Όλοι σχεδόν οι ιστοί ενός ώριμου φυτού προέρχονται αποκλειστικά από εξειδικευμένες κυτταρικές ομάδες που ονομάζονται μεριστώματα και εντοπίζονται στην κορυφή της ρίζας και του βλαστού. Το ακραίο μερίστωμα του βλαστού (AMB ή Shoot Apical Meristem, SAM) είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη των υπέργειων τμημάτων του φυτού στα οποία συμπεριλαμβάνεται ο βλαστός, τα φύλλα, τα άνθη, ενώ το ακραίο μερίστωμα της ρίζας (AMP ή Root Apical Meristem, RAM) αντίστοιχα είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό και την ανάπτυξη-επιμήκυνση του υπόγειου ριζικού συστήματος, το οποίο είναι απαραίτητο για την πρόσληψη νερού και μετάλλων (Barton and Poethig, 1993).

#### 1.3.1 ΑΚΡΑΙΟ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑ ΤΟΥ ΒΛΑΣΤΟΥ (Shoot Apical Meristem, SAM)

Το AMB αποτελείται από ένα μικρό πληθυσμό κυτοπλασματικών, μη διαφοροποιημένων, διαιρούμενων κυττάρων. Στηριζόμενοι σε πλήθος κριτηρίων, τα μεριστωματικά κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως βλαστοκύτταρα (Potten and Loeffler, 1990). Ανάμεσα στα κριτήρια αυτά είναι και η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται, να αυτοαντικαθίστώνται, να δίνουν γένεση σε πολλούς διαφοροποιημένους τύπους κυττάρων και να αναγεννούν σε περίπτωση καταστροφής το μεριστωματικό ιστό (Sussex, 1952).

Δεδομένα από κυτταρολογικές και ιστολογικές μελέτες υποδεικνύουν πως το AMB στα αγγειόσπερμα αποτελείται από τρεις διακριτές ακτινωτές δομές (**Εικόνα 10**).

Η πρώτη δομή εντοπίζεται στο κορυφαίο τμήμα του AMB και περιλαμβάνει μια ομάδα κυττάρων μεγάλου σχετικά μεγέθους με πολυάριθμα κυστίδια. (Κεντρική Ζώνη, Central Zone, CZ)

Η δεύτερη δομή είναι εκείνη που περιβάλλει την Κεντρική Ζώνη και διαθέτει κύτταρα με μικρότερο σε μέγεθος αλλά μεγαλύτερο ρυθμό διαίρεσης σε σχέση με τα αντίστοιχα της Κεντρικής Ζώνης. (Περιφερειακή Ζώνη, Peripheral Zone, PZ)

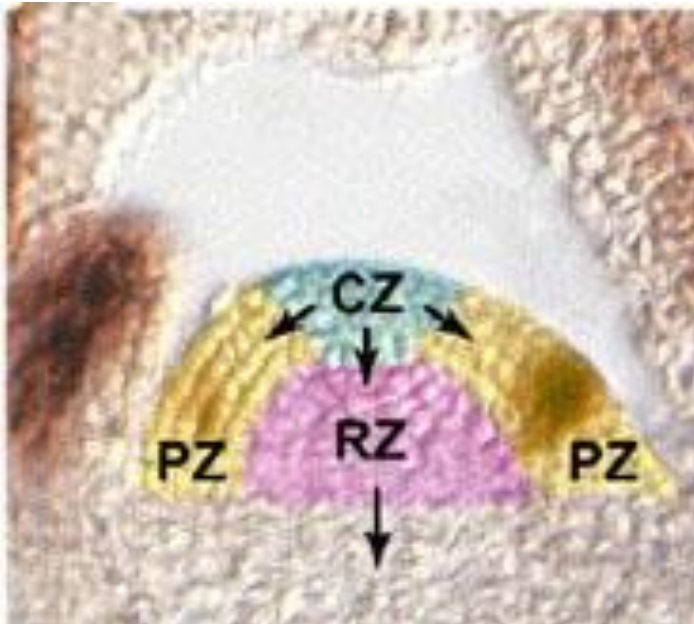
Η τρίτη δομή βρίσκεται κάτω από την Κεντρική Ζώνη και σε βαθύτερα κυτταρικά στρώματα και απαρτίζεται από κύτταρα τα οποία διαθέτουν πολυάριθμα κυστίδια και συμμετέχουν στο σχηματισμό του κυρίου σώματος του βλαστού. (Ραβδωτή Ζώνη, Rib Zone, RZ)

Ένα επιπλέον επίπεδο οργάνωσης του AMB περιλαμβάνει το διαχωρισμό του σε ξεχωριστές κυτταρικές στιβάδες.

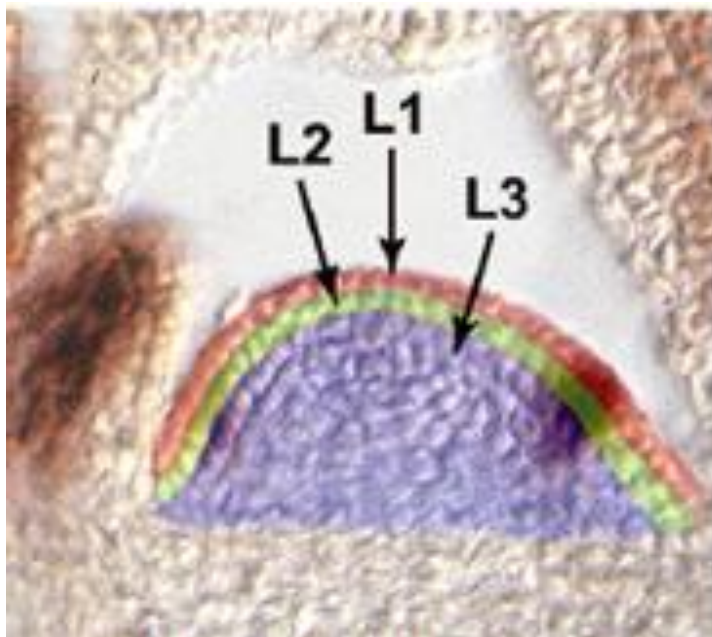
Το ακραίο μερίστωμα του βλαστού στα αγγειόσπερμα οργανώνεται σε δύο διακριτές ιστολογικές περιοχές γνωστές διεθνώς ως tunica (μανδύας) και corpus (σώμα) (Schmidt, 1924) (**Εικόνα 11**).

Η περιοχή tunica αποτελείται από ένα ή περισσότερα κυτταρικά στρώματα τα οποία καλύπτουν την υποκείμενη περιοχή corpus. Αν και στα περισσότερα μονοκότυλα φυτά η περιοχή tunica αποτελείται από μία στοιβάδα κυττάρων, στην πλειοψηφία των

δικότυλων η περιοχή αυτή αποτελείται από δύο διακριτές στιβάδες, την επιδερμική L1 και την υποδερμική L2.



**Εικόνα 10:** Οργάνωση του SAM. Τα θυγατρικά κύτταρα της περιφερειακής ζώνης (PZ) δημιουργούν τα πλάγια όργανα. Τα διαιρούμενα κύτταρα της ραβδωτής ζώνης (RZ) θα δημιουργήσουν το κυρίως σώμα. Η κεντρική ζώνη (CZ) αποτελεί το θύλακα των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, η διαίρεση των οποίων θα οδηγήσει στη διατήρηση της κεντρικής ζώνης αλλά και στην αντικατάσταση των μεριστωματικών κυττάρων της περιφερειακής και της ραβδωτής ζώνης. (Bowman and Eshed, 2000)



**Εικόνα 11:** Οι τρεις στιβάδες L1, L2, L3 του AMB. Οι στιβάδες L1 και L2 συνιστούν την περιοχή του μανδύα (tunica) ενώ η L3 συνιστά την περιοχή του σώματος (corpus) (Bowman and Eshed, 2000).

Στο φυτό *A. thaliana* το ακραίο μερίστωμα του βλαστού αποτελείται από δύο κυτταρικές στιβάδες tunica κάτω από τις οποίες υπόκειται η αβαθής περιοχή corpus (Vaughn, 1955; Medford *et al.*, 1992). Η οργάνωση του μεριστώματος στις δύο αυτές περιοχές είναι αποτέλεσμα της διαφοράς στην κατεύθυνση της κυτταροδιαίρεσης. Η διαίρεση των κυττάρων στην περιοχή tunica είναι αντικλινής διατηρώντας έτσι την διάταξη των κυτταρικών στιβάδων στην περιοχή. Αντίθετα τα κύτταρα στην περιοχή corpus, τα οποία συνιστούν την στιβάδα L3, διαιρούνται αντικλινώς, περικλινώς ή και λοξά οδηγώντας έτσι σε μια «μπερδεμένη» διάταξη των κυττάρων της περιοχής (Barton and Poethig, 1993).

## 1.4 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ CLAVATA

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί και μελετηθεί ένα πλήθος γονιδίων που κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στη δημιουργία και τη διατήρηση του AMB, ανάμεσα στα οποία είναι και τα γονίδια του συστήματος CLAVATA.

Πιο συγκεκριμένα στο φυτό *Arabidopsis* ο αριθμός των κυττάρων τα οποία συνιστούν το θύλακα των βλαστικών κυττάρων στο AMB, ελέγχεται από τη δράση των γονιδίων CLAVATA (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*). Σε ομόζυγες μεταλλαγμένες σειρές απώλειας των γονιδίων *CLV1*, *CLV2* και *CLV3* το AMB που σχηματίζεται από τα πρώτα κιάλας στάδια της εμβρυογένεσης είναι διογκωμένο. Η διογκωση αυτή του AMB συνεχίζεται βαθμιαία σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός AMB που μοιάζει με μπαλόνι όταν τα φυτά φτάσουν στο στάδιο της αναπαραγωγικής φάσης. Η μεγέθυνση που παρατηρείται στο AMB μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένο αριθμό κυττάρων, είτε σε αυξημένο μέγεθος των κυττάρων. Έπειτα από μελέτες και παρατηρήσεις με τη βοήθεια συνεστιακού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, διαπιστώθηκε ότι το διογκωμένο AMB των *clv* μεταλλαγμάτων περιέχει μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σε σχέση με το AMB φυτών αγρίου τύπου. Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι τα γονίδια *CLV* δεν επηρεάζουν το μέγεθος των κυττάρων, αλλά το ρυθμό των κυτταροδιαίρεσεων της κεντρικής ζώνης του AMB ή το ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα εξέρχονται από την κεντρική ζώνη. Επιπλέον πειραματικά δεδομένα υπέδειξαν πως τα γονίδια *CLV* εμπλέκονται στον περιορισμό του αριθμού των βλαστικών κυττάρων στο AMB. Η δράση τους δηλαδή ελέγχει τη συσσώρευση των βλαστικών κυττάρων, ρυθμίζοντας το ρυθμό μεταγωγής τους από την κεντρική στην περιφερειακή ζώνη και το ρυθμό ενσωμάτωσής τους στις καταβολές των πλάγιων οργάνων.

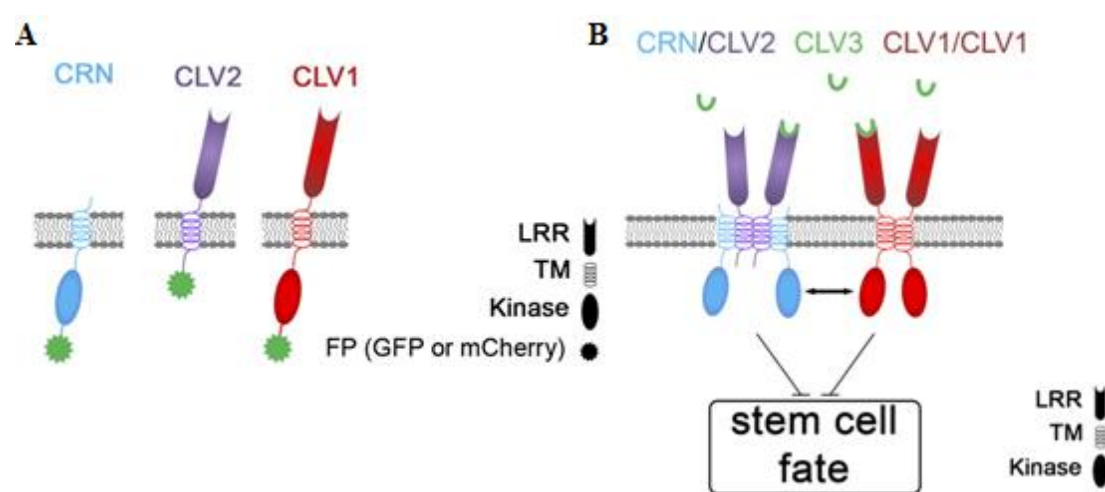
Συμπερασματικά, τα γονίδια *CLV* είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στη συσσώρευση μεριστωματικών κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους. Επιπλέον είναι αναγκαία για να αποφευχθεί η συσσώρευση αδιαφοροποίητων κυττάρων στο κέντρο του ανθικού μεριστώματος.

Το γονίδιο *CLV1* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που διαθέτει 21 εξωκυτταρικές επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (extracellular leucine-rich repeats – LRRs), ένα διαμεμβρανικό μοτίβο και ένα ενδοκυτταρικό μοτίβο κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Clark *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1998).

Το γονίδιο *CLV2* κωδικοποιεί για μια υποδοχέα-όμοια (Receptor-like, RL) πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από εξωκυτταρικά LRR μοτίβα, ένα διαμεμβρανικό μοτίβο και μια κυτταροπλασματική ουρά 11 αμινοξέων.

Οι δύο πρωτεΐνες, *CLV1* και *CLV2*, περιέχουν στα εξωτερικά τους μοτίβα ζεύγη κυστεϊνών, μέσω των οποίων γίνεται δυνατός ο σχηματισμός ομο- και ετερο- διμερών με δισουλφιδικούς δεσμούς.

Το γονίδιο *CLV3* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 96 αμινοξέων που εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη *CLV3* έχει όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά ενός μορίου-σινιάλου και ότι αποτελεί το υπόστρωμα των υποδοχέων *CLV1* και *CLV2* (Fletcher et al., 1999).



**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση Α. των *CLV1*-FP, *CLV2*-FP και *CRN*-FP Β. Μοντέλο αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου *CLV3* με τους υποδοχείς. Οι πρωτεΐνες *CLV1*, *CLV2* και *CRN* αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας το σύμπλοκο-υποδοχέα για την αντίληψη του *CLV3*, καθορίζοντας τη μοίρα των βλαστικών κυττάρων (Bleckmann et al., 2010).

Οι πρωτεΐνες *CLV1* και *CLV2* αποτελούν μέλη μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνικών υποδοχέων οι οποίες εντοπίζονται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Στο γονιδίωμα του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana* μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί τουλάχιστον 150 πιθανές LRR υποδοχέα-όμοιες κινάσες (LRR-RLKs), οι οποίες μοιάζουν με την πρωτεΐνη *CLV1*, και τουλάχιστον 30 LRR υποδοχέα-όμοιες πρωτεΐνες που μοιάζουν με την πρωτεΐνη *CLV2*. Αν και η λειτουργία των περισσότερων δεν είναι ακόμα γνωστή, το LRR μοτίβο που απαντάται συχνά στις «δομές σύνδεσης πρωτεϊνών» πολλών φυτικών και ζωικών πρωτεϊνών, υποδηλώνει ότι το μοτίβο LRR που χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες *CLV1* και *CLV2* πιθανότατα εμπλέκεται στη σύνδεση μιας πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδικού υποστρώματος.

Τα τρία γονίδια *CLV* κωδικοποιούν συστατικά ενός μονοπατιού μεταγωγής σήματος, μέσω του οποίου γίνεται εφικτή η επικοινωνία ανάμεσα στις διαφορετικές κυτταρικές ομάδες του ακραίου και ανθικού μεριστώματος. Στην επικοινωνία αυτή συμπεριλαμβάνεται και η ροή της πληροφορίας που καθορίζει την «τύχη» κάθε κυττάρου στο AMB.

Τα γονίδια CLV1 και CLV3 κωδικοποιούν στοιχεία ενός μεταγωγικού μονοπατιού.

#### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (CLV1) AT1G75820

Περιοχή	Περιοχή Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας
ORF	288-3309
5' utr	1-287
coding region	288-640
coding region	720-3309
Exon	1-640
Intron	641-719
exon	720-3628
3' utr	3310-3628

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά γονιδιωματικής περιοχής του γονιδίου *CLV1*.

#### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (CLV2) AT1G65380

Περιοχή	Περιοχή Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας
ORF	118-2280
5' utr	1-117
coding region	118-2280
Exon	1-2424
3' utr	2281-2424

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά γονιδιωματικής περιοχής του γονιδίου *CLV2*.

#### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (CLV3) AT2G27250

Περιοχή	Περιοχή Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας
ORF	209-767
5' utr	1-208
coding region	209-385
coding region	553-599
coding region	701-767
Exon	1-385
Intron	386-552
exon	553-599
Intron	600-700
exon	701-820
3' utr	768-820

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά γονιδιωματικής περιοχής του γονιδίου *CLV3*.

#### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (CRN) AT5G13290

Περιοχή	Περιοχή Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας
ORF	83-1374
5' utr	1-82
coding region	83-392
coding region	479-1374
Exon	1-392
Intron	393-478
exon	479-2399
3' utr	1375-2399

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά γονιδιωματικής περιοχής του γονιδίου *CRN*.

## 1.5 ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ CLAVATA-WUSCHEL

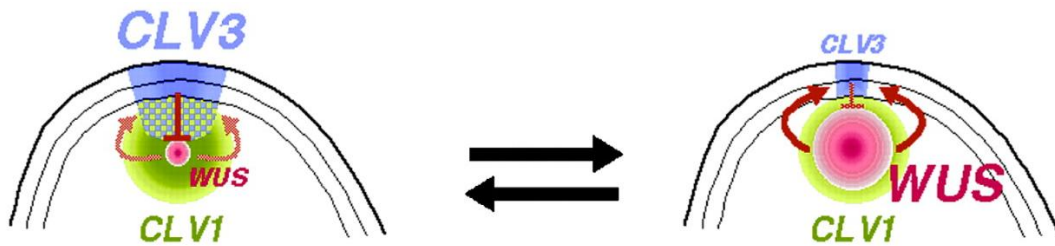
Η διατήρηση του AMB επιτυγχάνεται μέσω των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, ο έλεγχος των οποίων γίνεται μέσω του σηματοδοτικού μηχανισμού CLAVATA-WUSCHEL. Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι είναι υπεύθυνο για τον συντονισμό του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο φυτό *Arabidopsis* αλλά φαίνεται πως είναι συντηρημένο και σε ανώτερα εξελικτικά φυτιά είδη (Somssich *et al.*, 2016).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι CLAVATA3 (CLV3)-WUSCHEL (WUS) έχει εξελιχθεί ως η κύρια ρυθμιστική οδός για την αύξηση και διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων. Ο έλεγχος των βλαστικών κυττάρων βασίζεται σε έναν μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης που περιλαμβάνει τον μεταγραφικό παράγοντα WUS που επάγει τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και το πεπτίδιο CLV3 που προάγει τη διαφοροποίησή τους (Brand *et al.*, 2000 ; Schoof *et al.*, 2000).

Το γονίδιο *WUS* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που αποτελεί έναν ομοιοδομικό παράγοντα που ανήκει στην οικογένεια WOX (WUSCHEL-like homeobox) (Laux *et al.*, 1996). Η έκφραση του παράγοντα εντοπίζεται στα κύτταρα του κέντρου οργάνωσης (Organizing Center, OC), σε μια περιοχή 10 κυττάρων στο AMB (Yadav *et al.*, 2011). Εκτοπική έκφραση του *WUS* επάγει τα βλαστικά κύτταρα, γι' αυτό και η περιοχή έκφρασής του είναι αυστηρά ελεγχόμενη και περιορίζεται στο OC. Η ίδια η πρωτεΐνη *WUS* περιορίζει τα επίπεδά της μέσα από την ενεργοποίηση του αρνητικού ρυθμιστή *CLV3* στα κύτταρα της κεντρικής ζώνης, CZ. Πιο συγκεκριμένα η πρωτεΐνη *WUS* μετά τη σύνθεσή της στο OC, μεταναστεύει στην CZ όπου και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του *CLV3* μέσω της πρόσδεσής του στα στοιχεία του προαγωγέα του *CLV3* (Yadav *et al.*, 2011).

Στο φυτό *Arabidopsis* έχει βρεθεί πως εφράζονται 24 μέλη της οικογένειας CLE τα οποία χαρακτηρίζονται από ένα συντηρημένο μοτίβο 14 αμινοξέων, γνωστό με τον όρο CLE-box και εμπλέκονται στον έλεγχο των βλαστικών κυττάρων του AMB, AMP και του αγγειακού συστήματος του καμβίου (Casamitjana-Martínez *et al.*, 2003; Cock and McCormick, 2001; Fletcher *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2006; Stahl *et al.*, 2009).

Το *CLV3* εκφράζεται ως ένα προ-πεπτίδιο αποκλειστικά στα βλαστικά κύτταρα του AMB και εκκρίνεται ως ώριμο πεπτίδιο αφού πρώτα υποστεί μια επεξεργασία (Fletcher *et al.*, 1999 ; Rojo *et al.*, 2002). Η αντίληψη του ώριμου πεπτιδίου *CLV3* γίνεται στα υποκείμενα κύτταρα του κέντρου οργάνωσης, μέσω τεσσάρων τουλάχιστον πρωτεϊνών-υποδοχέων (receptor-like), προκειμένου να κατασταλεί η δράση της πρωτεΐνης *WUS* (Brand *et al.*, 2000 ; Fiers *et al.*, 2005 ; Hobe *et al.*, 2003 ; Müller *et al.*, 2008 ; Schoof *et al.*, 2000). Η καταστολή αυτή του *WUS* από το πεπτίδιο *CLV3* έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση λιγότερων βλαστικών κυττάρων άρα και τη μείωση της παραγωγής του *CLV3* (Brand *et al.*, 2000 ; Schoof *et al.*, 2000), (Εικόνα 14).



**Εικόνα 13:** Διατήρηση βλαστικών κυττάρων του ανθικού μεριστώματος. Το μέγεθος του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων ελέγχεται μέσω του μηχανισμού CLV-WUS. Με την αύξηση του αριθμού των βλαστικών κυττάρων, αυξάνεται και η ποσότητα του CLV3 που απελευθερώνεται. Το πεπτίδιο-σινιάλο CLV3 προχωρά προς τις υποκείμενες στιβάδες μέσω των CLV1 και CLV2. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του WUS, μειώνοντας έτσι την προαγωγή των βλαστικών κυττάρων (αριστερά). Από την άλλη με την μείωση του αριθμού των βλαστικών κυττάρων, μειώνεται και τα παραγόμενα μόρια CLV3. Κατά συνέπεια, περισσότερα κύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν το WUS, προωθώντας έτσι τον καθορισμό της ταυτότητας των βλαστικών κυττάρων (δεξιά) (Nakajima and Benfey, 2002).

## 1.6 ΠΕΠΤΙΔΙΑ CLE

Ως πεπτίδιο-σινιάλο ορίζεται ένα μικρού μεγέθους πεπτίδιο (συνήθως 16-30 αμινοξέων) (Karr *et al.*, 2013) το οποίο βρίσκεται στο άμινο-τελικό άκρο της πλειονότητας των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών που προορίζονται για την εκκριτική οδό (Bobel and Dobberstein, 1975). Στις πρωτεΐνες αυτές συγκαταλέγονται εκείνες που απαντώνται σε συγκεκριμένα οργανίδια, που εκκρίνονται από το κύτταρο ή τοποθετούνται στις περισσότερες κυτταρικές μεμβράνες.

### 1.6.1 CLV3

Το γονίδιο CLV3 είναι το ένα από τα τρία γονίδια CLAVATA που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο του μεγέθους του AMB στο φυτό *Arabidopsis*. Αποτελεί μέλος των CLE γονιδίων και κωδικοποιεί για μια πρόδρομη, κυτταροειδική πρωτεΐνη, 96 αμινοξέων, η οποία διαθέτει ένα πεπτίδιο-σινιάλο που κατευθύνει την πρωτεΐνη στο κατάλληλο μονοπάτι (secretory pathway) (Fletcher *et al.*, 1999 ; Rojo *et al.*, 2002). Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο, κυρίως στα ακραία κύτταρα των L1 και L2 στιβάδων αλλά και σε ορισμένα κύτταρα της στιβάδας L3. Η ώριμη μορφή της πρωτεΐνης CLV3 έχει βρεθεί πως είναι ένα μετά-μεταγραφικά τροποποιημένο πεπτίδιο 12 αμινοξέων στο οποίο τα δύο από τα τρία κατάλοιπα προλίνης έχουν τροποποιηθεί σε υδρόξυπρολίνη (Ito *et al.*, 2006 ; Kondo *et al.*, 2006). Αργότερα αναφέρθηκε πως το ώριμο πεπτίδιο CLV3 είναι ένα αραβινοσυλιωμένο γλυκοπεπτίδιο 13 αμινοξέων (Ohyama *et al.*, 2009).

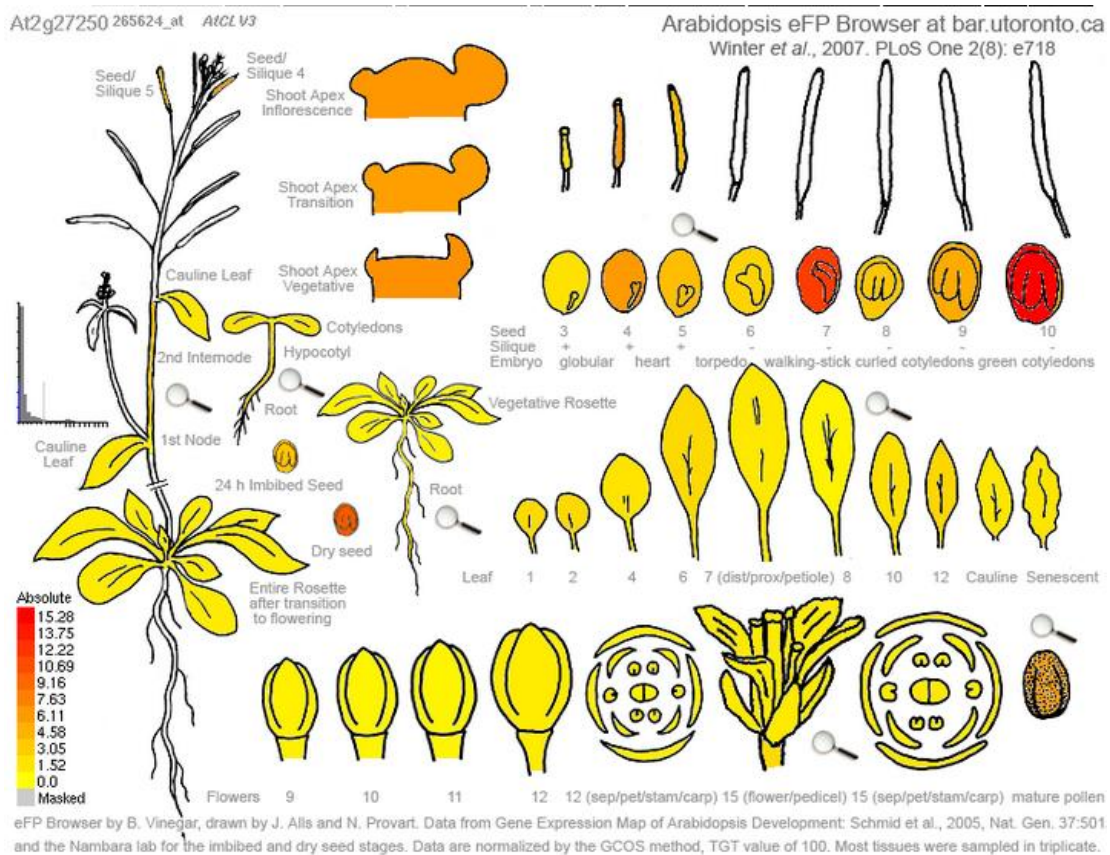
Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη CLV3 έχει όλα τα χαρακτηριστικά μορίου σινιάλου και ότι αποτελεί το υπόστρωμα των υποδοχέων CLV1 και CLV2. Αποτελεί μέλος μιας πολυγονιδιακής οικογένειας και περιέχει μια υψηλά συντηρημένη περιοχή 14 αμινοξέων κοντά στο καρβόξυ-τελικό άκρο, που είναι χαρακτηριστική της οικογένειας γονιδίων CLV3/ESR-like (CLE).

Το ίδιο το CLV3 περιορίζει την έκφρασή του στην περιοχή της CZ του AMB, παρεμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των κυττάρων της περιφερειακής ζώνης PZ, τα οποία περικυκλώνουν την CZ. Επιπλέον διατηρεί το συνολικό μέγεθος του AMB ελέγχοντας τον ρυθμό των κυτταροδιαρρέσεων.



Υπερέκφραση του γονιδίου *CLV3* υπό την καθοδήγηση του καθολικού προαγωγέα 35S, οδήγησε σε φυτά με φαινότυπο παρόμοιο με εκείνον των *wus* μεταλλαγμάτων, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία των *CLV3* mRNA είναι ικανή να καταστείλει την έκφραση του γονιδίου *WUS* (Brand *et al.*, 2002). Έτσι φανερώνεται πως ο περιοριστικός παράγοντας στην καταστολή του *WUS* είναι η διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης *CLV3*. Δεδομένης της ικανότητας της *CLV3* να μετακινείται κατά μήκος των σιβάδων του μεριστώματος, προκύπτει το ερώτημα, γιατί η έκφραση του γονιδίου *WUS* δεν καταστέλλεται στα κύτταρα του κέντρου οργάνωσης. Πειραματικά δεδομένα σε εκχυλίσματα μεριστωμάτων κουνουπιδιού έχουν δείξει ότι το 75% των *CLV3* πρωτεϊνών είναι δεσμευμένες από τις πρωτεΐνες *CLV1*. Ακόμα και ο διπλασιασμός των αντιγράφων του *CLV3* γονιδίου δεν είναι ικανός να οδηγήσει σε καταστολή του *WUS* στο κέντρο οργάνωσης. Έχει λοιπόν προταθεί ότι η παρεμπόδιση της μετακίνησης της *CLV3* πρωτεΐνης στο κέντρο οργάνωσης οφείλεται στην παρουσία περίσσειας *CLV1* συμπλόκων στην επικείμενη L3 σιβάδα. Έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη *CLV3* είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του ενεργού συμπλόκου *CLAVATA*. Επιπλέον πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης *CLV1* είναι απαραίτητο τόσο για τη σύνδεση του *CLV3* όσο και για τη μετέπειτα μεταγωγή του σιναύου.

Η έκφραση του *CLV3* ξεκινά, στο *Arabidopsis*, από το στάδιο 3 του εμβρύου, παρουσιάζοντας μέγιστο στο στάδιο 10 όπου το έμβρυο έχει πλέον ωριμάσει (**Εικόνα 14**).



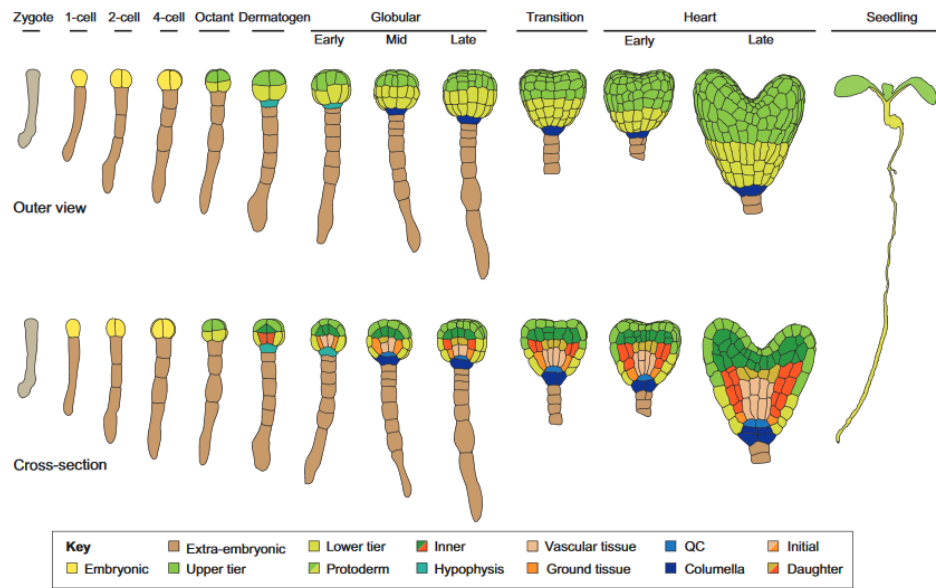
**Εικόνα 14:** Έκφραση του *CLV3* ανάλογα με το είδος του ιστού και τα αναπτυξιακά στάδια, στο φυτό *Arabidopsis* (e-FP Browser).

## 1.7 ΤΑ ΕΜΒΡΥΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Arabidopsis*

Η εμβρυογένεση αποτελεί την αρχή της ανάπτυξης του φυτού. Ωστόσο κατά τη φάση αυτή λαμβάνονται σημαντικές αποφάσεις που καθορίζουν τη μοίρα των κυττάρων του αναπτυσσόμενου φυτού και τη μετεβρυϊκή ανάπτυξη. Στο φυτό *Arabidopsis* η διαδικασία της εμβρυογένεσης ακολουθεί ένα απλό και προβλέψιμο πρότυπο, καθιστώντας το ιδανικό ως φυτό-μοντέλο, με βάση το οποίο γίνεται κατανοητός ο έλεγχος των κυτταρικών διεργασιών και της διαδικασίας ανάπτυξης των φυτών (Colette *et al.*, 2015).

Τα έμβρυα των περισσότερων φυτών αναπτύσσονται «χαοτικά» ακολουθώντας τυχαίες κυτταροδιαιρέσεις (Pollock and Jensen, 1964 ; Johri, 1984 ; Johri *et al.*, 1992) και μόνο μερικά μέλη της οικογένειας των Brassicaceae, συμπεριλαμβανομένου και του *Arabidopsis*, ακολουθούν ένα απλό, υψηλά ρυθμιζόμενο και προβλέψιμο μοτίβο (Mansfield and Briarty, 1991 ; Jürgens and Mayer, 1994). Αυτός είναι και ο λόγος που οι περισσότερες μέχρι σήμερα μελέτες εστιάζουν στο φυτό *Arabidopsis* και όχι σε άλλα λιγότερο οργανωμένα είδη.

Η εμβρυογένεση ξεκινά με τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου από ένα από τα δύο σπερματικά κύτταρα που απελευθερώνονται από το γυρεοσωλήνα (Dumas and Rogowsky, 2008). Αμέσως μετά ξεκινά η επιμήκυνση του ζυγώτη, κατά μήκος του μελλοντικού κεντρικού άξονα, πριν υποστεί την πρώτη κυτταροδιαίρεση. Αυτή η κυτταροδιαίρεση θα οδηγήσει στο σχηματισμό δύο κυττάρων, ένα μικρό κορυφαίο και ένα πιο επιμηκυσμένο στη βάση. Το κορυφαίο κύτταρο είναι αυτό που θα δώσει ολόκληρο το έμβryo εκτός από το τέλος, στη βάση του. Το επιμήκες κύτταρο της βάσης υφίσταται διαδοχικές διαιρέσεις προκειμένου να δώσει μια ομάδα 7 έως 9 κυττάρων, από τα οποία όλα με εξαίρεση το ανώτατο θα δημιουργήσουν μια εξωεμβρυϊκή δομή, τον αναρτήρα. Τα κορυφαία κύτταρα υφίστανται μια σειρά διαιρέσεων. Αρχικά πραγματοποιούνται δύο διαμήκεις διαιρέσεις παράγοντας 4 ισομεγέθη κύτταρα. Ακολουθεί εγκάρσια διαίρεση που θα δημιουργήσει τα δύο επίπεδα και τελικά τα 8 κύτταρα του εμβρύου. Στο στάδιο αυτό το ανώτερο επίπεδο είναι ελαφρώς μικρότερο από το κατώτερο (Yoshida *et al.*, 2014). Όλα τα κύτταρα υφίστανται εφαπτομενική διαίρεση και τελικά δημιουργούνται 8 εσωτερικά και 8 εξωτερικά κύτταρα, χωρίζοντας έτσι το πρωτόδερμα από τους εσωτερικούς ιστούς. Στα επόμενα στάδια τόσο ο προσανατολισμός των κυτταρικών διαιρέσεων όσο και η ογκομετρική ασυμμετρία είναι αυστηρά καθορισμένα στο κάτω μισό τμήμα του εμβρύου ενώ είναι λιγότερο περιορισμένα στο πάνω τμήμα. Ο επόμενος κύκλος διαιρέσεων είναι αυτός που θα δώσει το πρώιμο σφαιρικό στάδιο του εμβρύου. Τα εξωτερικά κύτταρα του πρωτοδέρματος διαιρούνται αντικλινώς για να επεκτείνουν την εξωτερική στιβάδα, σε αντίθεση με τα εσωτερικά κύτταρα που διαιρούνται κατά μήκος. Την ίδια στιγμή το ανώτατο κύτταρο του αναρτήρα που προσδιορίζεται ως υπόφυση, διαιρείται ασύμμετρα, σχηματίζοντας ένα κύτταρο που αποτελεί τον πρόδρομο του κέντρου ησυχίας, QC (Quiescence Center, QC) και ένα μεγαλύτερο κύτταρο που θα δώσει μετέπειτα τα βλαστικά κύτταρα του ριζικού μεριστώματος. Ο καθορισμός της ταυτότητας των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση ελέγχεται αυστηρά από ειδικά μοριακά μονοπάτια και συχνά χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης.



**Εικόνα 15:** Ανάπτυξη των εμβρύων του φυτού *Arabidopsis* (Colette *et al.*, 2015).

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του ρόλου και της συμβολής των HSP90 πρωτεϊνών στην αντίληψη αναπτυξιακών σιγνάλων στο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Προηγούμενες μελέτες έχουν ήδη υποδείξει τη συμβολή των HSP90 στην αντίληψη σιγνάλων, ρυθμίζοντας αναπτυξιακά μονοπάτια. Είναι ήδη γνωστή η εμπλοκή των HSP90 στο μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών ορμονών (Samakovli *et al.*, 2014), στο μονοπάτι της αυξίνης αλλά και στην αντίληψη του φωτός (Samakovli *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2016). Τα στοιχεία αυτά, σε συνδυασμό με τα δεδομένα που υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα των HSP90 μονοπατίων της άνθισης, αποτέλεσαν βάση της συγκεκριμένης μελέτης. Επιπλέον, η διαταραχή των οδών που ρυθμίζουν την άνθιση απουσία των HSP90 αποκάλυψε πως η αντίληψη και μεταγωγή των αντίστοιχων μηνυμάτων επηρεάζεται σημαντικά (Margaritopoulou, 2012). Η διερεύνηση του ρόλου των HSP90 στην αντίληψη των αναπτυξιακών σιγνάλων κατά την παρούσα μελέτη έγινε μέσα από τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των κυτταροπλασματικών HSP90.1 και HSP90.3 με τις πρωτεΐνες CLV1, CLV2 και CRN, οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό συμπλόκων με ρόλο υποδοχέα, για την αντίληψη του πεπτιδίου-σιγνάλου CLV3 στο ακραίο μερίστωμα του βλαστού. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοκατακρίμησης πρωτεϊνών. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η σημασία της παρουσίας ενεργών μορίων HSP90 για την αντίληψη και μετάδοση του πεπτιδίου σιγνάλου CLV3, με τη μελέτη του προτύπου έκφρασης του πεπτιδίου μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και συνθήκες αναστολής της ενεργότητας των μορίων HSP90.



# ΥΠΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ





## 2.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτικά είδη. Το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* και ο καπνός *Nicotiana benthamiana*. Η ανάπτυξη των συγκεκριμένων φυτικών ειδών στο εργαστήριο είναι εύκολη, γρήγορη και χρησιμοποιούνται για μελέτες. Για την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η σταθερά μετασχηματισμένη σειρά *Arabidopsis*, pCLV3::GFP, η οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό PPT (Phosphinotricin) (Reddy and Meyerowitz, 2005). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό DL-PHOSPHINOTRICIN της εταιρείας Duchefa Biochemie, σε συγκέντρωση 10μg/ml.

Η καλλιέργεια των φυτών στο εργαστήριο ξεκινά με την προετοιμασία την παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος MS κατάλληλης συγκέντρωσης και την κατάλληλη προετοιμασία των σπερμάτων του φυτού. Στη συνέχεια τα σπέρματα τοποθετούνται κατάλληλα στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Τέλος μετά την πάροδο δύο περίπου εβδομάδων, τα αναπτυσσόμενα νεαρά φυτά μεταφέρονται προσεκτικά σε χώμα και αναπτύσσονται σε κατάλληλες συνθήκες.

### PPT 10μg/ml:

DL-PHOSPHINOTRICIN (Duchefa Biochemie) σε MS

### 2.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ

Τα σπέρματα του φυτού ενυδατώνονται για 24h τουλάχιστον, σε θερμοκρασία 4°C με σκοπό τη διακοπή του ληθάργου. Στη συνέχεια ακολουθεί η απολύμανσή τους. Κατά την απολύμανση, αρχικά απομακρύνεται από τα σπέρματα, με τη χρήση πιπέτας Pasteur, το νερό. Διάλυμα αιθανόλης 70% (70% EtOH) προστίθεται στα σπέρματα, ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10-20sec και αφήνονται να ηρεμήσουν. Το διάλυμα της αιθανόλης απομακρύνεται και προστίθεται στα σπέρματα διάλυμα χλωρίνης 30%. Τα σπέρματα αναδεύονται για 1min και αφήνονται να ηρεμήσουν. Στη συνέχεια το διάλυμα της χλωρίνης απομακρύνεται και ακολουθούν πέντε ξεπλύματα με dH<sub>2</sub>O, 1min τη φορά.

Τα σπέρματα μεταφέρονται και επιστρώνονται, με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, σε τρυβλία *Petri* όπου βρίσκεται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης MS, και σφραγίζονται με ταινία *Parafilm*.

Η απολύμανση των σπορίων και επίστρωσή τους σε τρυβλία *Petri*, είναι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow), εξασφαλίζοντας έτσι τις ασηπτικές συνθήκες που απαιτούνται.

Τα τρυβλία με τα σπέρματα τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών, και παραμένουν εκεί για δύο περίπου εβδομάδες. Η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιείται σε συνθήκες 22°C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδο 16h φως/8h σκοτάδι.

Μετά την έλευση των δύο εβδομάδων τα νεαρά φυτά μεταφέρονται με τη χρήση λαβίδας σε γλαστράκια με χώμα, όπου θα συνεχιστεί η ανάπτυξή τους. Τις πρώτες επτά περίπου μέρες, τα φυτά παραμένουν καλυμμένα με κατάλληλο διαφανές καπάκι,



προκειμένου τα επίπεδα της υγρασίας να είναι ευνοϊκά και να ανακάμψουν γρήγορα από το στρες της μεταφύτευσης. Οι συνθήκες ανάπτυξης διατηρούνται σταθερές, όπως αναφέρονται παραπάνω.

## **2.1.2 ΣΤΕΡΕΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ MS**

### **MS**

0.444% <sup>w/v</sup> Murashige & Skoog inc. vitamins (Duchefa Biochemie), 0.05% <sup>w/v</sup> MES, 2% <sup>w/v</sup> Sucrose, 0.3% <sup>w/v</sup> Phytigel

pH=5.7 (using KOH)

Στην περίπτωση που στο θρεπτικό μέσο είναι επιθυμητή η παρουσία αντιβιοτικού, η προσθήκη 0.3% <sup>w/v</sup> Phytigel κατά την παρασκευή του MS αντικαθίσταται από 0.6% <sup>w/v</sup> Agarose.

Μετά την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος, αυτό αποστειρώνεται στους 120°C και για 20min. Στη συνέχεια τρυβλία *Petri* γεμίζονται με το θρεπτικό μέσο (~20ml/τρυβλίο), και αφήνονται μέχρι να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4°C.

Η διαδικασία γεμίσματος των τρυβλίων με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης λαμβάνει χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow), εξασφαλίζοντας το ασηπτικό περιβάλλον που απαιτείται.

## **2.1.3 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΚΑΠΝΟΥ**

### **2.1.3.1 ΑΓΡΟΔΙΗΘΗΣΗ**

Το στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 μετασηματίζεται με πλασμιδιακό φορέα με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης ή τη μέθοδο freeze-thaw.

Τα μετασηματισμένα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB παρουσία τριπλής επιλογής RGK (Rifabycin 50μg/ml, Gentamycin 25μg/ml, Kanamycin 50μg/ml). Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 28°C για χρονικό διάστημα έως και τρεις ημέρες.

Μονή αποικία επιλέγεται και καλλιεργείται σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία τριπλής επιλογής για μια-δύο μέρες, έως η καλλιέργεια να θολώσει καλά.

1.5ml καλλιέργειας μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο *ependorf* και φυγοκεντρείται στις 3500rpm για 15min.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο Dilution buffer με ιδιαίτερη προσοχή αφού το βακτηριακό ίζημα μπορεί να αποκολληθεί και να χαθεί σημαντικός αριθμός βακτηριακών κυττάρων.

Τα βακτηριακά διαλύματα φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 600nm και αραιώνονται κατάλληλα σε induction buffer έτσι ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή οπτική πυκνότητα ( $OD_{600nm} p19=1$ ,  $OD_{600nm}$  άλλων πρωτεϊνών=0.7).

Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3h.

Η αποξονική επιφάνεια φύλλων *Nicotiana benthamiana* εμβολιάζεται.

#### **Dilution buffer**

10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES pH=5.6

#### **Induction buffer**

10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES pH=5.6, 150μM acetosyrigone

#### **LB Υγρό Θρεπτικό Μέσο**

0.5% <sup>w/v</sup> yeast extract, 1% <sup>w/v</sup> NaCl, 1% <sup>w/v</sup> peptone

Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1.4% <sup>w/v</sup> άγαρ.

#### **Rifabacin 50μg/ml:**

RIFABICIN (Duchefa Biochemie) σε θρεπτικό LB

#### **Gentamycin 25μg/ml:**

GENTAMYCIN (Duchefa Biochemie) σε θρεπτικό LB

#### **Kanamycin 50μg/ml:**

KANAMYCIN (Duchefa Biochemie) σε θρεπτικό LB

## **2.2 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ (Co-IP)**

Ο ιστός λειοτριβείται παρουσία υγρού αζώτου.

Στη σκόνη του ιστού ομογενοποιείται με την προσθήκη κατάλληλου διαλύματος, Lysis Buffer, που προστίθεται στον ιστό σε αναλογία όγκων 3:1.

Ακολουθεί vortex ολίγων δευτερολέπτων, προκειμένου να γίνει πλήρης ομογενοποίηση.

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10min στις 12000rpm σε θερμοκρασία 4°C.

Ακολουθεί μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο καθαρό φιαλίδιο *ependorf*.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του υπερκειμένου για 2-3min στις 13000rpm σε θερμοκρασία 4°C.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται εκ νέου σε νέο καθαρό φιαλίδιο *ependorf* και φυλάσσεται σε πάγο. Στο στάδιο αυτό, 50-100μl μεταφέρονται σε νέο φιαλίδιο *ependorf* και φυλάσσονται ως το τέλος της διαδικασίας ως inputs.

Ακολουθεί προσθήκη του αντισώματος, περίπου 3μl ανά δείγμα.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδική συσκευή και αναδεύονται overnight στους 4°C.

Ακολουθεί η προετοιμασία των σφαιριδίων αгарόζης.

Διάλυμα Wash Buffer I προστίθεται στα σφαιρίδια και ακολουθεί ανάδευση για 5min σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 3 φορές.

Τα σφαιρίδια προστίθενται στο δείγμα (20-30μl σφαιριδίων για 1ml δείγματος).

Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων για 4h, σε θερμοκρασία 4°C

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθούν 4 ξεπλύματα όπως και πριν, αυτή τη φορά με το διάλυμα Wash Buffer II.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται στο δείγμα 60μl Sample Buffer. Το Sample Buffer προστίθεται σε ποσότητα τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1X.

Τα δείγματα τοποθετούνται στους 94°C για 5-10min.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE για την ανάλυση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος.

Στην παρούσα μελέτη το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε και προστέθηκε στο πρωτεϊνικό δείγμα είναι το anti-HA (sc-7392) και τα σφαιρίδια είναι τα Protein G Agarose beads, ABT.

#### **Lysis Buffer pH=7.5**

50mM HEPES-KOH pH=7.5, 250mM sucrose, 0.5% Triton X-100, 5% glycerol, 50mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 25mM NaF, 2mM DTT, Sigma plant protease inhibito cocktail (1X PIC)

#### **Wash Buffer I**

50mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl

#### **Wash Buffer II**

50mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1X PIC

#### **Sample Buffer**

100mM Tris-HCl pH=6.8, 4% SDS, 20mM DTT, 20% glycerol, bromophenol blue

## 2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί βασική μέθοδο ανάλυσης μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών. Η μέθοδος στηρίζεται στον διαχωρισμό των μορίων ανάλογα το μέγεθος και το φορτίο τους, καθώς διέρχονται λόγω εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος μέσα από πήκτωμα (αγαρόζης ή ακρυλαμίδης).

Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ή μικρών μορίων (DNA, RNA, ολιγονουκλεοτίδια) χρησιμοποιείται η πηκτή ακρυλαμίδης.

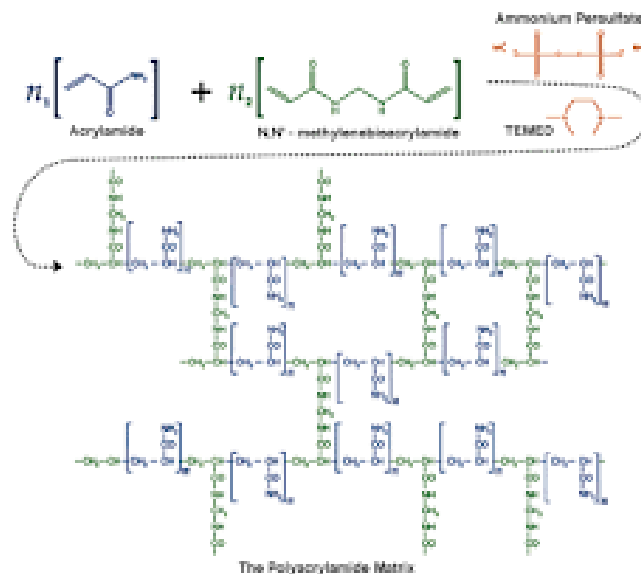
Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊνικών οξέων (μεγαλύτερα των 100bp) χρησιμοποιείται η πηκτή αγαρόζης.

### 2.3.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 5 ως 2000 kDa καθώς και για το διαχωρισμό τμημάτων DNA 5-500bp. Πρόκειται για μια τεχνική ηλεκτροφόρησης που στόχο έχει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η τεχνική πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης στην οποία περιέχεται SDS (sodium-dodecyl-sulfate, SDS). Εξαιτίας της παρουσίας του SDS, τόσο στα δείγματα όσο και στην πηκτή, το πραγματικό φορτίο των φορτίων δεν αποτελεί παράγοντα διαχωρισμού τους. Πρόκειται για ένα ανιονικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται ισχυρά στις πρωτεΐνες σε αναλογία 1.4g SDS/1g πρωτεΐνης ή 1 μόριο SDS/2 αμινοξέα, προκαλώντας την αποδιάταξή τους. Η δέσμευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα ο λόγος φορτίο/μέγεθος να είναι σχεδόν ίδιος για όλες τις πρωτεΐνες, οπότε και ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα με βάση το μοριακό τους μέγεθος δια μέσου των πόρων της πηκτής (Boyer, 2000). Η ποσότητα του δεσμευθέντος SDS είναι ανάλογη προς το μοριακό βάρος της πεπτιδικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα SDS-πρωτεϊνών να διαχωρίζονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης βάσει του μεγέθους του πολυπεπτιδίου.

Η πολυακρυλαμίδα χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση, ως πορώδες μέσο, το 1959 από τις ερευνητικές ομάδες των Davis και Raymond. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλένο-δι-ακρυλαμίδης (MBA). Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA(%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδα (**Εικόνα 16**).

Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.



**Εικόνα 16:** Σχηματισμός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με εφαρμογή θέρμανσης, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο περιέχει ένα θειολαναγωγικό παράγοντα (διθειορεϊτόλη, DTT) ή β-μερκαπτοαιθανόλη και SDS. Η παρουσία του αναγωγικού παράγοντα οδηγεί σε λύση των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης και ο συνδυασμός θέρμανσης και SDS αποτρέπει όλες τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μη συνεχές σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο αρχικά εφαρμόστηκε από τους Ornstein (1964) και Davis (1964) όπου το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) είναι διαφορετικές από αυτού που έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του πηκτώματος. Στην περίπτωση αυτή, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, το πήκτωμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Το καλούπι στο οποίο σχηματίζεται το πήκτωμα είναι συνήθως ένα sandwich τζαμιών και οι κατάλληλες θέσεις υποδοχής των δειγμάτων δημιουργούνται με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας», όσο το πήκτωμα είναι ακόμη υγρό. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

### 2.3.1.1 ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Η σύσταση του πηκτώματος εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται κάθε φορά να αναλυθούν.

Παρακάτω παρουσιάζεται η σύσταση των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη:

<b>Resolving gel</b>		
	<b>6%</b>	<b>8%</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2.6ml	2.3ml
<b>30% acrylamide mix</b>	1.0ml	1.3ml
<b>1.5M Tris-HCl (pH=8.8)</b>	1.3ml	1.3ml
<b>10% SDS</b>	0.05ml	0.05ml
<b>10%APS</b>	0.05ml	0.05ml
<b>TEMED</b>	0.004ml	0.003ml

Πίνακας 8: Σύσταση resolving gel.

Ο όγκος των 5ml αντιστοιχεί στην παρασκευή ενός πηκτώματος.

<b>Stacking gel</b>	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2.1ml
<b>30% acrylamide mix</b>	0.5ml
<b>1.0M Tris-HCl (pH 6.8)</b>	0.38ml
<b>10% SDS</b>	0.04ml
<b>10%APS</b>	0.04ml
<b>TEMED</b>	0.003ml

Πίνακας 9: Σύσταση stacking gel.

Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν η χρωστική φτάσει στη βάση του πηκτώματος. Το πηκτωμα απομακρύνεται από τα τζαμάκια με τη βοήθεια κατάλληλης σπάτουλας. Το stacking gel απομακρύνεται και το resolving gel χρησιμοποιείται είτε για χρώση είτε για μεταφορά των πρωτεϊνών σε κατάλληλη μεμβράνη με σκοπό σε κάθε περίπτωση την «εμφάνιση» των πρωτεϊνών.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών:

#### **Running Buffer:**

25mM Tris, 250mM glycine (electrophoresis grade pH=8.3), 0.1% w/v SDS

## 2.4 ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η χρώση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται με: **(α)** Coomassie Brilliant Blue (αντιστρεπτή αντίχνευση) και **(β)** Νιτρικό Άργυρο (μη αντιστρεπτή αντίχνευση).

### 2.4.1 ΧΡΩΣΗ ΜΕ Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Η χρωστική αυτή προσδένεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες, αλλά όχι στο πήκτωμα, επιτρέποντας την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών ως μπλε ζώνες στο αποχρωματισμένο πήκτωμα (Wilson, 1983).

Πρόκειται για μια αμινοτριαρυλ-μεθανο-χρωστική, η οποία προσδένεται στις πρωτεϊνικές δομές λόγω δυνάμεων Van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις αμινομάδες τους. Η πρόσδεση της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης, Staining solution, και ανακινείται για 30-60min.

Η περίσσεια του διαλύματος της χρωστικής αφαιρείται και η πήκτη εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού, Destaining solution. Ο αποχρωματισμός πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνεχή ανακίνηση. Το διάλυμα αποχρωματισμού αλλάζεται κάθε 15min περίπου.

Το διάλυμα αποχρωματισμού, μετά τη χρήση του, τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο με άνθρακα, όπου και καθαρίζεται και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

Το πήκτωμα φυλάσσεται σε νερό.

#### **Staining solution**

40%  $\frac{v}{v}$  μεθανόλη, 10%  $\frac{v}{v}$  οξικό οξύ, 0.1%  $\frac{w}{v}$  Coomassie Brilliant Bue R-250

#### **Destaining solution**

10%  $\frac{v}{v}$  μεθανόλη, 5%  $\frac{v}{v}$  οξικό οξύ

## 2.5 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και εκτίμηση του μεγέθους μακρομοριακών αντιγόνων (συνήθως πρωτεϊνών) που αντιδρούν εξειδικευμένα με κάποιο αντίσωμα (Towbin *et al.*, 1979 ; Burnette, 1981). Η διαδικασία περιλαμβάνει το στάδιο της ανάλυσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πήκτη πολυακρυλαμίδης και το στάδιο της μεταφοράς σε κατάλληλη μεμβράνη, ηλεκτροφορητικά. Στη συνέχεια οι ελεύθερες περιοχές της μεμβράνης πληρούνται με κάποιο παρεμποδιστικό μέσο, με στόχο την ελαχιστοποίηση των μη εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στη μεμβράνη και στα αντισώματα που θα προστεθούν. Οι ακινητοποιημένες αντιδρούν με τα εξειδικευμένα αντισώματα και τα σύμπλοκα που δημιουργούνται εντοπίζονται μέσω δευτερογενών αντισωμάτων. Τα δευτερογενή αυτά αντισώματα εντοπίζονται μέσω αντιδράσεων ραδιογραφίας, χρωματικών αντιδράσεων ή αντιδράσεων χημειοφωταύγειας.

### 2.5.1 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF (Western Transfer)

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη από το πήκτωμα της ακρυλαμίδης πραγματοποιείται με σκοπό την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών σε στερεό μέσο.

Οι τύποι μεμβρανών που υπάρχουν και χρησιμοποιούνται είναι τρεις:

Μεμβράνη Νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose): Οι μεμβράνες αυτές διαθέτουν πόρους διαμέτρου 0.45μm. Η δυνατότητα πρόσδεσης και διατήρησης των πρωτεϊνών κυμαίνεται από 80μg/cm<sup>2</sup> έως 250μg/cm<sup>2</sup>, αναλόγως των πρωτεϊνών. Οι τελευταίες συγκρατούνται στη μεμβράνη κυρίως λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων (van Oss *et al.*, 1987) ενώ δύναται να αναπτυχθούν και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων και των καταλοίπων αζώτου της μεμβράνης.

Νάιλον και Θετικά Φορτισμένες Νάιλον Μεμβράνες: Οι πρωτεΐνες προσδένονται ισχυρά στις μεμβράνες αυτής της κατηγορίας μέσω ηλεκτροσταζατικών αλληλεπιδράσεων. Η χωρητικότητά τους κυμαίνεται ανάμεσα σε 150μg/cm<sup>2</sup> και 200μg/cm<sup>2</sup>. Η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν οι μεμβράνες αυτές είναι αυξημένη σε σύγκριση με εκείνη των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης και έχουν τη δυνατότητα σήμανσης πολλές φορές με διαφορετικά αντισώματα. Ωστόσο δεν υπάρχει κάποια απλή και ευαίσθητη μέθοδος χρώσης των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών. Παράλληλα η εφαρμογή παρεμποδιστικού παράγοντα για την πλήρωση των ελεύθερων από πρωτεΐνες περιοχών της μεμβράνης καθίσταται δύσκολη.

Polyvinylidene fluoride (PVDF): Σε αυτό το είδος μεμβράνης η πρόσδεση των πρωτεϊνών στηρίζεται στην ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η χωρητικότητα των μεμβρανών τέτοιου τύπου είναι 170μg/cm<sup>2</sup> περίπου. Σε σύγκριση με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι μεμβράνες PVDF συγκρατούν τις πρωτεΐνες έξι φορές πιο ισχυρά. Επιπλέον, οι ακινητοποιημένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες, μπορούν να οπτικοποιηθούν με τη χρήση διάφορων χρωστικών (Ponceau S, Coomassie Brilliant Blue κλπ) (Pluskal *et al.*, 1986).



Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση μεμβράνης PVDF (Porablot PVDF, MACHEREY-NAGEL), όπου το μέγεθος των πόρων της ανέρχεται σε 0.20μm.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε Transfer buffer.

Έξι διηθητικά χαρτιά Whatmann και ένα κομματι μεμβράνης PVDF κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος.

Τα διηθητικά χαρτιά Whatmann τοποθετούνται σε Transfer buffer.

Η μεμβράνη διαβρέχεται με 100% MetOH για 1min, προκειμένου να ενεργοποιηθεί, και στη συνέχεια ξεπλένεται σε ddH<sub>2</sub>O.

Η μεμβράνη μεταφέρεται επίσης σε Transfer buffer.

Τα διηθητικά χαρτιά, η μεμβράνη PVDF και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετούνται στη συσκευή όπου θα γίνει η μεταφορά, με κατάλληλη σειρά (**Εικόνα 17**)



**Εικόνα 17:** Σχηματική απεικόνιση transfer.

Η συσκευή συνδέεται στο τροφοδοτικό, οποίο ρυθμίζεται στα 14V και 80mA. Η μεταφορά πραγματοποιείται με τη διοχέτευση ρεύματος για 45min.

Η μεμβράνη διαχωρίζεται από τα διηθητικά χαρτιά και το πήκτωμα και ξεπλένεται με TBST, όπου δύναται να παραμείνει και overnight.

Ακολουθεί ανοσοανίχνευση του ή των πολυπεπτιδίων-στόχων.

### **10X Transfer Buffer**

480mM Tris, 390mM glycine, 0.375% SDS

### **1X Transfer Buffer**

Το διάλυμα Transfer Buffer 10X αραιώνεται σε 1X και σε αυτό προστίθεται 20% MetOH

### **1X TBST**

10mM Tris-HCl pH=8.0, 150mM NaCl, 0.1%  $\frac{v}{v}$  Tween 20

### **1X TBS**

10mM Tris-HCl pH=8.0, 150mM NaCl

## 2.5.2 ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ

Η ανοσοανίχνευση στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της μεμβράνης με εξειδικευμένα αντισώματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αντισώματα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι τα πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν περισσότερα του ενός επιτόπια, ενώ τα μονοκλωνικά μόνο ένα. Αυτό έχει ως συνέπεια τα μονοκλωνικά αντισώματα να δημιουργούν λιγότερο «θόρυβο».

Στόχος της ανοσοανίχνευσης είναι η ταυτοποίηση και η εκτίμηση του μεγέθους των αντιγόνων που αλληλεπιδρούν με κάποιο αντίσωμα. Οι ελεύθερες περιοχές της μεμβράνης «μπλοκάρονται» με κάποιο παρεμποδιστικό μέσο με σκοπό την εξάλειψη των μη εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε μεμβράνη και αντίσωμα. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι εξειδικευμένο για την πρωτεΐνη-στόχο, ενώ το δευτερογενές είναι εξειδικευμένο για το πρωτογενές αντίσωμα. Ταυτόχρονα είναι συζευγμένο με αντιδραστήριο το οποίο είναι εύκολα εντοπίσιμο. Ο εντοπισμός των συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος γίνεται μέσω δευτερογενών αντισωμάτων, τα οποία εντοπίζονται μέσω αντιδράσεων χημειοφωταύγειας.

Η διαδικασία περιγράφεται ακολούθως:

Η μεμβράνη ξεπλένεται σε 1X TBST.

Το TBST αφαιρείται και η μεμβράνη τοποθετείται σε Blocking solution για 1h (ή 8-12h στους 4°C).

Το Blocking solution απομακρύνεται και η μεμβράνη τοποθετείται σε πρωτογενές αντίσωμα κατάλληλης συγκέντρωσης όπου και παραμένει για 1h (ή 8-12h στους 4°C) ενώ ταυτόχρονα αναδεύεται.

Η μεμβράνη ξεπλένεται με TBST έξι φορές. Το κάθε ξέπλυμα διαρκεί 5min.

Το δευτερογενές αντίσωμα προστίθεται στη μεμβράνη και παραμένει για 1-1.30h.

Το δευτερογενές αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη ξεπλένεται σε TBST έξι φορές, με το κάθε ξέπλυμα να διαρκεί 10min.

Η μεμβράνη ξεπλένεται σε TBS για 5min.

Ακλουθεί ανίχνευση του σήματος.

### **Blocking solution**

5% non-fat milk διαλυμένο σε TBST

Τα διαλύματα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα μελέτη παρουσιάζονται παρακάτω:

### **Πρωτογενές αντίσωμα anti c-myc:**

sc-47694, 1:200 σε blocking solution

### **Πρωτογενές αντίσωμα anti HA:**

sc-7392, 1:200 σε blocking solution

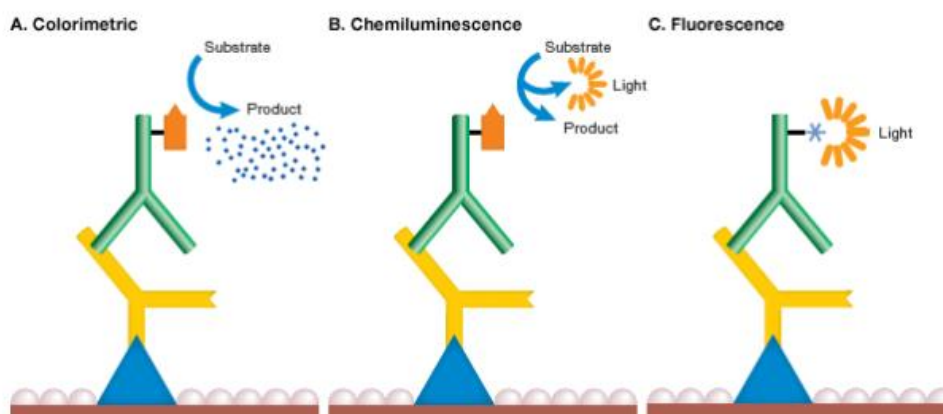
### **Δευτερογενές αντίσωμα anti mouse:**

sc-2005, 1:3000 σε blocking solution

### 2.5.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Η ανίχνευση σήματος στηρίζεται στο ότι στο δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο κάποιο ένζυμο (π.χ. Alkaline Phosphate AP ή κάποια υπεροξειδάση). Η προσθήκη κατάλληλου κάθε φορά υποστρώματος και η παραγωγή προϊόντος είναι αυτή που δίνει το σήμα της αντίδρασης (π.χ. φως), με αποτέλεσμα την ανίχνευση της πρωτεΐνης.

Η ανίχνευση μπορεί να γίνει: (α) μέσω χρωμογόνου αντίδρασης, (β) μέσω αντίδρασης χημειοφωταύγειας και (γ) μέσω φθορισμού (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18:** Μηχανισμοί ανίχνευσης χημικών. Σε κάθε μέθοδο ανίχνευσης δημιουργείται ένα ανιχνεύσιμο σήμα μετά τη σύνδεση ενός αντισώματος εξειδικευμένου για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Α. Στη χρωματομετρική ανίχνευση το σήμα είναι ένα χρωματιστό ίζημα. Β. Στη χημειοφωταύγεια η ίδια η αντίδραση εκπέμπει φως. Γ. Στην ανίχνευση φθορισμού, το αντίσωμα επισημαίνεται με φθοροφόρο.

#### 2.5.3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Η ανίχνευση πραγματοποιείται για τον εντοπισμό του δευτερογενούς αντισώματος μέσω μιας αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Ως χημειοφωταύγεια περιγράφεται η εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας ως αποτέλεσμα της μετάβασης συγκεκριμένων διεγερμένων χημικών ουσιών στη βασική τους κατάσταση. Η ανίχνευση σήματος μέσω αντιδράσεων χημειοφωταύγειας αποτελεί μια μέθοδο ευαίσθητη και γρήγορα.

Η υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia rusticana* (horseradish), HRP, είναι μια πρωτεΐνη η οποία έχει τη δυνατότητα συμμετοχής σε αντιδράσεις χημειοφωταύγειας. Η HRP παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, προκαλεί μια κυκλική αντίδραση χημειοφωταύγειας η οποία έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση του υποστρώματος, luminol, σε μια διεγερμένη μορφή (3-aminophthalate). Καθώς η ουσία αυτή επιστρέφει στη βασική της κατάσταση εκπέμπει μπλε ακτινοβολία, στα 428nm, η οποία μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό film.

## 2.5.4 ΧΡΩΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

### 2.5.4.1 ΧΡΩΣΗ ΜΕ PONCEAU S

Το διάλυμα της χρωστικής Ponceau S χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν ακινητοποιηθεί σε μεμβράνη (PVDF, nitrocellulose κλπ). Η χρώση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο αυτή είναι αντιστρέψιμη και η ευαισθησία της είναι υψηλή. Η εν λόγω χρωστική είναι χαρακτηρίζεται από αρνητικό φορτίο στο οποίο και οφείλεται η πρόσδεσή της με τις θετικά φορτισμένες ομάδες αμινοξέων των πρωτεϊνών.

Η μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες εμβαπτίζεται σε επαρκή ποσότητα διαλύματος χρωστικής Ponceau S και παραμένει εκεί για 5min περίπου ενώ ταυτόχρονα αναδεύεται ήπια.

Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με ddH<sub>2</sub>O έως ότου οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανιστούν (ροζ ζώνες) και το background καθαρίσει (λευκό).

Η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ανίχνευση των πρωτεϊνών.

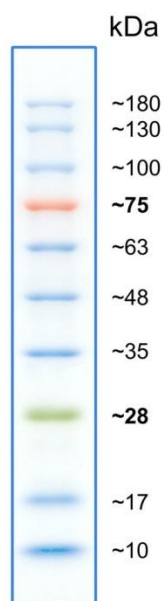
Τέλος η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει.

#### Διάλυμα Ponceau S

0.5% w/v Ponceau S, 1% w/v Acetic acid

## 2.6 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΓΕΘΩΝ

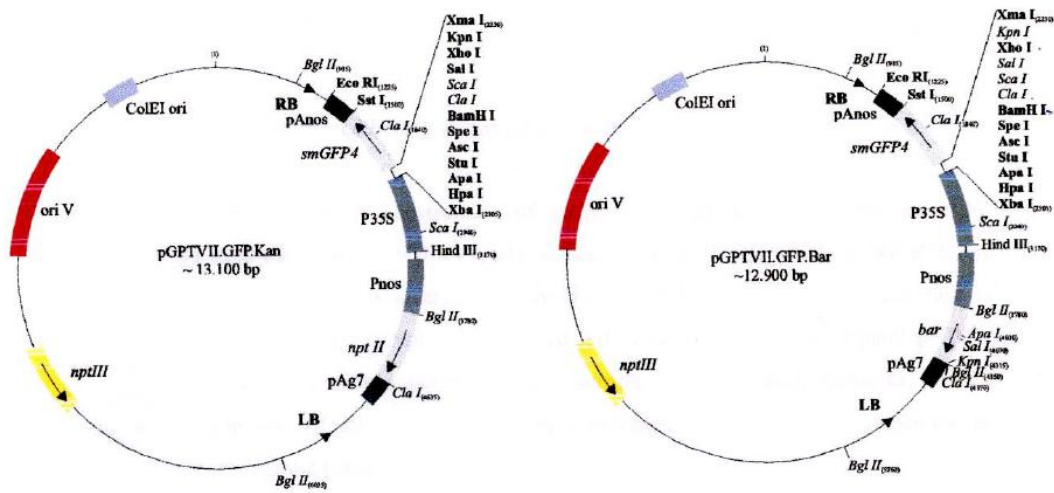
Για την οπτικοποίηση των μεγεθών των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορούνται χρησιμοποιείται ένας δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο BlueStar Prestained Protein Marker της Nippon Genetics (MWP03), (**Εικόνα 19**). Ο συγκεκριμένος marker έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό των μοριακών μεγεθών πρωτεϊνικών μορίων που διαχωρίζονται κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Χρησιμοποιείται επιπλέον για την αξιολόγηση της απόδοσης μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνες (western transfer).



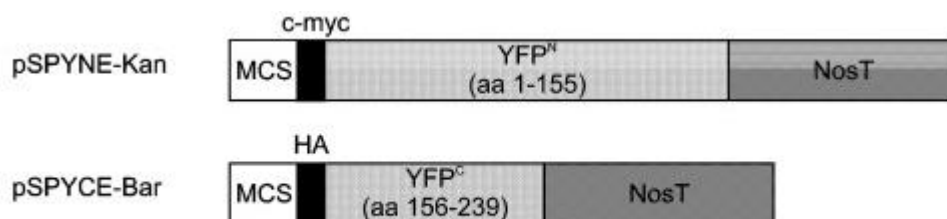
**Εικόνα 19:** BlueStar Prestained Protein Marker, Nippon Genetics (MWP03).

## 2.7 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ pSPYNE και pSPYCE

Οι πλασμιδιακοί φορείς pSPYNE και pSPYCE είναι τεχνητοί φορείς που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της τεχνολογίας του BiFC με σκοπό την οπτικοποίηση αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε πρωτεΐνες σε ζωντανά ζωικά ή φυτικά κύτταρα. Οι πλασμιδιακοί φορείς περιέχουν το άμινο-τελικό και το καρβόξυ-τελικό αντίστοιχα άκρο της πρωτεΐνης φθορισμού, όπως υποδηλώνουν και τα ονόματά τους: pSPYNE (split YFP N-terminal fragment expression) και pSPYCE (split YFP C-terminal fragment expression). Και οι δύο πλασμιδιακοί φορείς περιέχουν τον καθολικό προαγωγέα 35S. Επιπλέον διαθέτουν μια περιοχή αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού MCS (Multiple Cloning Site) για τη διευκόλυνση κλωνοποίησης τμημάτων DNA (Εικόνα 19). Κάθε ένας από τους φορείς παρέχει τη δυνατότητα της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται συντηγμένες στο άμινο-τελικό (YFPN) ή στο καρβόξυ-τελικό (YFPC) άκρο της πρωτεΐνης YFP. Επιπλέον οι δύο φορείς διαθέτουν αντίστοιχα τις περιοχές c-myc και HA, οι οποίες χρησιμεύουν ως «σήμανση» στις παραγόμενες πρωτεΐνες. Τέλος, τόσο ο pSPYNE όσο και ο pSPYCE χαρακτηρίζονται από την παρουσία του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα 20).

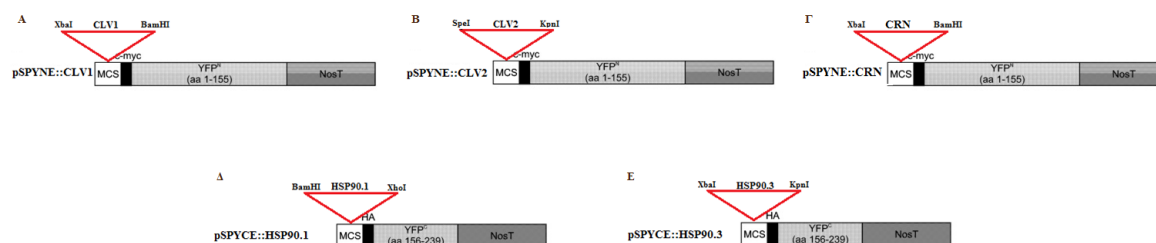


Εικόνα 20: Οι πλασμιδιακοί φορείς pSPYNE και pSPYCE.



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση των φορέων pSPYNE και pSPYCE.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα γονίδια *HSP90.1*, *HSP90.3*, *CLV1*, *CLV2* και *CLV3* κλωνοποιήθηκαν όπως φαίνεται στις εικόνες.



**Εικόνα 22:** Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν. Α. pSPYNE::CLV1, Β. pSPYNE::CLV2, Γ. pSPYNE::CRN, Δ. pSPYCE::HSP90.1 και Ε. pSPYCE::HSP90.3.

Όπως παρουσιάζεται στις εικόνες οι χημεικές πρωτεΐνες που θα παραχθούν θα αποτελούνται από τρεις περιοχές. Ουσιαστικά η πρωτεΐνες που μελετώνται, η κωδική περιοχή των οποίων έχει κλωνοποιηθεί όπως φαίνεται παραπάνω, βρίσκονται σε σύντηξη με το επιτόπιο c-myc ή HA και με την αμινο- ή καρβόξυ- τελική υπομονάδα της πρωτεΐνης GFP.

Έτσι τα αντίστοιχα μεγέθη των παραγόμενων πρωτεϊνών παρουσιάζονται παρακάτω:

#### ΜΕΓΕΘΗ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

<b>CLV1</b>	CLV1 + c-myc + YFP <sup>N</sup>	126kDa
<b>CLV2</b>	CLV2 + c-myc + YFP <sup>N</sup>	97.2kDa
<b>CRN</b>	CRN + c-myc + YFP <sup>N</sup>	61.8kDa
<b>HSP90.1</b>	HSP90.1 + HA + YFP <sup>C</sup>	87.9kDa
<b>HSP90.3</b>	HSP90.3 + HA + YFP <sup>C</sup>	87.2kDa

Πίνακας 10: Μοριακά μεγέθη παραγόμενων πρωτεϊνών.

## 2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΑΠΟ SILIQUES ARABIDOPSIS

Φυτά *Arabidopsis* αναπτύσσονται στο χώμα για 20-30 ημέρες.

Απομακρύνονται *siliques* διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων.

Τα *siliques* ανοίγονται με τη βοήθεια νυστεριού και βελόνας κάτω από στερεοσκόπιο.

Οι εμβρυόσακοι απελευθερώνονται και συλλέγονται σε καθαρό φιαλίδιο *ependorf*.

Οι εμβρυόσακοι μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Πιέζοντας σταδιακά την καλυπτρίδα οι εμβρυόσακοι σπάνε και τα έμβρυα απελευθερώνονται.

Ακολουθεί παρατήρηση των εμβρύων στο μικροσκόπιο.

Τα έμβρυα παραμένουν στο φιαλίδιο *ependorf* και στην αντικειμενοφόρο πλάκα, μέσα σε διάλυμα MS.

Σε περίπτωση χειρισμού, ο χειρισμός πραγματοποιείται στο στάδιο που οι εμβρυόσακοι βρίσκονται στο φιαλίδιο *ependorf*.

## 2.9 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕ GDA

Οι απομονωμένοι εμβρυόσακοι βρίσκονται στο φιαλίδιο *ependorf* σε διάλυμα MS.

Κατάλληλη ποσότητα του αναστολέα GDA (GELDANAMYCIN >99% της εταιρίας LC Laboratories) προστίθεται στο διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 2μM και 4μM.

Ακολουθεί εφαρμογή συνθηκών κενού για 5min.

Όλος ο χειρισμός πραγματοποιείται σε συνθήκες απουσίας φωτός, καθώς το GDA είναι φωτοευαίσθητο και φωτοδιασπόμενο.

Τα έμβρυα παραμένουν σε συνθήκες σκότους για όση ώρα χρειάζεται κάθε φορά (2h, 6h, 12h), μέχρι την παρατήρηση.

Στην παρούσα μελέτη τα έμβρυα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο με τη χρήση ορατού φίλτρου και κάτω από έκθεση σε UV.

Η χρήση της UV είναι απαραίτητα καθώς στα έμβρυα *pCLV3::GFP* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, χαρακτηρίζονται από την έκφραση της πρωτεΐνης GFP υπό τον έλεγχο του προαγωγέα του γονιδίου *CLV3*. Απαραίτητη λοιπόν προϋπόθεση για την παρατήρηση λοιπόν της πρωτεΐνης-μάρτυρα GFP, είναι η έκθεση σε UV καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκπέμπει πράσινο φθορισμό όταν εκτίθεται σε αυτή την ακτινοβολία.

### Διάλυμα GDA 2μM/4μM:

2μM/4μM GDA (LC Laboratories) σε MS





# ΑΓΙΟΤΕΡΕΩΣΜΑΤΑ



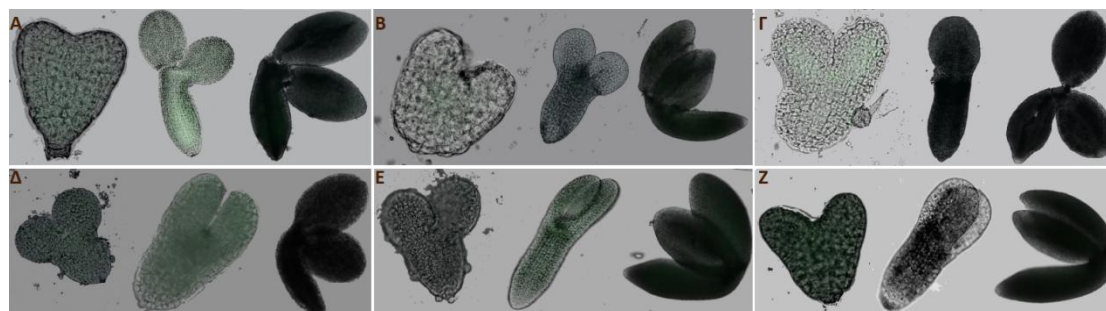


### 3.1 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ *Arabidopsis* με GDA

Μέσα από την παρούσα μελέτη διερευνάται η συμβολή το HSP90 πρωτεϊνών σε στη μεταγωγή σιγιάλων σε αναπτυξιακά μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται η συμμετοχή και ο ρόλος των HSP90 στο μονοπάτι CLAVATA-WUSCHEL που ελέγχει τη μοίρα των βλαστικών κυττάρων του AMB και συνεπώς έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη του φυτού. Προηγούμενα δεδομένα μαρτυρούν την εμπλοκή των HSP90 στο συγκεκριμένο μηχανισμό ρύθμισης, μέσω του ελέγχου που ασκούν στην έκφραση του *CLV3*. Φυτά *Arabidopsis* που χαρακτηρίζονται από έλλειψη των HSP90 παρουσιάζουν εκτοπική έκφραση του πεπτιδίου *CLV3*. Τα συγκεκριμένα φυτά προέκυψαν έπειτα από διασταύρωση *RacRNAi* μεταλλαγμάτων, στα οποία έχει γίνει σίγηση των κυτταροπλασματικών μελών των HSP90, με μόνιμα μετασηματισμένα φυτά με την κατασκευή *pCLV3::GFP*. Στα τελευταία, η πρωτεΐνη φθορισμού GFP χρησιμεύει ως μάρτυρας, και η έκφρασή της ελέγχεται από τον προαγωγέα του *CLV3* γονιδίου. Έτσι η παρατήρηση των *pCLV3::GFP* φυτών με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού αποτελεί ένα τρόπο προσδιορισμού των κυττάρων στα οποία η πρωτεΐνη *CLV3* εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Έμβρυα των παραπάνω φυτών παρουσίασαν φθορισμό στα κύτταρα του AMB όπου και εκφράζεται το *CLV3*. Σε έμβρυα των διασταυρωμένων όμως φυτών, όπου τα επίπεδα των HSP90 δεν είναι επαρκή, ο φθορισμός παρουσίασε ένα πρότυπο διάχυσης υποδηλώνοντας πως το πρότυπο έκφρασης του πεπτιδίου *CLV3* διαταράσσεται. Η παρουσία των HSP90 λοιπόν είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της έκφρασης του εν λόγω πεπτιδίου.

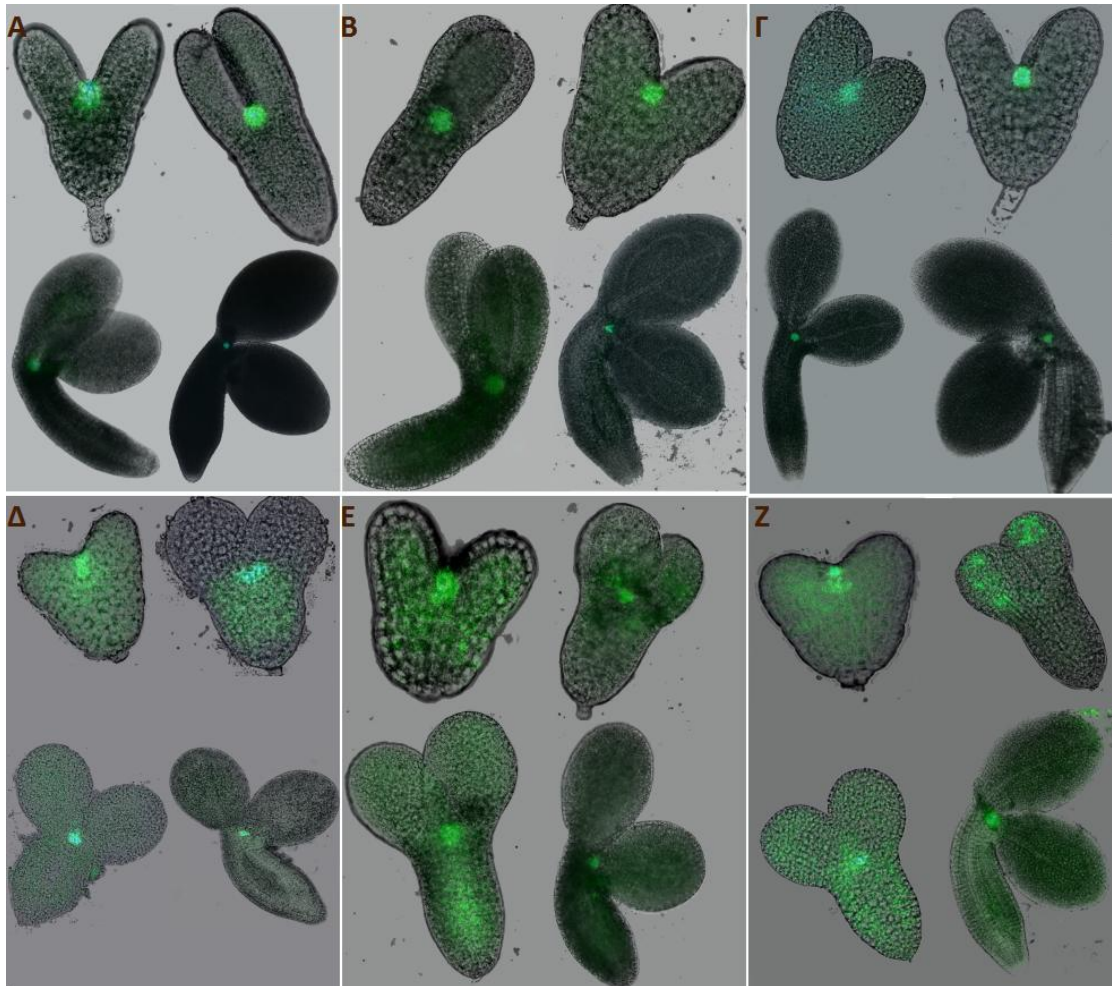
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί αν η φαρμακολογική αναστολή της δράσης των HSP90 με τη χρήση του αναστολέα GDA επηρεάζει την έκφραση του πεπτιδίου *CLV3* άρα και το αναπτυξιακό μονοπάτι CLAVATA-WUSCHEL.

Έμβρυα φυτών αγρίου τύπου *L.er* απομονώθηκαν και υπέστησαν τον χειρισμό με GDA όπως τα έμβρυα φυτών *pCLV3::GFP*. Αυτό έγινε προκειμένου να ταυτοποιηθεί ότι οι παρατηρήσεις στα *pCLV3::GFP* έμβρυα οφείλονται αποκλειστικά στην επίδραση του αναστολέα των HSP90 πρωτεϊνών, GDA, και όχι σε άλλους παράγοντες (π.χ. χειρισμός, έκθεση σε UV κλπ.), καθώς και ότι τα έμβρυα παραμένουν ζωντανά καθόλη τη διάρκεια του χειρισμού και της παρατήρησης.

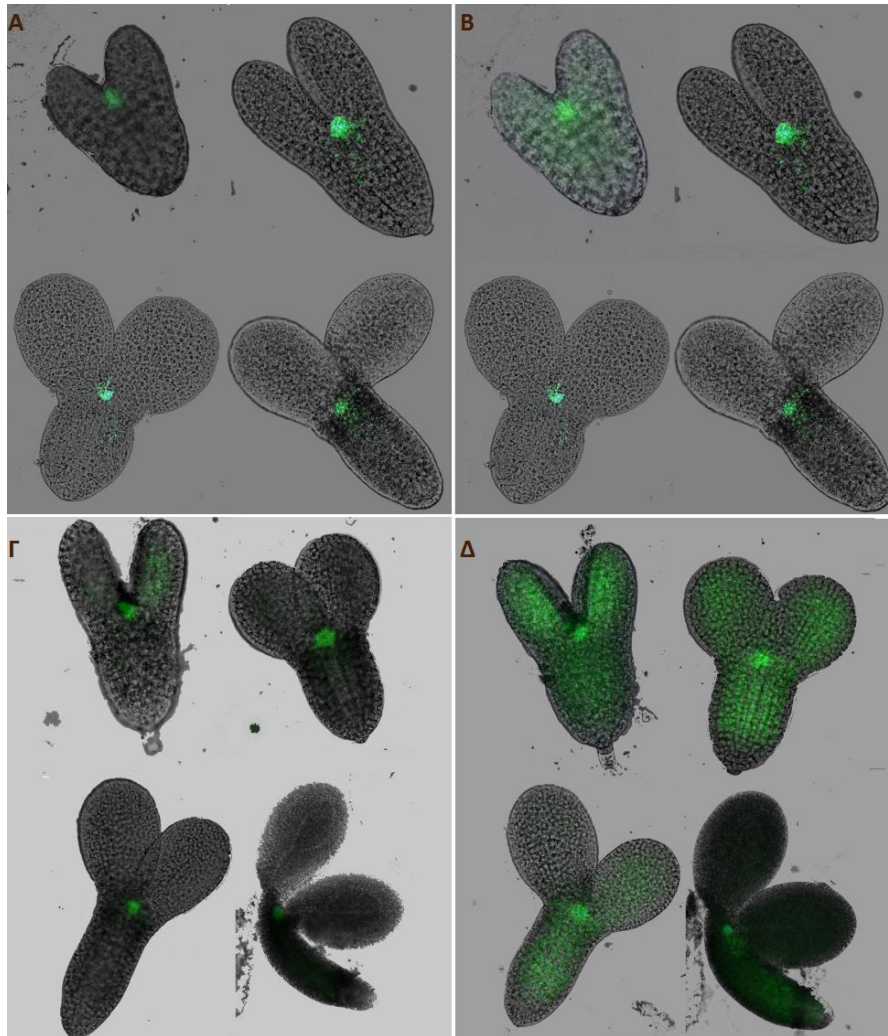


**Εικόνα 23:** Έμβρυα αγρίου τύπου *L.er*. Επάνω: Έμβρυα απουσία GDA έπειτα από Α. 2h, Β. 6h και Γ. 12h Κάτω: Έμβρυα παρουσία 2μM GDA έπειτα από Δ. 2h, Ε. 6h και Ζ. 12h

Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και σε έμβρυα σειρών *pCLV3::GFP*, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του GDA σε αυτά. Αξίζει να σημειωθεί πως ακόμα και στα έμβρυα μη μετασηματισμένων φυτών παρατηρείται μικρή ένταση πράσινο background το οποίο δεν αποτελεί πραγματικό σήμα αλλά οφείλεται στην ύπαρξη χλωροφύλλης στα έμβρυα, ο αυτοφθορισμός της οποίας περνά κατά ένα ποσοστό και στο φίλτρο της UV.



**Εικόνα 24:** Έμβρυα *pCLV3::GFP*. Επάνω: Έμβρυα απουσία GDA έπειτα από Α. 2h, Β. 6h και Γ. 12h Κάτω: Έμβρυα παρουσία 2μM GDA έπειτα από Α. 2h, Β. 6h και Γ. 12h



**Εικόνα 25:** Έμβρυα *pCLV3::GFP*. Επάνω: Έμβρυα απουσία GDA Α. τη χρονική στιγμή 0 και Β. έπειτα από 6h. Κάτω: Έμβρυα παρουσία 4μM GDA Γ. τη χρονική στιγμή 0 και Δ. έπειτα από 6h.

Τα έμβρυα φυτών αγρίου τύπου δεν παρουσίασαν κάποιο φθορισμό, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς δεν υπάρχει η κατασκευή με την πρωτεΐνη GFP στην οποία και οφείλεται το σήμα (**Εικόνα 23**). Στα έμβρυα των μετασχηματισμένων φυτών, παρατηρείται φθορισμός στο AMB οποίος οφείλεται στη μεταγραφική σύντηξη της πρωτεΐνης GFP με τον προαγωγές του *CLV3*, και φανερώνει την περιοχή του AMB όπου το *CLV3* εκφράζεται (**Εικόνα 24 Α, Β, Γ**). Όπως φαίνεται από τις εικόνες ο φθορισμός δεν επηρεάζεται και δε μεταβάλλεται με το πέρας της ώρας, αλλά παραμένει σταθερός κατά την παρατήρηση των εμβρύων 2h, 6h και 12h μετά την απομόνωσή τους. Αντίθετα, χειρισμός των εμβρύων με GDA 2μM για 2h, 6h και 12h, μεταβάλλει το πρότυπο του φθορισμού προκαλώντας διάχυση. Η διάχυση αυτή υποδηλώνει την επίδραση του αναστολέα, επομένως της έλλειψης δράσης των HSP90, στην έκφραση του *CLV3*, η οποία φαίνεται να συμβαίνει εκτοπικά (**Εικόνα24 Δ, Ε, Ζ**). Όπως φαίνεται από τις εικόνες, η διάχυση είναι εντονότερη με την πάροδο του χρόνου. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του παρεμποδιστή σε 4μM η παρατήρηση των ίδιων εμβρύων τη χρονική στιγμή 0 αλλά και έπειτα από 6h, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την πρόκληση διάχυσης, στα έμβρυα των μετασχηματισμένων φυτών (**Εικόνα 25**).

### 3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ CLV1, CLV2 ΚΑΙ CRN ΣΕ ΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΟΔΙΚΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Ο ρόλος των HSP90 στην αντίληψη αναπτυξιακών σιγνάλων και πιο συγκεκριμένα στην αντίληψη του πεπτιδίου σιγνάου CLV3 για τον έλεγχο των βλαστικών κυττάρων του AMB, φανερώνεται και μέσα από την άμεση αλληλεπίδραση των HSP90 με τις πρωτεΐνες-υποδοχείς της μεταγωγικής οδού. Προηγούμενα στοιχεία υποστηρίζουν τη δυνατότητα ανίχνευσης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις HSP90 και στις πρωτεΐνες CLV1, CLV2 και CRN που διαμορφώνουν τα απαραίτητα σύμπλοκα δια την αντίληψη του ολιγοπεπτιδίου CLV3.

Προσωπική μελέτη που είχε προηγηθεί στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ, υποδεικνύει τη δυνατότητα ανάπτυξης αλληλεπιδράσεων των κυτταροπλασματικών μελών HSP90.1 και HSP90.3 με τις LRR πρωτεΐνες CLV1 και CLV2 καθώς και με την πρωτεΐνη με ρόλο κινάσης CRN. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της τεχνικής BiFC σε πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν από παροδικά μετασχηματισμένα φυτά *Nicotiana benthamiana*.

Έτσι, έναν από τους στόχους της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η επιβεβαίωση ύπαρξης των προαναφερθέντων αλληλεπιδράσεων μέσω της μεθόδου της ανοσοκατακρίμησης πρωτεϊνών. Για την ανοσοκατκρίμηση χρησιμοποιήθηκε και πάλι ιστός φύλλων *Nicotiana benthamiana* όπου είχε προηγηθεί παροδικός μετασχηματισμός για τη συνέκφραση των πρωτεϊνών, η αλληλεπίδραση των οποίων εξετάζεται κάθε φορά.

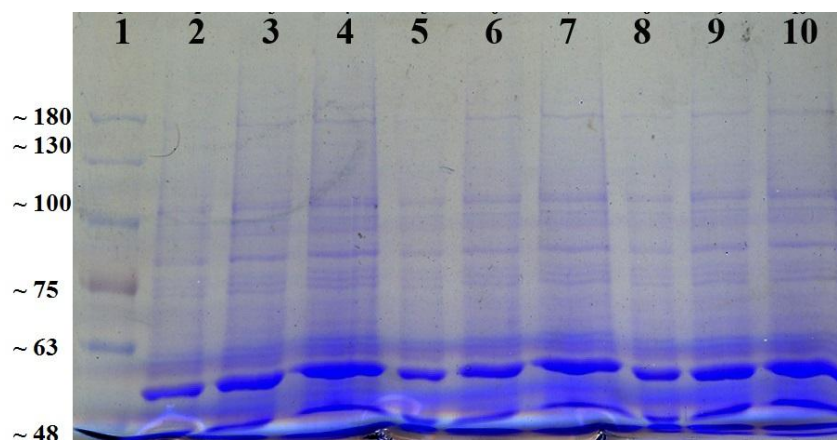
Σε πρώτο στάδιο έγινε προσπάθεια απομόνωσης και ανίχνευσης των πρωτεϊνών CLV1, CLV2 και CRN από φύλλα στα οποία εκφράστηκαν μέσω παροδικού μετασχηματισμού. Επιπλέον στο στάδιο αυτό αναλύθηκαν μόνο τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (inputs) χωρίς να ακολουθήσει η διαδικασία του co-IP.

Δείγματα input των απομονώσεων για τις πρωτεΐνες CLV1, CLV2 και CRN αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6%. Δείγματα ίσης συγκέντρωσης και ίσης ποσότητας αναλύθηκαν ταυτόχρονα σε δύο πανομοιότυπες πηκτές. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μία πηκτή υπέστη χρώση με CBB και η άλλη χρησιμοποιήθηκε για μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.

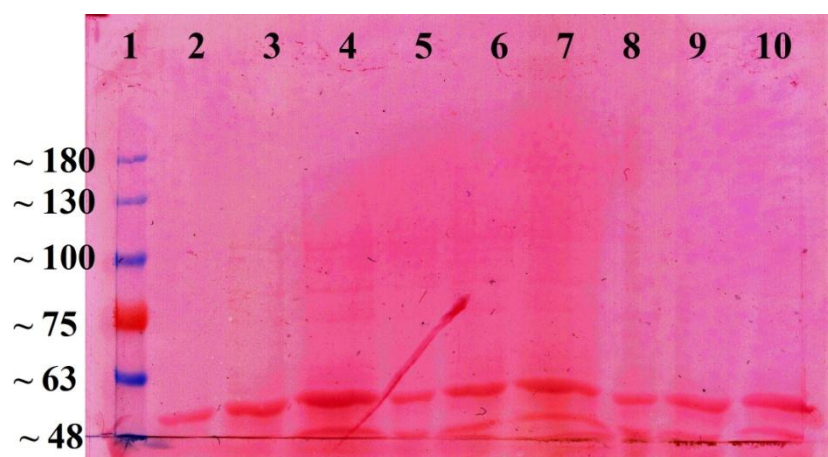
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 18mA και 285V ενώ το transfer στα 80mA και 14V για 45min.

Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των αντισωμάτων anti c-myc και anti mouse. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες CLV1, CLV2 και CRN, όπως έχει αναφερθεί, είναι συντηγμένες με το επιτόπιο c-myc, γι' αυτό και η ανοσοανίχνευσή τους έγινε με τη χρήση του πρωτογενούς αντισώματος anti c-myc. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει εξειδικευμένα το επιτόπιο και προσδένεται σε αυτό. Με τη σειρά του το πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζεται από το δευτερογενές αντίσωμα anti mouse. Για την κάθε πρωτεΐνη αναλύθηκαν 3 δείγματα, σε κάθε ένα από τα οποία η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας βρισκόταν σε διαφορετική συγκέντρωση. Η ανάλυση των 3 διαφορετικών αραιώσεων αποσκοπούσε στην επιβεβαίωση της

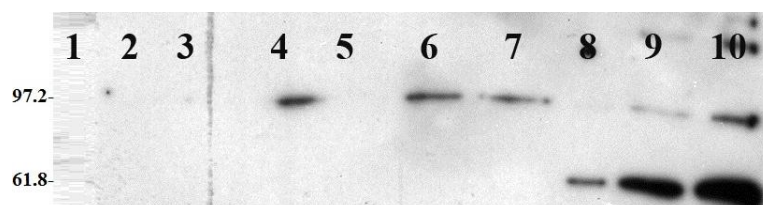
δυνατότητας ανίχνευσης της πρωτεΐνης και στην ανάδειξη της ελάχιστης δυνατής ποσότητας στην οποία η ανίχνευση της πρωτεΐνης είναι ικανοποιητική.



**Εικόνα 26:** Ανάλυση πρωτεϊνών σε 6% πηκτή ακρυλαμίδης. 1. Protein marker 4μl 2. CLV1 in 6μl 3. CLV1 in 12μl 4. CLV1 in 20μl 5. CLV2 in 6μl 6. CLV2 in 12μl 7. CLV2 in 20μl 8. CRN in 6μl 9. CRN in 12μl 10. CRN in 20μl



**Εικόνα 27:** Χρώση Ponceau S της μεμβράνης PVDF. 1. Protein marker 4μl 2. CLV1 in 6μl 3. CLV1 in 12μl 4. CLV1 in 20μl 5. CLV2 in 6μl 6. CLV2 in 12μl 7. CLV2 in 20μl 8. CRN in 6μl 9. CRN in 12μl 10. CRN in 20μl



**Εικόνα 28:** Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών μετά από 1min έκθεση. 1. Protein marker 4μl 2. CLV1 in 6μl 3. CLV1 in 12μl 4. CLV1 in 20μl 5. CLV2 in 6μl 6. CLV2 in 12μl 7. CLV2 in 20μl 8. CRN in 6μl 9. CRN in 12μl 10. CRN in 20μl



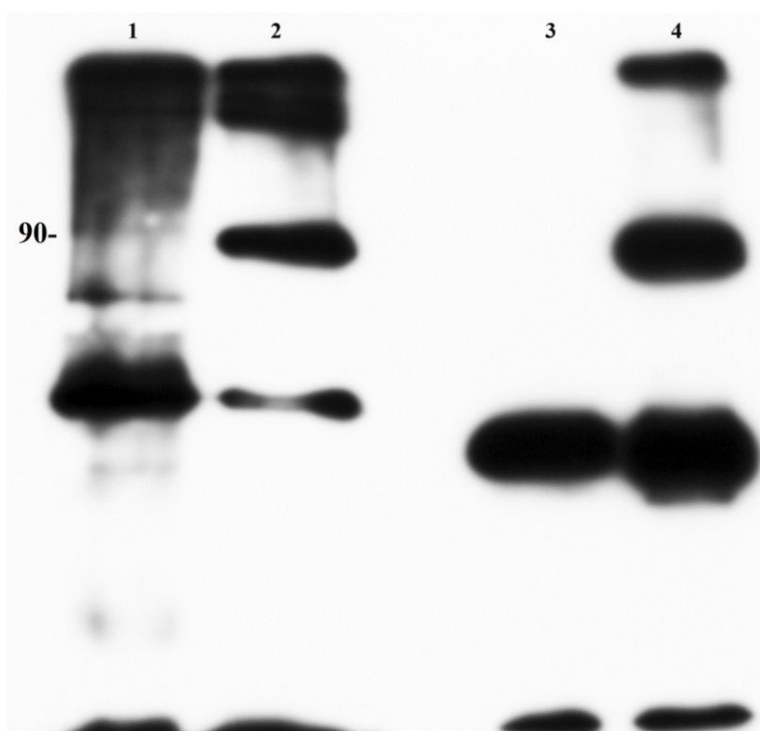
Όπως παρουσιάζεται στην παραπάνω εικόνα τα δείγματα που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη CRN ήταν θετικά. Η ύπαρξη ζώνης και στις 3 αραιώσεις στο αναμενόμενο μέγεθος, δηλαδή στα 61.8kDa, μαρτυρούν την ύπαρξη της πρωτεΐνης στα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν. Αντίθετα η πρωτεΐνη CLV1 δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις συγκεντρώσεις, υποδεικνύοντας την απουσία της πρωτεΐνης στα αντίστοιχα εκχυλίσματα. Τέλος, στα δείγματα που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα της πρωτεΐνης CLV2 εντοπίζεται ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος των 97.2kDa. Ωστόσο λόγω της ύπαρξης ζωνών και στα δείγματα που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη CRN, σε παρόμοιο μέγεθος, η ύπαρξη της πρωτεΐνης CLV2 χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση.

### 3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ HSP90.3 ΚΑΙ CRN

Με βάση την παραπάνω εικόνα, τα δείγματα input των απομονώσεων για την πρωτεΐνη CRN, τα οποία ήταν θετικά, επιλέχθηκαν για τη συνέχεια του πειράματος.

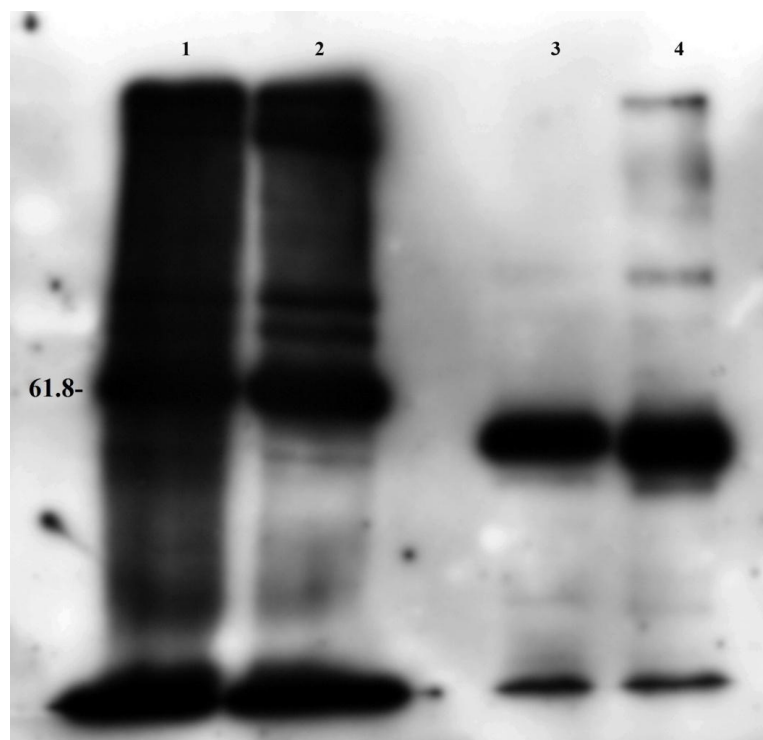
Παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού για την έκφραση της πρωτεΐνης CRN αλλά και για τη συνέκφραση των πρωτεϊνών CRN και HSP90.3 χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών. Μέρος των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κρατήθηκε (inputs) ενώ το υπόλοιπο υπέστη τη διαδικασία της ανοσοκατακρίμνισης (co-IP) προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες.

Δείγματα input από ιστό όπου εκφραζόταν μόνο η πρωτεΐνη CRN αλλά και από ιστό όπου οι δύο πρωτεΐνες συνεκφράζονταν, καθώς και δείγματα από τους ίδιους ιστούς μετά το πέρας της ανοσοκατακρίμνισης, ηλεκτροφορήθηκαν στα 18mA και 285V και ακολούθησε transfer στα 80mA και 14V για 45min. Ακολούθησε ανίχνευση των πρωτεϊνών HSP90.3 και CRN με τα αντισώματα anti HA και anti c-myc αντίστοιχα. Μέσα από τη διαδικασία αυτή πιστοποιήθηκε η ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα δύο πρωτεϊνικά μόρια.



**Εικόνα 29:** Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης HSP90.3 έπειτα από 1min έκθεση. 1. CRN in 12μl 2. CRN-HSP90.3 in 12 μl 3. CRN ip 12μl 4. CRN-HSP90.3 ip 12μl

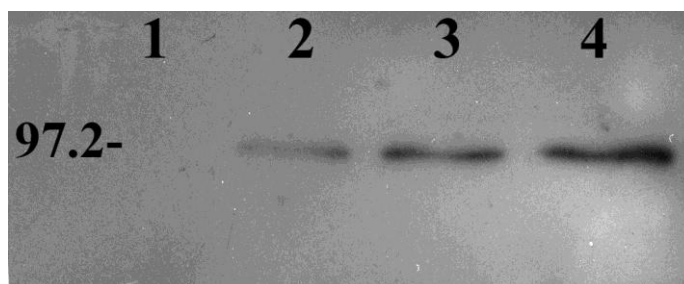
Σύμφωνα με τα αναμενόμενα, στα δείγματα που προήλθαν από φυτά που είχαν μετασχηματιστεί μόνο με την κατασκευή για την πρωτεΐνη CRN, η ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti HA το οποίο ανιχνεύει την πρωτεΐνη HSP90.3, δεν παρατηρήθηκε ζώνη. Αντίθετα, στα μετασχηματισμένα φυτά όπου οι πρωτεΐνες CRN και HSP90.3 συνεκφράζονταν, ανιχνεύτηκε ζώνη στο αναμενόμενο για την HSP90.3 μέγεθος. Στη συνέχεια, η ανοσοανίχνευση με τον αντίσωμα anti c-myc, το οποίο αναγνωρίζει την πρωτεΐνη CRN, οδήγησε στην εμφάνιση ζώνης τόσο στα δείγματα των φυτών που εκφραζόταν μόνο η CRN όσο και στα δείγματα των φυτών που οι πρωτεΐνες συνεκφράζονταν. Η ανίχνευση και των δύο πρωτεϊνών μετά την ανοσοκατακρίμνηση υποδηλώνει την αλληλεπίδρασή τους.



**Εικόνα 30:** Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης CRN έπειτα από 5min έκθεση. 1. CRN in 12μl 2. CRN-HSP90.3 in 12 μl 3. CRN ip 12μl 4. CRN-HSP90.3 ip 12μl

### 3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CLV2 ΣΕ ΦΥΤΑ ΚΑΠΝΟΥ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΟΔΙΚΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 28, δεν παρέχει ξεκάθαρα δεδομένα σχετικά με την πρωτεΐνη CLV2. Έτσι προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής απομόνωση και η ύπαρξη της πρωτεΐνης CLV2 από τα παροσδικά μετασχηματισμένα φύλλα στα οποία εκφραζόταν, πραγματοποιήθηκε ακόμη μια ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολύ ακρυλαμίδης. Αυτή τη φορά ηλεκτροφορήθηκαν 4 δείγματα, σε καθένα από τα οποία η πρωτεΐνη βρισκόταν σε διαφορετική συγκέντρωση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 18mA και 285V και ακολούθησε transfer στα 80mA και 14V για 45min. Η ανοσοανίχνευση βασίστηκε την αναγνώριση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης από το πρωτογενές αντίσωμα anti c-myc, λόγω ύπαρξης του αντίστοιχου επιτοπίου.



**Εικόνα 31:** Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης CLV2 έπειτα από 2min έκθεση. 1.CLV2 in 3µl 2.CLV2 in 6µl 3.CLV2 in 9µl 4.CLV2 in 12µl

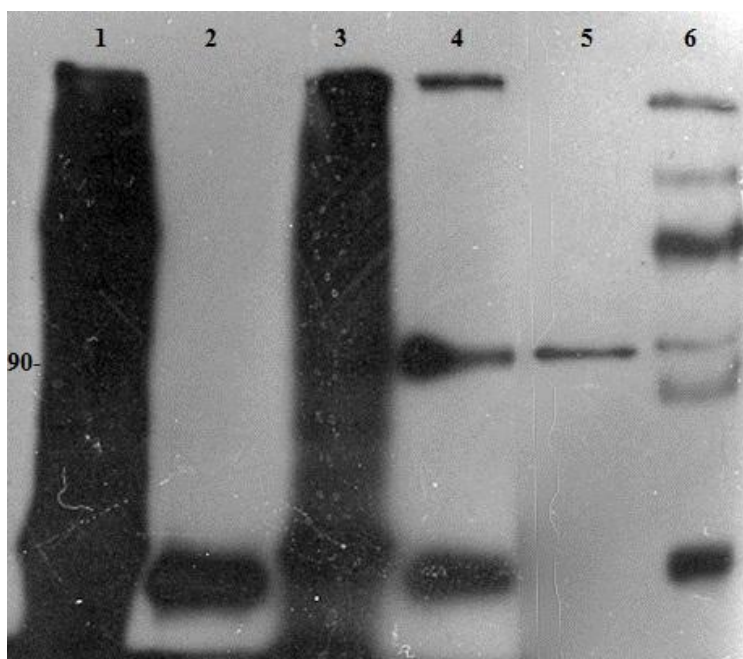
Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα, τα δείγματα ήταν θετικά, με την πρωτεΐνη να ανιχνεύεται στις 3 από της 4 αραιώσεις, στο αναμενόμενο μέγεθος των 97.2kDa. Η ένδειξη αυτή αποτέλεσε κίνητρο για τη συνέχεια της μελέτης και διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης CLV2 με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη HSP90.3.

### 3.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ HSP90.3 ΚΑΙ CLV2

Παροδικά μετασχηματισμένα φύλλα καπνού για την έκφραση της πρωτεΐνης CLV2 αλλά και για τη συνέκφραση των πρωτεϊνών CLV2 και HSP90.3 χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πρωτεϊνών. Μέρος των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κρατήθηκε (inputs) ενώ το υπόλοιπο υπέστη τη διαδικασία της ανοσοκατακρίμνης (co-IP) προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Δείγματα ίσης συγκέντρωσης και ίσης ποσότητας αναλύθηκαν ταυτόχρονα σε δύο πανομοιότυπες πηκτές.

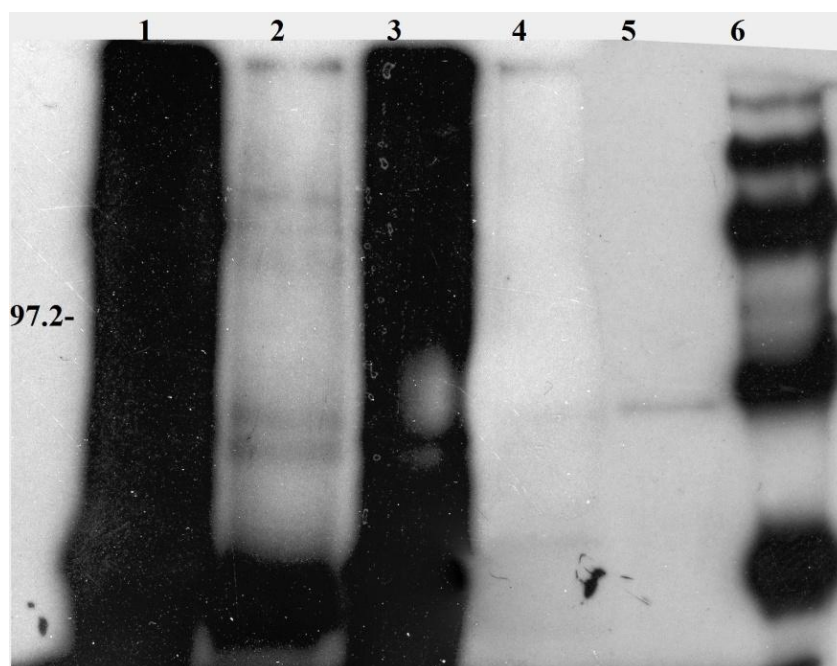
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 18mA και 285V σε πηκτική πολυακρυλαμίδης περιεκτικότητας 6%, ενώ η μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF πραγματοποιήθηκε στα 80mA και 14V για 45min.

Ακολούθησε ανίχνευση των πρωτεϊνών HSP90.3 και CLV2 με τα αντισώματα anti HA και anti c-myc αντίστοιχα. Μέσα από τη διαδικασία αυτή πιστοποιήθηκε η ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα δύο πρωτεϊνικά μόρια.



**Εικόνα 32:** Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης HSP90.3 έπειτα από 1min έκθεση. 1. CLV2 in 8μl 2. CLV2 ip 16 μl 3. HSP90.3 in 8μl 4. HSP90.3 ip 16μl 5. CLV2-HSP90.3 in 8μl 6. CLV2-HSP90.3 ip 8μl

Σύμφωνα με τα αναμενόμενα, στα δείγματα που προήλθαν από φυτά που είχαν μετασχηματιστεί μόνο με την κατασκευή για την πρωτεΐνη CLV2, κατά την ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti HA το οποίο ανιχνεύει την πρωτεΐνη HSP90.3, δεν παρατηρήθηκε ζώνη. Αντίθετα, στα μετασχηματισμένα φυτά όπου εφραζόταν μόνο η πρωτεΐνη HSP90.3 αλλά και στα φυτά όπου οι πρωτεΐνες CLV2 και HSP90.3 συνεκφράζονταν, ανιχνεύτηκε ζώνη στο αναμενόμενο για την HSP90.3 μέγεθος. Στη συνέχεια, η ανοσοανίχνευση με τον αντίσωμα anti c-myc, το οποίο αναγνωρίζει την πρωτεΐνη CLV2, οδήγησε στην εμφάνιση ζώνης τόσο στο δείγμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των φυτών που εκφραζόταν μόνο η CLV2 όσο και στα δείγματα των φυτών που οι πρωτεΐνες CLV2 και HSP90.3 συνεκφράζονταν. Η ανίχνευση και των δύο πρωτεϊνών μετά την ανοσοκατακρίμνηση υποδηλώνει την αλληλεπίδρασή τους.



**Εικόνα 33:** Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης CLV2 έπειτα από 2min έκθεση. 1. CLV2 in 8μl 2. CLV2 ip 16 μl 3. HSP90.3 in 8μl 4. HSP90.3 ip 16μl 5. CLV2-HSP90.3 in 8μl 6. CLV2-HSP90.3 ip 8μl

Αν και η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών CLV2 και HSP90.3 επιβεβαιώνεται μέσα από την προσέγγιση που αναφέρθηκε, φαίνεται πως στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των φυτών όπου αυτές οι πρωτεΐνες συνεκφράζονταν (input), η ανίχνευση των μορίων είναι αδύναμη. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται σε χαμηλή ποσότητα-συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυτών.



27247424







Οι HSP90 συνιστούν μια συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών τόσο μεταξύ των ευκαρυωτικών όσο και μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών. Απαντώνται στα κύτταρα ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες, επάγονται όμως κάτω από συνθήκες στρες όπως η θερμική καταπόνηση, γεγονός που εξηγεί και την ονομασία τους ως θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως σε φυσιολογικές συνθήκες απαντώνται στα κύτταρα σε ποσότητα 1-2% του συνόλου των πρωτεϊνών ενώ σε συνθήκες καταπόνησης η επαγωγή της έκφρασής τους ανεβάζει το αντίστοιχο ποσοστό σε 4-6% (Morimoto, 1998). Τα μέλη της οικογένειας HSP90 έχοντας το ρόλο του μοριακού συνοδού εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας διαδικασίες του κυττάρου.

Τα φυτά αποτελούν υψηλά διαφοροποιημένους οργανισμούς οι οποίοι στερούνται κίνησης. Έτσι είναι απαραίτητη η παρουσία ενός μηχανισμού που έχει ως κύριο ρόλο τη σταθεροποίηση της ανάπτυξης και την άμεση απόκριση στο συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον, εξασφαλίζοντας έτσι την επιβίωση του φυτού.

Οι πρωτεΐνες HSP90 συμμετέχουν στη σταθεροποίηση ενός δικτύου πρωτεϊνών “πελατών” (client proteins) που εμπλέκονται σε ποικίλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επηρεάζουν την ανάπτυξη (Samakovli *et al.*, 2007). Μέσα από τη δράση τους ως μοριακοί συνοδοί οι HSP90 αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που βρίσκονται σε κάποιο μεταβατικό στάδιο προάγοντας τη σωστή αναδίπλωσή τους προκειμένου να καταστούν λειτουργικές. Ανάμεσα στο πλήθος των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων συγκαταλέγονται πρωτεΐνες-ρυθμιστές πολύπλοκων αναπτυξιακών δικτύων.

Για το φυτό *Arabidopsis* είναι γνωστό πως διαθέτει επτά μέλη που ανήκουν στις HSP90 (Krishna and Gloor, 2001). Τα τέσσερα μέλη HSP90.1, HSP90.2, HSP90.3 και HSP90.4 χαρακτηρίζονται ως κυτταροπλασματικά, τα μέλη HSP90.5 και HSP90.6 ως χλωροπλαστικό και μιτοχονδριακό αντίστοιχα και τέλος το έβδομο μέλος, HSP90.7 απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Έχει παρατηρηθεί πως ελάττωση των αποθεμάτων των HSP90 αποσταθεροποιεί μηχανισμούς του φυτού και οδηγεί στη δημιουργία εύρους φαινοτύπων (Samakovli *et al.*, 2007).

Η συνεχής ανάπτυξη των φυτών και οι μορφολογικές αλλαγές που τη συνοδεύουν αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίληψης και απόκρισης σε διάφορα ερεθίσματα. Είναι ήδη γνωστό πως οι HSP90 κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ανάπτυξης, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με πλήθος πρωτεϊνών που δρουν ως ρυθμιστές διαφόρων αναπτυξιακών διεργασιών.

Προηγούμενες μελέτες έχουν επισημάνει τη συμμετοχή των HSP90 σε αναπτυξιακά μονοπάτια και στην αντίληψη των αντίστοιχων σιγνάλων. Παραδείγματα αποτελούν η εμπλοκή των HSP90 στο μονοπάτι των μπρασισινοστεροειδών ορμονών (Samakovli *et al.*, 2014), η συμμετοχή τους στο μονοπάτι της αυξίνης καθώς και στην αντίληψη του φωτός (Samakovli *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2016). Επιπλέον έχει βρεθεί πως η παρουσία των HSP90 είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς εμπλέκονται στα διάφορα μονοπάτια της άνθισης. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη των HSP90 οδήγησε σε διαταραχή των μονοπατιών της άνθισης, αποκαλύπτοντας πως η διαμεσολάβηση των αντίστοιχων μηνυμάτων επηρεάζεται σημαντικά (Margaritopoulou, 2012). Τέλος

υπάρχουν στοιχεία (προσωπικές μελέτες) που υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση των HSP90 πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού CLAVATA.

Ακόμη, αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ υποδεικνύουν την ύπαρξη φυσικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα κυτταροπλασματικά μέλη των HSP90 και σε πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών HSP90.1/HSP90.3 με τον υποδοχέα των μπρασισινοστεροειδών BRI1BZR1 και BZR2 (προσωπική επικοινωνία). Η πρωτεΐνη BRI1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και ανήκει στην οικογένεια των LRR-RLK πρωτεϊνών. Μια τυπική πρωτεΐνη RLK διαθέτει μια εξωκυτταρική δομή, μια διαμεμβρανική περιοχή και ένα ενδοκυτταρικό μοτίβο κινάσης σερίνης/θρεονίνης, όπως και οι πρωτεΐνες BRI1 και CLV1. Συνήθως η εξωκυττάρια περιοχή μιας RLK πρωτεΐνης η οποία συνδέεται με κάποιο άλλο πρωτεϊνικό μόριο, χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα ανάπτυξης φυσικής αλληλεπίδρασης με το μόριο αυτό το οποίο οδηγεί σε αμοιβαία φωσφορυλίωση δύο μορίων RLK προκαλώντας ή εξασφαλίζοντας το διμερισμό (όμο- ή έτερο- διμερισμό) τους (Li *et al.*, 2013). Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων αποτελεί τόσο η πρόσδεση του πεπτιδίου CLV3 στην πρωτεΐνη υποδοχέα CLV1 όσο και η πρόσδεση της ορμόνης BL στην πρωτεΐνη BRI1. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν μελετηθεί με *in vivo* ανοσοκατακρήμνιση σε φυτικά εκχυσλίσματα. Αν και τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα μόρια, δεν αποκλείεται η πιθανότητα επιπλέον μόρια να είναι απαραίτητα προκειμένου να γίνει η πρόσδεση του υποδοχέα με το μόριο-σιγάλο κάθε φορά (Tichtinsky *et al.*, 2003). Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως τα κατάλοιπα LRRs 6-8 της πρωτεΐνης CLV1 είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση των CLE πεπτιδίων (Shinohara *et al.*, 2012).

Σχετικά με την έλλειψη των HSP90, προηγούμενη μελέτη σε διασταυρωμένες σειρές RacRNAi, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έλλειψη των κυτταροπλασματικών μελών των HSP90, με *pCLV3::GFP*, όπου η έκφραση της πρωτεΐνης φθορισμού GFP βρίσκεται υπό τον έλεγχο του προαγωγέα του πεπτιδίου CLV3, έδειξαν πως το μονοπάτι διαταράσσεται, καθώς υπάρχει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο διάχυσης της πρωτεΐνης CLV3. Οι RacRNAi σειρές όπου έχει επιτευχθεί σίγηση των κυτταροπλασματικών HSP90 παρουσιάζουν πλειοτροπικό φαινότυπο εμφανίζοντας καθυστέρηση στην ανάπτυξη, διακυμάνσεις στο ύψος των φυτών, αυξημένο αριθμό φύλλων στη ροζέτα και έκπτυξη πολυάριθμων πλάγιων βλαστών ενώ σε κάποιες περιπτώσεις τα φυτά χαρακτηρίζονται από απώλεια κυριαρχίας κορυφής (Γεωργοπούλου, 2014). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πως στις αποσιωπημένες σειρές όπου τα επίπεδα των HSP90 είναι μειωμένα, τα επίπεδα έκφρασης των μεριστωματικών γονιδίων χαρακτηρίζονται από μεταβολές, οδηγώντας σε πρόβλημα στο AMB. Το πρότυπο διάχυσης του πεπτιδίου CLV3 που παρατηρείται στις διασταυρωμένες σειρές RacRNAi x *pCLV3::GFP* υποδηλώνει πως η έκφραση του πεπτιδίου επηρεάζεται και μεταβάλλεται. Η έλλειψη των HSP90 φαίνεται πως οδηγεί σε εκτοπική έκφραση του ολιγοπεπτιδίου, διαταράσσοντας το αναπτυξιακό μονοπάτι CLAVATA.

Η παρούσα μελέτη έρχεται να συμπληρώσει και να επιβεβαιώσει το εύρημα αυτό.

Ακολουθώντας μια διαφορετική προσέγγιση αυτή τη φορά η έλλειψη των HSP90 προκαλείται φαρμακολογικά, μέσω της χρήση του αναστολέα των HSP90, GDA. Ο χειρισμός εμβρύων *pCLV3::GFP* με τον αναστολέα αυτόν, έδωσε αποτελέσματα που έρχονται σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα, κατά τα οποία η γενετική αποσιώπηση των HSP90 προκαλούσε πρότυπο διάχυσης του πεπτιδίου CLV3.

Πιο συγκεκριμένα, ενώ αρχικά η έκφραση της κατασκευής *pCLV3::GFP* ήταν εντοπισμένη σε συγκεκριμένη περιοχή του AMB, όπως αναμενόταν, μετά την επώαση των εμβρύων για διάφορα χρονικά διαστήματα παρουσία του ειδικού αναστολέα GDA της δραστηριότητας των HSP90 πρωτεϊνών προκάλεσε εκτοπική έκφραση της *pCLV3::GFP* κατασκευής.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μια ακόμα ένδειξη της συμβολής των HSP90 στο αναπτυξιακό μονοπάτι CLAVATA-WUSCHEL μέσω της αντίληψης του ολιγοπεπτιδίου CLV3 και της απόκρισης σε αυτό. Η αντίληψη του συγκεκριμένου πεπτιδίου-σινιάλου καθορίζει άμεσα τον έλεγχο των βλαστικών κυττάρων του AMB μέσω του μηχανισμού ανάδρασης CLV3-WUS. Το σύμπλοκο των CLV1, CLV2, CRN και CLV3 ρυθμίζει αρνητικά τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα WUSCHEL το οποίο εκφράζεται στην περιοχή OC του AMB όπου και ελέγχει την ταυτότητα των βλαστικών κυττάρων (Brand *et al.*, 2000). Επομένως η παρουσία των HSP90 είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του μηχανισμού αυτού.

Επιπλέον μέσα από την παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για επιβεβαίωση της συμμετοχής των HSP90 στο μονοπάτι CLAVATA, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις CLV1, CLV2 και CRN. Προηγούμενη προσωπική μελέτη υποδεικνύει την αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών μελών HSP90.1 και HSP90.3 με κάθε μια από τις τρεις πρωτεΐνες που κατέχουν ρόλο υποδοχέα στο μεταγωγικό μονοπάτι CLAVATA. Τα δεδομένα αυτά προέκυψαν ακολουθώντας τη μέθοδο BiFC. Μελετώντας με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, πρωτοπλάστες φύλλων καπνού που είχαν υποστεί παροδικό μετασχηματισμό με τις κατάλληλες κατασκευές που έφεραν τα γονίδια, παρατηρήθηκε πως τα κυτταροπλασματικά μέλη HSP90.1 και HSP90.3 συμμετέχουν άμεσα στη διατήρηση της ομοιόστασης του SAM, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις πρωτεΐνες CLV1, CLV2 και CRN. Ταυτόχρονα, η ίδια μελέτη έδειξε πως για τη δράση των HSP90 στο συγκεκριμένο μονοπάτι απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η ενεργή μορφή των HSP90 μορίων, η οποία επιτυγχάνεται με τη δράση της ATPάσης. Χειρισμός των παρατηρηθέντων πρωτοπλαστών που μαρτυρούν την ύπαρξη των αλληλεπιδράσεων που αναφέρθηκαν, με τον χημικό αναστολέα GDA, οδήγησε σε διακοπή του παραγόμενου σήματος-φθορισμού, γεγονός που υποδεικνύει την απουσία αλληλεπίδρασης. Η απουσία αλληλεπίδρασης έγκειται στην ιδιότητα του GDA, να ανταγωνίζεται το ATP στη θέση πρόσδεσής του στο μόριο των HSP90, παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση τους.

Έτσι στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε μια άλλη προσέγγιση, εκείνη της ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών (Co-IP). Συγκεκριμένα οι υπό εξέταση αλληλεπιδράσεις εξετάστηκαν με τη μέθοδο του Western blot. Μέσα από αυτή την προσέγγιση λοιπόν επιβεβαιώνεται η ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο κυτταροπλασματικό μέλος HSP90.3 και στις πρωτεΐνες CLV2 και CRN. Η διερεύνηση των υπόλοιπων αλληλεπιδράσεων δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί και η μελέτη βρίσκεται υπό εξέλιξη.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ





**Albanese V, Yam AYW, Baughman J, Parnot C, Frydman J.** 2006. Systems Analyses Reveal Two Chaperone Networks with Distinct Functions in Eukaryotic Cells. *Cell* **124**(1), 75-88.

atlasgeneticsoncology.org

**Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noël L, Sadanandom A, Casais C, Parker J, Shirasu K.** 2006. Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *The EMBO Journal* **25**(9), 16.

**Barton MK and Poethig RS.** 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* **119**(3), 823-831.

**Becker J and Craig EA.** 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry* **219**(1-2), 11-23.

**Betsuyaku S, Takahashi F, Kinoshita A, Miwa H, Shinozaki K, Fukuda H and Sawa S.** 2011. Mitogen-activated protein kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis. *Plant and Cell Physiology* **52**(1), 14-29.

**Bishop GJ and Koncz C.** 2002. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *The Plant Cell* **14**(suppl 1), S97-S110.

**Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA and Simon R.** 2010. Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology* **152**(1), 166-176.

**Blobel G and Dobberstein B.** 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of cell biology*, **67**(3), 835-851.

**Boston RS, Paul V and Vierling E.** 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. Post-transcriptional control of gene expression in plants. *Springer Netherlands*. 191-222.

**Botër M, Amigues B, Peart J, Breuer C, Kadota C, Casais C, Moore G, Kleanthous C, Ochsnein F, Shirasu K and Guerois R.** 2007. Structural and Functional Analysis of SGT1 Reveals That Its Interaction with HSP90 Is Required for the Accumulation of Rx, an R Protein Involved in Plant Immunity. *The Plant Cell* **19**(11), 3791-3804.

**Bowman JL and Eshed Y.** 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in plant science* **5**(3), 110-115.

**Boyer RF.** 2000. *Modern Experimental Biochemistry*. 3rd. Prentice Hal

**Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM and Simon R.** 2000. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, **289**(5479), 617-619.

**Brand U, Grünewald M, Hobe M and Simon R.** 2002. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **129**(2), 565-575.



- Buchner J.** 1999. Hsp90 & Co.–a holding for folding. *Trends in biochemical sciences* **24(4)**, 136-141.
- Bukau B and Horwich AL.** 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92(3)**, 351-366.
- Burnette WN.** 1981. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, **112(2)**, 195-203.
- Butenko M and Simon R.** 2015. Beyond the meristems: similarities in the CLAVATA3 and INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION peptide mediated signalling pathways. *Journal of Experimental botany* **66**, 5195-5203.
- Butenko MA, Vie AK, Brembu T, Aalen RB and Bones AM.** 2009. Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in Plant Science* **14(5)**, 255-263.
- Casamitjana-Martínez E, Hofhuis HF, Xu J, Liu CM, Heidstra R and Scheres B.** 2003. Root-specific CLE19 overexpression and the sol1/2 suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance. *Curr. Biol.* **13**, 1435-1441.
- Chaudhuri TK and Paul S.** 2006. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *The FEBS journal*, **273(7)**, 1331-1349.
- Chong LPL.** 2015. The Role of ER-localized HSP90 in Modulating the WUSCHEL-CLAVATA pathway and ER Stress Resistance in Arabidopsis thaliana. *Department of Cell & Systems Biology University of Toronto*.
- Clark S, Jacobsen S, Levin J and Meyerowitz E.** 1996. The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate. *Development* **122(5)**, 1567-1575.
- Clark S, Running M and Meyerowitz E.** 1993. **CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis.** *Development* **119(2)**, 397-418.
- Clark SE, Williams RW and Meyerowitz EM.** 1997. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89(4)**, 575-585.
- Cock JM and McCormick S.** 2001. A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiol.* **126**, 939-942.
- Colette A, Lu KJ and Weijers D.** 2015. Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development*, **142(3)**, 420-430.
- Cooper GM and Hausman RE.** 2000. *The cell* (Vol. 85). Sunderland: Sinauer Associates.
- DeYoung BJ and Clark S.** 2008. BAM Receptors Regulate Stem Cell Specification and Organ Development Through Complex Interactions With CLAVATA Signaling. *Genetics* **180(2)**, 895-904.

- Doyle SM, Genest O and Wickner S.** 2013. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **14(10)**, 617.
- Dumas C and Rogowsky P.** 2008. Fertilization and early seed formation. *Comptes rendus biologiques*, **331(10)**, 715-725.
- Durbak AR and Tax FE.** 2011. CLAVATA signaling pathway receptors of Arabidopsis regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. *Genetics* **189(1)**, 177-194.
- Efeoglu B.** 2009. Heat Shock Proteins and Heat Shock Response in Plants. *Journal of Science* **22(2)**, 67-75.
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M and Buchner J.** 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal* **16(2)**, 221-229.
- Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ and Laux T.** 1996. The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *The Plant Journal* **10(6)**, 967-979.
- Fiers M, Golemic E, Xu J, Geest L, van derHeidstra R, Stiekema W and Liu CM.** 2005. The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in Arabidopsis through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* **17**, 2542-2553.
- Fiers M, Ku KL and Liu CM.** 2007. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Current Opinion in Plant Biology* **10(1)**, 39-43.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R and Meyerowitz EM.** 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283(5409)**, 1911-1914.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R and Meyerowitz EM.** 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R and Meyerowitz EM.** 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Gamerding M, Carra S and Behl C.** 2011. Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. *Journal of molecular medicine*, **89(12)**, 1175-1182.
- Guo Y and Clark S.** 2010. Membrane distributions of two ligand-binding receptor complexes in the CLAVATA pathway. *Plant Signaling & Behavior* **5(11)**, 1442-1445.
- Guo Y, Han L, Hymes M, Denver R and Clark S.** 2010. CLAVATA2 forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating Arabidopsis stem cell specification. *The Plant Journal* **63(3)**, 889-900.

- Haralampidis K, Milioni D, Rigas S and Hatzopoulos P.** 2002. Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiology* **129(3)**, 1138-1149.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M.** 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295(5561)**, 1852-1858.
- Heidstra R and Sabatini S.** 2014. Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **15(5)**, 301-312.
- Ishiguro S, Watanabe Y, Ito N, Nonaka H, Takeda N, Sakai T, Kanaya H and Okada K.** 2002. SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *The EMBO Journal* **21(5)**, 898-908.
- Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N and Fukuda H.** 2006. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**, 842-845.
- Jeong S, Trotochaud AE and Clark S.** 1999. The Arabidopsis *CLAVATA2* Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the *CLAVATA1* Receptor-like Kinase. *The Plant Cell* **11(10)**, 1925-1933.
- Johri BM, Ambegaokoar KB and Srivastava PS.** 1992. Comparative Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer.
- Johri BM.** 1984. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer.
- Jürgens G and Mayer U.** 1994. Arabidopsis. In A Colour Atlas of Developing Embryos (ed. J. B. L. Bard). London: Wolfe Publishers.
- Kadota Y, Amigues B, Ducassou L, Madaoui H, Ochsenbein F, Guerois R and Shirasu K.** 2008. Structural and functional analysis of SGT1-HSP90 core complex required for innate immunity in plants. *EMBO reports* **9(12)**, 1209-1215.
- Kadota Y, Shirasu K.** 2012. The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* **1823(3)**, 689–697.
- Kalmar B, Greensmith L.** 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61(4)**, 310-318.
- Kapp K, Schrenpf S, Lemberg MK and Dobberstein B.** 2013. Post-targeting functions of signal peptides.
- Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK and Wenger RH.** 2004. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization. *Cellular Physiology and Biochemistry* **14(4-6)**, 351-360.
- Katschinski DM.** 2004. On heat and cells and proteins. *Physiology* **19(1)**, 11-15.
- Kayes JM and Clark SE.** 1998. *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* **125(19)**, 3843-3851.
- Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H and Sakagami Y.** 2006. A plant peptide encoded by *CLV3* identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* **313**, 845-848.

- Koning, AJ, Rose R and Comai L.** 1992. Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant physiology* **100(2)**, 801-811.
- Kosmaoglou M, Schwarz N, Bett JS and Cheetham ME.** 2008. Molecular chaperones and photoreceptor function. *Progress in retinal and eye research*, **27(4)**, 434-449.
- Krishna P and Gloor G.** 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones* **6(3)**, 238-246.
- Krishna P, Sacco M, Cherutti JF and Hill S.** 1995. Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology* **107(3)**, 915-923.
- Kumar CS, Mande SC and Mahajan G.** 2015. Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress and Chaperones*, **20(4)**, 555-574.
- Kwiatkowska D.** 2004. Structural integration at the Shoot Apical Meristem: Models, Measurements and Experiments. *American Journal of Botany* **91(9)**, 1277–1293.
- Laux T, Mayer KF, Berger J and Jurgens G.** 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, **122(1)**, 87-96.
- Lee C and Clark S.** 2013. Core pathways controlling shoot meristem maintenance. Wiley Interdisciplinary Reviews: *Developmental Biology* **2(5)**, 671-684.
- Lee H, Chah OK, Plotnikov J and Sheen J.** 2012. Stem cell signaling in immunity and development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **77**, 75-71.
- Lenhard M and Laux T.** 2003. Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development* **130(14)**, 3163-3173.
- Lenhard M, Jürgens G and Laux T.** 2002. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* **129(13)**, 3195-3206.
- Li J and Buchner J.** 2013. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomedical journal* **36(3)**, 106.
- Li J and Tax FE.** 2013. Receptor-like kinases: key regulators of plant development and defense. *Journal of integrative plant biology*, **55(12)**, 1184-1187.
- Liang P, MacRae TH.** 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **110(13)**, 1431-1440.
- Lindquist S and Craig EA.** 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **22(1)**, 631-677.
- Lindquist S.** 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* **55(1)**, 1151-1191.
- Mansfield SG and Briarty LG.** 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian journal of botany*, **69(3)**, 461-476.

- Marrs KA, Casey ES, Capitant SA, Bouchard RA, Dietrich PS, Mettler IJ and Sinibaldi RM.** 1993. Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development. *Developmental genetics* **14(1)**, 27-41.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G and Laux T.** 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95(6)**, 805-815.
- Medford JI.** 1992. Vegetative apical meristems. *The Plant Cell* **4(9)**, 1029.
- Milioni, D and Hatzopoulos P.** 1997. Genomic organization of hsp90 gene family in Arabidopsis. *Plant molecular biology* **35(6)**, 955-961.
- Miwa H, Kinoshita A, Fukuda H and Sawa S.** 2009. Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *Journal of Plant Research* **122(1)**, 31-39.
- Morimoto RI.** 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes and Development* **12(24)**, 3788-3796.
- Morimoto, RI.** 2002. Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* **110(3)**, 281-284.
- Müller R, Bleckmann A and Simon R.** 2008. The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* **20**, 934-946.
- Müller R, Borghi L, Kwiatkowska D, Laufs P and Simon R.** 2006. Dynamic and Compensatory Responses of Arabidopsis Shoot and Floral Meristems to CLV3 Signaling. *The Plant Cell* **18(5)**, 188-1198.
- Murray J, Jones A, Godin C and Traas J.** 2012. Systems analysis of Shoot Apical Meristem growth and development: Integrating hormonal and mechanical signaling. *The Plant Cell* **24(10)**, 3907-3917.
- Nakajima K and Benfey PN.** 2002. Signaling In and Out Control of Cell Division and differentiation in the Shoot and Root. *The Plant Cell*, **14(suppl 1)**, S265-S276.
- Nimchuk Z, Zhou Y, Tarr P, Peterson B and Meyerowitz E.** 2015. Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases. *Development* **142(6)**, 1043-1049.
- Nollen EA, Morimoto RI.** 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science* **115(14)**, 2809-2816.
- Nover L, Scharf KD.** 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **53(1)**, 80-103.
- Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW and Pearl LH.** 1998. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO journal* **17(16)**, 4829-4836.

- Parsell DA and Lindquist S.** 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics* **27(1)**, 437-496.
- Pluskal MG, Przekop MB, Kavonian MR, Vecoh C and Kicks DA.** 1986. Immobilon PVDF transfer membrane: A new membrane substrate for Western blotting of proteins. *Biotechniques* **4**, 272-282.
- Pollock EG and Jensen WA.** 1964. Cell development during early embryogenesis in *Capsella* and *Gossypium*. *American Journal of Botany*, 915-921.
- Potten CS and Loeffler M.**1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110(4)**, 1001-1020.
- Praekelt UM and Meacock PA.** 1990. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Molecular and General Genetics MGG* **223(1)**, 97-106.
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E and Lindquist S.** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12(4)**, 479-492.
- Rapoport TA.** 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450(7170)**, 663-669.
- Reddy and Meyerowitz.** 2005. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. *Science*, **310(5748)**, 663-667.
- Reddy RK, 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(2)**, 131-137.
- Repogle A, Wang J, Paolillo V, Smeda J, Kinoshita A, Durbak A, Tax FE, Wang X, Sawa S and Mitchum MG.** 2013. Synergistic Interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 in Cyst Nematode Parasitism of *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **26(1)**, 87-96.
- Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV and Fletcher JC.** 2002. CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969-977.
- Rutherford SL.** 2003. Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nature Reviews Genetics* **4(4)**, 263-274.
- Samakovli D, Thanou A, Valmas C and Hatzopoulos P.** 2007. Hsp90 canalizes developmental perturbation. *Journal of Experimental Botany* **58(13)**, 3513-3524.
- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA and Lindquist S.** 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in biochemical sciences* **21(8)**, 289-296.
- Schlesinger MJ.** 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem*, **265(21)**, 12111-12114.
- Schmidt A.** 1924. Histologische studien an phanerogamen vegetationspunkten. *Bot. Archi*, **8**, 345-404.

- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G and Laux T.** 2000. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, **100(6)**, 635-644.
- Shinohara H and Matsubayashi Y.** 2015. Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view. *The Plant Journal* **82(2)**, 328-336.
- Shinohara H, Moriyama Y, Ohyama K and Matsubayashi Y.** 2012. Biochemical mapping of a ligand-binding domain within Arabidopsis BAM1 reveals diversified ligand recognition mechanisms of plant LRR-RKs. *The Plant Journal*, **70(5)**, 845-854.
- Somssich M, Je BI, Simon R and Jackson D.** 2016. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, **143(18)**, 3238-3248.
- Song X, Yu D, Xu T, Ren S, Guo P and Liu C.** 2012. Contributions of Individual Amino Acid Residues to the Endogenous CLV3 Function in Shoot Apical Meristem Maintenance in Arabidopsis. *Molecular Plant* **5(2)**, 515–523.
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC and Simon R.** 2009. A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Curr. Biol.* **19**, 909-914.
- Stone JM, Trotochaud AE, Walker JC and Clark SE.** 1998. Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiology* **117(4)**, 1217-1225.
- Sussex I.** 1952. Regeneration of the potato shoot apex. *Nature* **170**, 755-757.
- Tichtinsky G, Vanoosthuysse V, Cock JM and Gaude T.** 2003. Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends in plant science*, **8(5)**, 231-237.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76(9)**, 4350-4354.
- Van Oss CJ, Good RJ and Chaudhury MK.** 1987. Mechanism of DNA (Southern) and protein (Western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. *Journal of Chromatography A*, **391**, 53-65.
- Vaughan JG.** 1955. The morphology and growth of the vegetative and reproductive apices of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Capsella bursa-pastoris (L.) Medic. and Anagallis arvensis L. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* **55(359)**, 279-301.
- Verzicco R and Orlandi P.** 1996. A finite-difference scheme for three-dimensional incompressible flows in cylindrical coordinates. *Journal of Computational Physics* **123(2)**, 402-414.
- Vierling E.** 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42(1)**, 579-620.

**Wang R, Zhang Y, Kieffer M, Yu H, Kepinski S and Estelle M.** 2016. HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nature communications*, **7**.

**Wang W, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science* **9(5)**, 244-252.

**Waters ER, Lee GJ and Vierling E.** 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47(3)**, 325-338.

**Wickner S, Maurizi, M. R., & Gottesman S.** (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286(5446)**, 1888-1893

**Wickner S, Gottesman S, Skowyra D, Hoskins J, McKenney K and Maurizi MR.** 1994. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91(25)**, 12218-12222.

**Williams RW, Wilson JM and Meyerowitz EM.** 1997. A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94(19)**, 10467-10472.

**Wilson CM.** 1983. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods in enzymology* **91**, 236-247.

**Wu T, Ma J, Chen S, Sun Y, Xiao C, Gao Y and Tanguay RM.** 2001. Association of plasma antibodies against the inducible Hsp70 with hypertension and harsh working conditions. *Cell stress & chaperones* **6(4)**, 394-401.

www.scielo.br

**Wyrzykowska J, Schorderet M, Pien S, Gruissem W and Fleming A.** 2006. Induction of differentiation in the Shoot Apical Meristem by transient overexpression of a Retinoblastoma-Related Protein. *Plant Physiology* **141(4)**, 1338-1348.

**Xu C, Liberatore KL, MacAlister CA, Huang Z, Chu YH, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, Van Eck J, Matsubayashi Y and van der Knaap E, Lippman ZB.** 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics* **47(7)**, 784-792.

**Yadav RK and Reddy GV.** 2011. WUSCHEL protein movement and stem cell homeostasis. *Plant signaling & behavior* **7(5)**, 592-594.

**Yoshida S, de Reuille PB, Lane B, Bassel GW, Prusinkiewicz P, Smith RS and Weijers D.** 2014. Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Developmental cell*, **29(1)**, 75-87.

**Yue M, Li Q, Zhang Y, Zhao Y, Zhang Z, Li Q and Bao S.** 2013. Histone H4R3 Methylation Catalyzed by SKB1/PRMT5 Is Required for Maintaining Shoot Apical Meristem. *PLoS ONE* **8(12)**, e83258.

**Zhang M, Botër M, Li K, Kadota Y, Panaretou B, Prodromou C, Shirasu K and Pearl LH.** 2008. Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. *The EMBO Journal* **27(20)**, 2789-2798.



**Zhu Y, Wan Y and Lin J.** 2010. Multiple receptor complexes assembled for transmitting CLV3 signaling in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **5(3)**, 300–302.

**Zhu Y, Wang Y, Li R, Song X, Wang Q, Huang S, Jin J, Liu CM and Lin J.** 2010. Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis. *The Plant Journal* **61(2)**, 223–233.

**Γεωργοπούλου Π.** 2014. Φαινοτυπική Ποικιλομορφία Και Πλαστικότητα Σε Αποσιωπημένες HSP90-RNAi Arabidopsis Σειρές. Πτυχιακή Μελέτη.