

Π.Μ.Σ Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Μελέτη του ρόλου του HSP90 συστήματος στο σηματοδοτικό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών

Μεταπτυχιακή μελέτη

Ιωάννα Α. Κατσά

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Δήμητρα Μηλιώνη



Αθήνα 2019

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ Βιολογία Συστημάτων
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

Μελέτη του ρόλου του HSP90 συστήματος στο σηματοδοτικό
μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών

Μεταπτυχιακή μελέτη
Ιωάννα Α. Καλτσά

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Δήμητρα Μηλιώνη

Αθήνα 2019

Μελέτη του ρόλου του HSP90 συστήματος στο σηματοδοτικό
μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών

Μεταπτυχιακή μελέτη
Ιωάννα Α. Καλτσά

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Δήμητρα Μηλιώνη

Η ανάθεση του θέματος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της γενικής συνέλευσης του τμήματος Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

1. Δήμητρα Μηλιώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
2. Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ
3. Άννα Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Περίληψη

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες HSP90 (Heat Shock Proteins 90) κατατάσσονται στην κατηγορία μοριακών συνοδών, συμμετέχοντας σε πλήθος κυτταρικών διαδικασιών, στις οποίες περιλαμβάνονται η σωστή αναδίπλωση και η αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν λάθος διαμόρφωση, η σταθεροποίηση και η ενεργοποίηση βασικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν την ανάπτυξη, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι υποδοχείς ορμονών. Οι HSP90 απαντώνται σε μεγάλη αφθονία στα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα τόσο σε συνθήκες καταπόνησης, όσο και σε φυσιολογικές συνθήκες.

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά μέλη, τέσσερα κυτταροπλασματικά (HSP90.1-4) με υψηλό ποσοστό ομολογίας, ένα χλωροπλαστικό (HSP90.5), ένα μιτοχονδριακό (HSP90.6) και ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (HSP90.7).

Τα μπρασσινοστεροειδή (BRs) είναι μία ομάδα στεροειδών ορμονών που ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες οι οποίες είναι κοινές ανάμεσα στα ζώα και στα φυτά, όπως η κυτταρική διαίρεση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη του ρόλου του HSP90 συστήματος στο σηματοδοτικό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών. Χρησιμοποιείται η τεχνική του συστήματος των δύο υβριδίων (Yeast 2 hybrid) προκειμένου να εξεταστούν *in vivo* οι πιθανές αλληλεπιδράσεις των κυτταροπλασματικών μελών HSP90.1 και HSP90.3 με τον συνυποδοχέα των μπρασσινοστεροειδών BAK1. Παράλληλα εξετάζεται ο ρόλος των HSP90 πρωτεϊνών στο πρότυπο υποκυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης BAK1.

Λέξεις-κλειδιά: θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες HSP90, μπρασσινοστεροειδή, BAK1, σύστημα δύο υβριδίων, φαρμακολογική αναστολή λειτουργίας HSP90

Abstract

HSP90 is considered as one of the few well-connected hubs in molecular networks, because it is involved in the competence of an extensive repertoire of signaling proteins, including receptors, kinases and transcription factors among others. HSP90 is thought to play a crucial role in areas as diverse as development, cellular homeostasis, and organismal evolution.

HSP90 family consists of seven members, in *Arabidopsis thaliana*, four cytoplasmic (HSP90.1-4) with high homology, a plastidial (HSP90.5), a mitochondrial (HSP90.6) and one found in endoplasmic reticulum (HSP90.7).

Brassinosteroids (commonly known as BR) are a group of phytohormones that regulate a wide range of biological processes like plant growth and development including, photomorphogenesis, cell elongation, xylem differentiation, seed germination and stress responses.

The present study aims to investigate the role of HSP90 molecular chaperone in regulating the BR signaling pathway. The yeast 2-hybrid system was used to investigate possible interactions of the HSP90.1 and HSP90.3 with the BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-Associated receptor Kinase 1 (BAK1). Furthermore we showed that HSP90 inhibition by drugs, reduces hypocotyl length of etiolated *Arabidopsis* seedlings by decreasing the levels of the BAK1 receptor.

Keywords: HSP90, Brassinosteroids, BAK1, Yeast 2-hybrid system, HSP90 inhibition by drugs

Αντί Προλόγου

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γ.Π.Α. Με την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπ. Καθηγήτρια κα. Δήμητρα Μηλιώνη για την καθοδήγηση, την πολύπλευρη υποστήριξή της, και τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου, Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την εμπιστοσύνη που έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το περιβάλλον συντροφικότητας και συναδελφικότητας καθώς και για τη βοήθεια που μου προσέφεραν όλο το διάστημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους υποψήφιους Διδάκτορες του εργαστηρίου, Λουκία Ρόκα, Παναγιώτα Πλίτση και Δημήτρη Τεμπλαλέξη για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Ακόμη οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα την αδερφή μου για την στήριξη τους, ψυχική και υλική, εφόδια που με βοήθησαν στην πραγματοποίηση των στόχων μου.

Πίνακας Περιεχομένων

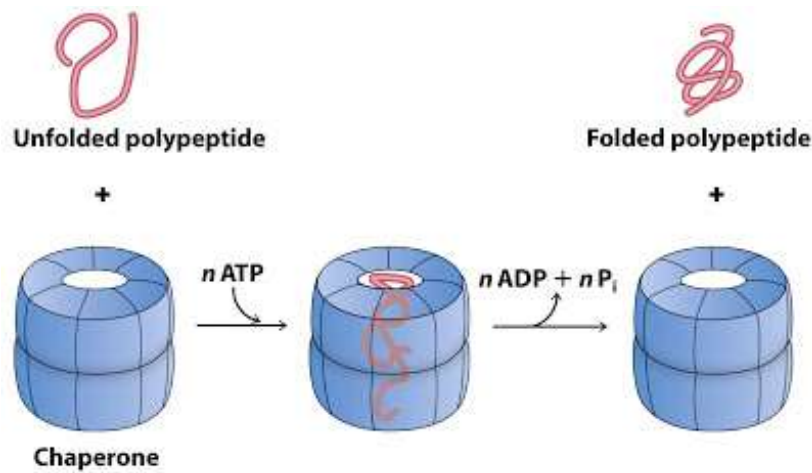
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Μοριακοί συνοδοί (Molecular Chaperones).....	9
1.2 Θερμοεπαγόμενες Πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins, HSPs).....	10
1.2.1 HSP90 (Heat Shock Proteins 90)	13
1.2.1.1 Η Δομή των HSP90	14
1.2.1.2 Ο Ρόλος των HSP90	16
1.3 Τα Μπρασσινοστεροειδή (Brassinosteroids, BRs)	18
1.3.1 Το Μονοπάτι Μεταγωγής Σήματος των Μπρασσινοστεροειδών	19
1.3.2 Η Αντίληψη των BR ορμονών	22
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	29
2.1 Φυτικό υλικό	30
2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού.....	30
2.1.2 Στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών MS (Murashige and Skoog) 31	
2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	31
2.2.1 PCR αποικιών (PCR Colonies)	33
2.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων.....	34
2.3.1 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.....	34
2.3.2 Δείκτης μοριακών μεγεθών	35
2.4 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	36
2.5 Πέψη νουλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού	36
2.6 Ενοποίηση τμημάτων DNA	37
2.7 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός.....	38
2.7.1 <i>Escherichia Coli</i> (<i>E.coli</i>)	38
2.7.1.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.Coli</i> ...	39

2.7.1.2	Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. Coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	39
2.7.1.3	Υπολογισμός απόδοσης μετασχηματισμού	40
2.7.2	Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα	40
2.8	Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i>	40
2.8.1	Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Alkaline Mini Preparation)	41
2.9	Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών <i>in vivo</i>	42
2.9.1	Σύστημα δύο υβριδίων (Yeast 2 hybrid)	42
2.9.1.1	Στελέχη και γονίδια αναφοράς.....	44
2.9.2	Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων <i>S. cerevisiae</i>	45
2.9.3	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων ζύμης <i>S. cerevisiae</i> με τη μέθοδο PEG-LiAc	46
2.9.3.1	Υπολογισμός απόδοσης μετασχηματισμού (cotransformation efficiency).....	47
2.9.3.2	Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων ζύμης.....	47
2.10	Πλασμιδιακοί φορείς	48
2.10.1	pGEM-T Easy	48
2.10.2	pGADT7 και pGBKT7	49
3.	Αποτελέσματα	51
3.1	Δημιουργία κατασκευών.....	52
3.2	Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών <i>in vivo</i>	57
3.2.1	Μελέτη αλληλεπίδρασης στο στέλεχος SG335.....	60
3.2.2	Μελέτη αλληλεπίδρασης στο στέλεχος Y2HGold	61
3.3	Ρόλος HSP90 στην κυτταρική τοποθέτηση της BAK1.....	65
4.	Συζήτηση.....	68
5.	Βιβλιογραφία.....	72

1. Εισαγωγή

1.1 Μοριακοί συνοδοί (Molecular Chaperones)

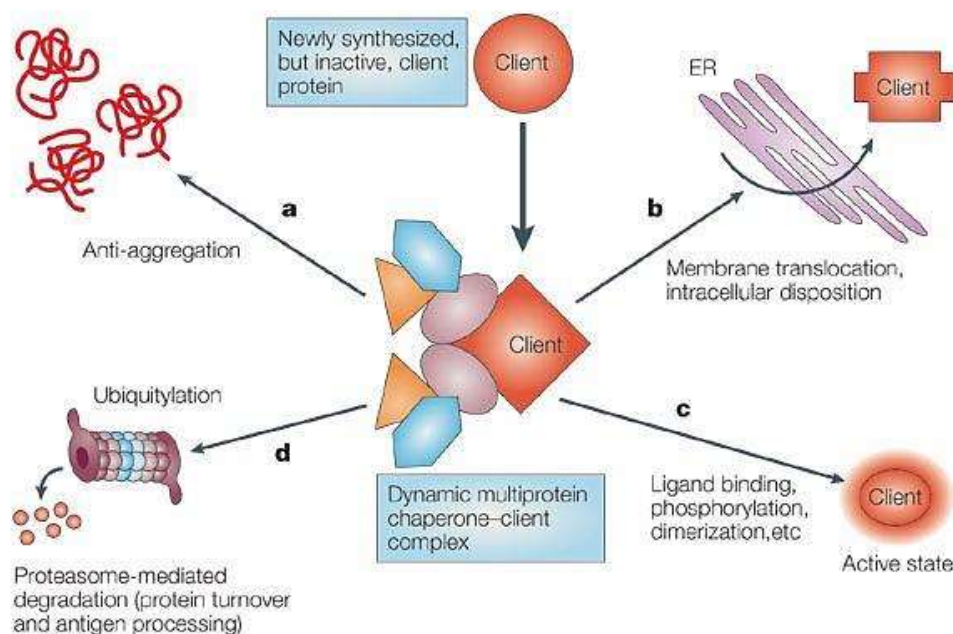
Τα κύτταρα προκειμένου να αποφύγουν τον κίνδυνο δημιουργίας συσσωματωμάτων και κατακρήμνισης πρωτεϊνών, λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης τους έχουν αναπτύξει το σύστημα των μοριακών συνοδών, το οποίο βοηθά στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων καθώς αυτά αναδύονται από το ριβόσωμα. Ως μοριακός συνοδός χαρακτηρίζεται μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται και σταθεροποιεί μια άλλη πρωτεΐνη που διαφορετικά θα ήταν ασταθής, μέσω ελεγχόμενης δέσμευσης και αποδέσμευσης της πρωτεΐνης υποστρώματος (Liang and MacRae, 1997) (Εικόνα 1.1). Οι μοριακοί συνοδοί απαντώνται συνήθως σε μεγάλη αφθονία στα κύτταρα και προσδέονται παροδικά σε ελαττωματικές πρωτεΐνες προάγοντας έτσι την αναδίπλωσή τους και παρεμποδίζοντας την αποικοδόμησή τους (Wickner *et al.*, 1999).



Εικόνα 1.1 Λάθος διπλωμένα πολυπεπτίδια εισέρχονται στην εσωτερική κοιλότητα του μοριακού συνοδού, όπου διπλώνονται. Η υδρόλυση ATP είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του μοριακού συνοδού (Horton, 2006).

Ο μοριακοί συνοδοί απαντώνται τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, αν και στους ευκαρυώτες είναι πολυπληθέστεροι, παρουσιάζοντας υψηλό βαθμό ομολογίας. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (i) μοριακοί συνοδοί που είναι ενεργοί σε συνθήκες καταπόνησης και (ii) μοριακοί συνοδοί που σχετίζονται με την παραγωγή και ωρίμανση νέων πρωτεϊνών (Albanese *et al.*, 2006).

Οι μοριακοί συνοδοί συνεισφέρουν στην ομοιόσταση των κυττάρων, είτε υπό κανονικές είτε υπό αντίξοες για την ανάπτυξη τους συνθήκες. Αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες-στόχους τους και συμβάλλουν στη σωστή αναδίπλωση αρτιγενών πρωτεϊνών προκειμένου να αποκτήσουν την τριτοταγή διαμόρφωση που τις καθιστά λειτουργικές (Boston *et al.*, 1996), στη μεταφορά πρωτεϊνών δια μέσω μεμβρανών σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου (Boston *et al.*, 1996; Rapoport 2007), στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση ορισμένων πρωτεϊνών (Katschinski, 2004) και στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών που έχουν μετουσιωθεί από ποικίλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Nollen and Morimoto, 2002; Lindquist and Craig, 1988). Οι πιο σημαντικές λειτουργίες των μοριακών συνοδών στη μετα-μεταφραστική ομοιόσταση των πρωτεϊνών-στόχων τους (αναφέρονται συχνά και ως πρωτεΐνες «πελάτες», client proteins) απεικονίζονται διαγραμματικά στην Εικόνα 1.2.



Εικόνα 1.2 Συμμετοχή των μοριακών συνοδών στην ρύθμιση της μετα-μεταφραστικής (πρωτεϊνικής) ομοιοστάσης. Μία νεοσυντιθεμένη πρωτεΐνη πελάτης (client) συνδέεται σε σύμπλοκα πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν διάφορα τσαπερόνια, συντσαπερόνια και βοηθητικά μόρια. Η δημιουργία του συμπλόκου, μπορεί να (a) αποτρέψει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης, και (b) να βοηθήσει στην διακίνησή της ενδοκυτταρικά, σε δομές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). (c) Για πρωτεΐνες πελάτες που εμπλέκονται σε σιγάλα μεταγωγής σήματος η δημιουργία του συμπλόκου διατηρεί την πρωτεΐνη πελάτη σε μία σταθερή κατάσταση που της επιτρέπει να ενεργοποιείται από ειδικά ερεθίσματα όπως είναι η δέσμευση μορίου (ligand), η φωσφορύλιωση, κ.ά.. (d) Σε απουσία κατάλληλου ερεθίσματος, τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να οδηγήσουν την πρωτεΐνη πελάτη για αποδόμηση (Whitesell and Lindquist, 2005).

Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 20 διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών με την ιδιότητα του μοριακού συνοδού. Ανάμεσα σε αυτές τις οικογένειες μείζονος σημασίας είναι εκείνες που επάγονται κάτω από συνθήκες καταπόνησης (κυρίως θερμικής) και είναι γνωστές ως «θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες». Διακρίνονται σε υποοικογένειες με βάση το μοριακό τους βάρος και ο τρόπος λειτουργίας και αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη-στόχο διαφέρει ανάμεσα στις υποοικογένειες.

1.2 Θερμοεπαγόμενες Πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins, HSPs)

Όλοι οι οργανισμοί, είτε ευκαρυωτικοί είτε προκαρυωτικοί, αναπτύσσονται σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον, το οποίο ασκεί συνεχώς «πίεση» σε αυτούς. Οι μεταβολές και οι δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος τείνουν να παρεμποδίσουν την κανονική λειτουργία φυσιολογικών μηχανισμών των φυτών, όπως είναι η ανάπτυξη τους. Τα φυτά, σε αντίθεση με τους ζωικούς οργανισμούς που έχουν τη δυνατότητα μετακίνησης, έχουν εξελίξει διάφορες φυσιολογικές και μοριακές προσαρμογές για να προστατεύουν τον εαυτό τους κάτω από παράγοντες καταπόνησης και να προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες (Neumann *et al.*, 1989; Pandey *et al.*, 2015).

Οι πιέσεις που δέχονται οι οργανισμοί αφορούν τόσο αβιοτικούς-περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η υψηλή θερμοκρασία, η υψηλή αλατότητα, η έλλειψη ύδατος, η παρουσία βαρέων μετάλλων κ.ά.), όσο και βιοτικούς παράγοντες

(όπως μολύνσεις από παθογόνα). Από τους παραπάνω παράγοντες οι αβιοτικοί είναι και οι πιο σημαντικοί, καθώς προκαλούν αποδιάταξη διαφόρων πρωτεϊνών και δυσλειτουργία τους (Wang *et al.*, 2004).

Ένας ιδιαίτερα μελετημένος μηχανισμός προσαρμογής του κυττάρου είναι αυτός που επάγεται κατά τη θερμική καταπόνηση/στρες (heat shock). Η απόκριση στο θερμικό στρες αποτελεί έναν σηματοδοτικό μηχανισμό που βοηθά στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης κάτω από συνθήκες στρες παρεμποδίζοντας έτσι την καταστροφή του κυττάρου και συμβάλλοντας στην αποφυγή θανάτου του οργανισμού (Morimoto, 1998). Κατά την διάρκεια της απόκρισης παρατηρούνται αλλαγές στην κυτταρική δραστηριότητα και φυσιολογία καθώς και στην επαγωγή συντηρημένων πρωτεϊνών, των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, HSPs (Schlesinger *et al.*, 1982; Arya *et al.*, 2007). Αυξημένη συγκέντρωση των εν λόγω πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη και συνδέεται με προστασία των οργανισμών από τις απαγορευτικές για την επιβίωσή τους θερμοκρασίες ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην προστασία τους από τις βλάβες που οι θερμοκρασίες αυτές προκαλούν καθώς εξισορροπούν την ομοιόσταση των κυττάρων μέσω της θερμοανθεκτικότητας.

Η έκφραση των HSPs αρχικά συνδέθηκε με τη θερμική καταπόνηση, όπως φαίνεται και από το όνομά τους. Ωστόσο, η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών από τα κύτταρα έχει παρατηρηθεί όχι μόνο σε συνθήκες θερμικού σοκ αλλά και σε διάφορες άλλες συνθήκες καταπόνησης, όπως είναι η υποξία, η ανοξία και οι υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, οι οποίες δημιουργούν στρεσογόνες συνθήκες για τα κύτταρα και τους οργανισμούς.

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν εντοπιστεί μέλη της οικογένειας των HSP, έχει δειχθεί ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είτε εκφράζονται συνεχώς στα κύτταρα, είτε επάγονται έπειτα από την επίδραση στρεσογόνου παράγοντα (Morimoto, 1998). Βέβαια, αυτό δε σημαίνει ότι η μέγιστη παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών είναι και η ιδανικότερη για το κύτταρο και τον οργανισμό, καθώς υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης τους μπορεί να γίνουν τοξικά. Έτσι, υπάρχει πάντα μια αυτορρυθμισή στους οργανισμούς για την παραγόμενη ποσότητα των πρωτεϊνών «πίεσης» (Kalmar and Greensmith, 2009). Η θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται μέγιστη επαγωγή σύνθεσης των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών εξαρτάται από τη φυσιολογική θερμοκρασία ανάπτυξης του κάθε οργανισμού (Holcik and Sonenberg, 2005).

Η έκφραση των HSP είναι άμεση και ταχύτατη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες οργανώνονται σε μια ανοικτή δομή χρωματίνης με υπερευαίσθητες θέσεις στο 5' άκρο. Με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ μπορούν να έχουν 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).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες HSPs ή πρωτεΐνες θερμικού στρες, αποτελούν μια ομάδα υψηλά συντηρημένων πρωτεϊνών ανάμεσα σε απομακρυσμένα εξελικτικά είδη και είναι παρούσες σε όλους τους οργανισμούς και όλα τα κύτταρά τους (Lindquist, 1986). Ανάλογα με το μοριακό τους βάρος διακρίνονται στις εξής οικογένειες: smHSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 (Πίνακας 1.1).

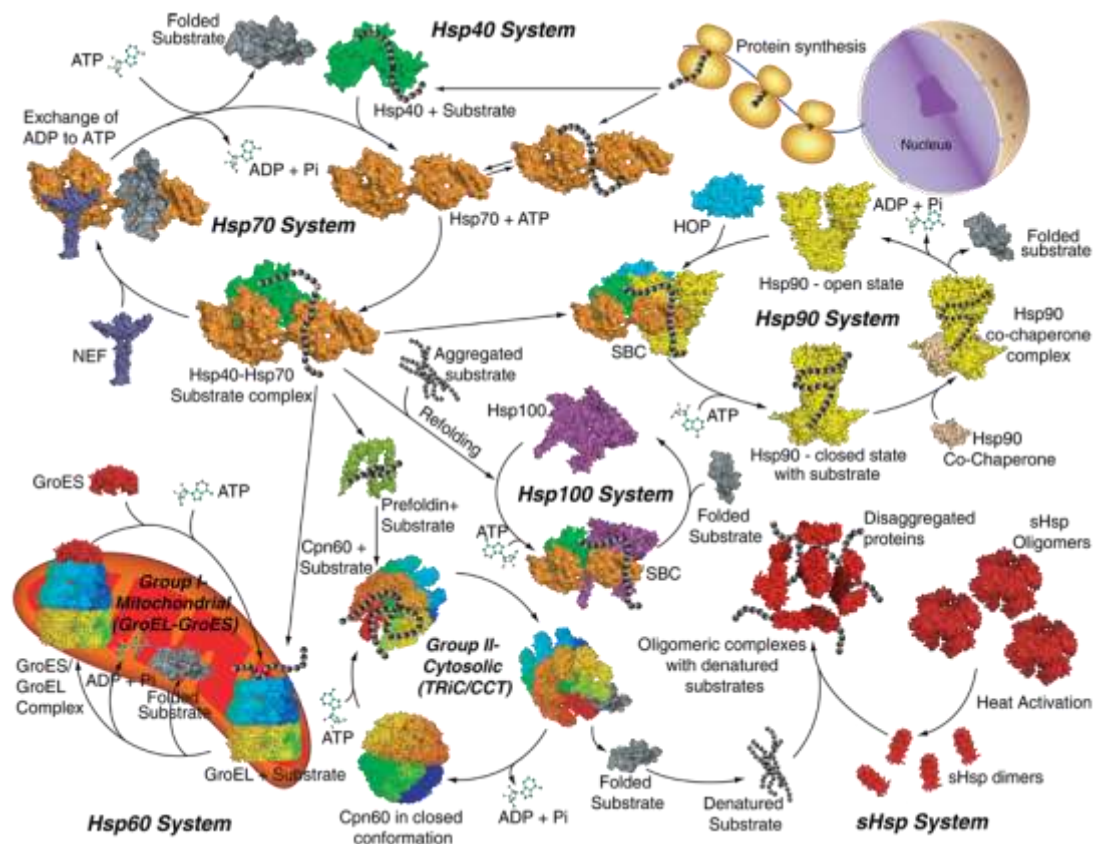
Πίνακας 1.1 Οι υποοικογένειες των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών HSPs (Wang *et al.*, 2004).

<u>Υποοικογένεια</u> (Μοριακό Βάρος)	<u>Κυτταρική τοποθέτηση</u>	<u>Κύρια λειτουργία</u>
smHSPs (15-30 kDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο, κυτταρόπλασμα	Αποτροπή συσσώρευσης Συν-τσαπερόνιο
HSP40 (40 kDa)	Κυτταρόπλασμα	Συν-τσαπερόνιο της Hsp70
HSP60/ Τσαπερονίνες (58-65 kDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, κυτταρόπλασμα	Συμμετοχή στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών
HSP70 / DnaK (67-76 kDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο, κυτταρόπλασμα	Αποτροπή συσσωμάτωσης, υποβοήθηση αναδίπλωσης, μετακίνηση πρωτεϊνών, μεταγωγή σήματος και μεταγραφική ενεργοποίηση
HSP90 (82-96 kDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, ενδοπλασματικό δίκτυο, κυτταρόπλασμα	Συμμετοχή στην ωρίμανση μορίων σινιάλων, στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών
HSP100/Clp (80-115 kDa)	Χλωροπλάστης, μιτοχόνδριο, κυτταρόπλασμα	Συμμετοχή στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών

Ορισμένες από αυτές, στα ζώα, έχει αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας αντιγόνου, στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων και στην ενεργοποίηση και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Tsan and Gao, 2009; Wallin *et al.*, 2002).

Το όνομα της κάθε υποοικογένειας υποδηλώνει το μέγεθος των μελών που την απαρτίζουν. Ανάμεσα στις υποοικογένειες, εκείνη των smHSPs αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη και την πιο ασαφή λειτουργικά (Vierling, 1991), ενώ αντίθετα οι HSP70 αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών που θεωρείται από τις πιο συντηρημένες στη φύση. Χαρακτηριστικό όλων των υποοικογενειών αποτελεί η συνεργασία μονομερών προς σχηματισμό ολιγο- ή πολυ-μερών μορίων τα οποία είναι λειτουργικά. Όλες οι υποοικογένειες φαίνεται πως έχουν δράση τσαπερονίων και εμπλέκονται στην αναδίπλωση πρωτεϊνών. Προστατεύουν επίσης τα κύτταρα από τη δημιουργία συσσωματωμάτων που προκαλούνται λόγω των πολυπεπτιδίων που έχουν λάθος αναδίπλωση, ελέγχοντας έτσι την ποιότητα των πρωτεϊνών στο κύτταρο (Εικόνα 1.3) (Becker and Craig, 1994). Οι υποοικογένειες των smHSPs και HSP60 δρουν συνήθως ως συν-τσαπερόνια και όχι ως αυτόνομα μόρια. Με εξαίρεση τις smHSPs οι οποίες εκφράζονται κατά κύριο λόγο κάτω από συνθήκες καταπόνησης, οι υπόλοιπες υποοικογένειες απαντώνται τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς σε φυσιολογικές και μη συνθήκες. Εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια (όπως μιτοχόνδριο, χλωροπλάστης, ενδοπλασματικό δίκτυο-ER, πυρήνας) υποδηλώνοντας ότι κατέχουν διαφορετικούς ρόλους στην πρωτεϊνική ομοιόσταση (Boston *et al.*, 1996; Vierling, 1991) (Πίνακας 1.1). Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει πως ορισμένες υποοικογένειες, όπως οι HSP100, εμπλέκονται στο μηχανισμό θερμοανθεκτικότητας (Queitsch *et al.*, 2000) και είναι απαραίτητες για την επιβίωση κάτω από συνθήκες έντονου θερμικού σοκ (Sanchez *et al.*, 1992). Τέλος απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση όλων των υποοικογενειών αποτελεί η παρουσία του ATP, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στη δομή των πρωτεϊνών κάθε υποοικογένειας, με

την ύπαρξη χαρακτηριστικής θέσης πρόσδεσης του ενεργειακού μορίου. Η δράση των πρωτεϊνών αυτών στηρίζεται στον κύκλο δέσμευσης και αποδέσμευσης του ATP.



Εικόνα 1.3 Οι υποοικογένειες των HSPs στη διατήρηση ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών στο κύτταρο (Li, 2017).

1.2.1 HSP90 (Heat Shock Proteins 90)

Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών είναι μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 82 έως 96kDa και συναντώνται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι HSP90 πρωτεΐνες απαντώνται σε πολύ μεγάλη αφθονία στα κύτταρα των οργανισμών, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, καθώς αποτελούν το 1-2% των συνολικών διαλυτών κυτταρικών πρωτεϊνών (Lai *et al.*, 1984; Buchner, 1999). Το ποσοστό ομοιότητας των HSP90 σε επίπεδο αμινοξέων είναι της τάξης του 70% μεταξύ των ευκαρυωτικών μελών και της τάξης του 40% μεταξύ του προκαρυωτικού μέλους και των αντίστοιχων ευκαρυωτικών. Γονίδια των HSP90 έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά όπως η *Solanum lycopersicum* (κοιν. τομάτα), *Brassica napus* (κοιν. ελαιοκράμβη), *Zea mays* (κοιν. καλαμπόκι), *Secale cereale* (κοιν. σίκαλη), *Arabidopsis thaliana* κ.α. Συγκρίσεις μεταξύ των αμινοξικών ακολουθιών των φυτικών HSP90 και ακολουθιών προερχόμενων από ομόλογα ζύμης ή ζώων, έδειξαν ομοιότητες που κυμαίνονταν μεταξύ 63-71%, ενώ οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων φυτικών HSP90 ανέδειξαν 88-93% ομοιότητα (Krishna and Gloor, 2001).

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά μέλη. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη (**HSP90.1-AT5G52640**, **HSP90.2-AT5G56010**, **HSP90.3-AT5G56030** και **HSP90.4-AT5G56000**) τα οποία παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας της τάξης του

85% σε αμινοξικό επίπεδο, ένα χλωροπλαστικό (*HSP90.5-AT2G04030*), ένα μιτοχονδριακό (*HSP90.6-AT3G07770*) και ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (*HSP90.7-AT4G24190*) (Krishna and Gloor, 2001). Αν και τα πρότυπα για την κυτταρική τοποθέτηση είναι σαφή και διακριτά, οι βιοχημικές λειτουργίες των HSP90 αναμένονται να είναι παρόμοιες λόγω της υψηλής ομολογίας των μελών.

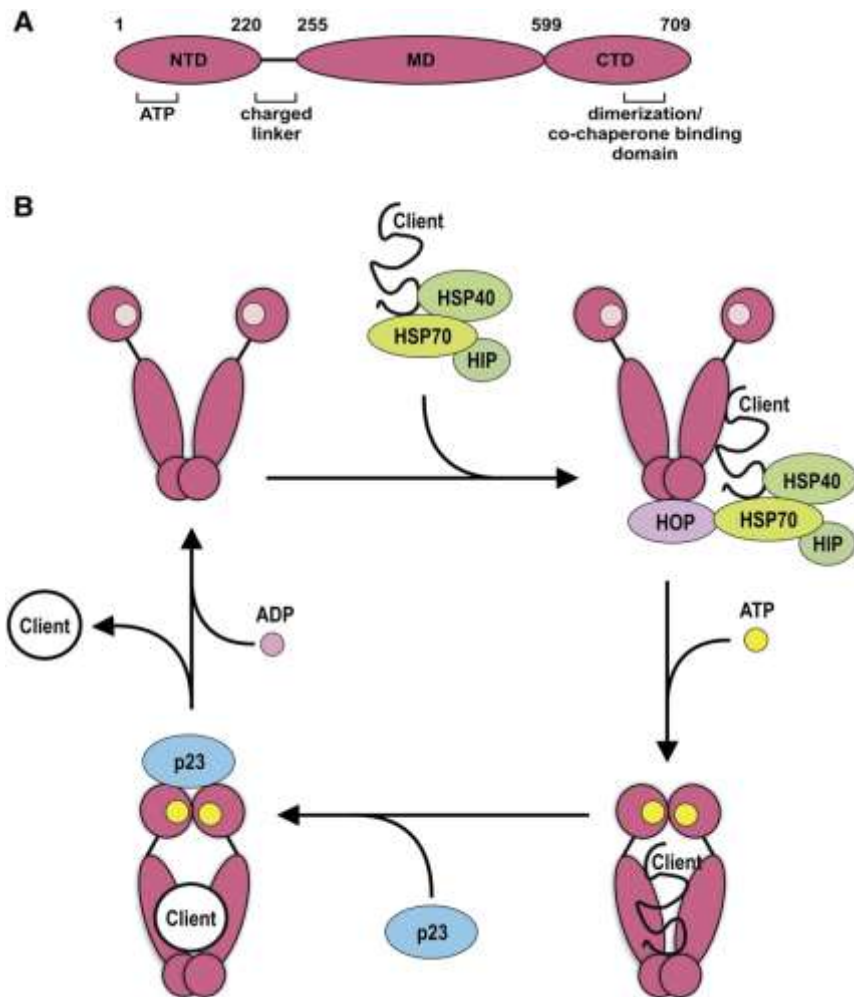
Είναι ήδη γνωστό ότι οι τέσσερις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες είναι παρόμοιες μεταξύ τους αν και οι τρεις από αυτές έχουν την υψηλότερη ομολογία στην αμινοξτελική ακολουθία και τη δομή των γονιδίων (Milionì and Hatzopoulos, 1997). Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας των κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας πιθανώς οδηγεί σε αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες των μελών, χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί μέσω της μελέτης T-DNA μεταλλάγματων για κάθε ένα από τα τέσσερα μέλη (Samakovli *et al.*, 2007).

Στα θηλαστικά η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη HSP90 κωδικοποιείται από δύο γονίδια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο πρωτεϊνικών ισομορφών παρόμοιων μεταξύ τους (ποσοστό ομολογίας 85% σε αμινοξικό επίπεδο), τις HSP90α και HSP90β, οι οποίες θεωρείται πως είναι λειτουργικά παρόμοιες με στοιχεία όμως που αποδεικνύουν εξειδίκευση ως προς τον ιστό και το υπόστρωμα (Voss *et al.*, 2000).

1.2.1.1 Η Δομή των HSP90

Οι HSP90 απαντώνται σαν διμερή και κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές (i) το άμινο-τελικό άκρο (NTD) στο οποίο προσδένεται η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και έχει μέγεθος 25kDa, (ii) τη μεσαία δομή (MD), η οποία συμμετέχει στην πρόσδεση υποστρωμάτων, μεγέθους 40kDa και (iii) το καρβόξυ-τελικό άκρο (CTD), στο οποίο λαμβάνει χώρα ο διμερισμός, μεγέθους 12kDa (Caplan, 1999; Pearl and Prodromou, 2006) (Εικόνα 1.4A).

Το άμινο-τελικό άκρο συνδέεται με το υπόλοιπο μόριο μέσω μιας φορτισμένης περιοχής (charged linker). Η περιοχή αυτή παρουσιάζει έντονη διαφοροποίηση ανάμεσα στα είδη, ενώ απουσιάζει πλήρως στο *E.coli* (HtpG) και στον άνθρωπο (TRAP1). Το καρβόξυ-τελικό άκρο περιλαμβάνει το πενταπεπτιδίο MEEVD, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό της δομής των HSP90 (και των HSP70) και στο οποίο προσδένονται οι TPR επαναλαμβανόμενες περιοχές. Οι περιοχές αυτές απαντώνται σε πολλά συν-τσαπερόνια. (Lindquist and Graig, 1988). Η μεσαία περιοχή αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος πρόσδεσης με τη πρωτεΐνη – πελάτη (Εικόνα 1.4A).



Εικόνα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση της βασικής δομής της HSP90. **A.** Το άμινο-τελικό άκρο (NTD) είναι υπεύθυνο για την δέσμευση του ATP και συνδέεται με την ενδιάμεση δομή (MD) μέσω μιας φορτισμένης περιοχής (charged linker). Το καρβόξυ-τελικό άκρο είναι υπεύθυνο για τον ομοδιμερισμό του μορίου και αποτελεί θέση αντίδρασης με συγκεκριμένα συν-τσαπερόνια. Η HSP90 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες πελάτες μέσω των MD και CTD περιοχών. **B.** Στην «ανοιχτή» διαμόρφωση της HSP90 όπου έχει δεσμευτεί ADP, η HSP90 δεσμεύεται κατά προτίμηση από την HOP, ένα συν-τσαπερόνιο, το οποίο μεταφέρει μερικώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στην HSP90 μέσω του συμπλόκου HSP70/40/HIP. Όταν η HSP90 αλλάζει διαμόρφωση και δεσμεύει ATP, απελευθερώνει τα δεσμευμένα συν-τσαπερόνια και μετατρέπεται στην «κλειστή» της διαμόρφωση. Η πρόσδεση της p23 σταθεροποιεί την HSP90 σε δομή που απαιτείται για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης «πελάτη». Αφού απελευθερωθεί η πρωτεΐνη «πελάτης», η HSP90 επανέρχεται πάλι στην αρχική της διαμόρφωση με ADP, που την καθιστά διαθέσιμη για τον επόμενο κύκλο (Centenera *et al.*, 2013).

Η ώριμη λειτουργική πρωτεΐνη είναι ένα διμερές, το οποίο δημιουργείται με τη σύνδεση των καρβόξυ-τελικών άκρων των δύο HSP90 πολυπεπτιδίων, σχηματίζοντας έτσι ένα επίμηκες μόριο (Εικόνα 1.4B). Τα άμινο-τελικά άκρα βρίσκονται σε αντίθετες κατευθύνσεις ενώ εικάζεται ότι σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης τα άκρα αυτά έρχονται κοντά με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριγωνικών δομών (Buchner, 1999). Η άμινο-τελική περιοχή αποτελείται από 8 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές περιοχές και 9 α-έλικες που μαζί συνιστούν την α/β δομή. Η σύνδεση του ATP γίνεται στην περιοχή 15Å, που στην πραγματικότητα είναι μια θήκη που σχηματίζεται από την διαμόρφωση των β-πτυχωτών περιοχών με τις α-έλικες (Buchner, 1999).

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι HSP90 υπάρχουν κυρίως με την μορφή διμερών μορίων, με την περιοχή του διμερισμού να τοποθετείται στα 200 κατάλοιπα του καρβόξυ-τελικού άκρου (CTD). Ένα μεταλλαγμένο μόριο πρωτεΐνης HSP90 στο οποίο είχε αφαιρεθεί το καρβόξυ-τελικό του άκρο και δεν μπορούσε να διμεριστεί ήταν ανίκανο να «σώσει» το στέλεχος της ζύμης στο οποίο είχαν αφαιρεθεί και τα δύο *HSP90* γονίδια (Minami *et al.*, 1994). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι ο διμερισμός του μορίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιολογική δράση του.

1.2.1.2 Ο Ρόλος των HSP90

Οι HSP90, όπως αναφέρθηκε, είναι μία ομάδα υψηλά συντηρημένων πρωτεϊνών που δρουν ως μοριακοί συνοδοί. Ο βασικός τους ρόλος υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι να βοηθούν την ορθή αναδίπλωση πολυπεπτιδίων (Frydman, 2001; Buchner, 1999). Η σημασία τους για τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μεγάλη γιατί κατέχουν ρόλους «κλειδιά» και συμμετέχουν στην αναδίπλωση την ωρίμανση, και στην ενεργοποίηση βασικών πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι υποδοχείς ορμονών και οι μεταγραφικοί παράγοντες (Pearl and Prodromou, 2006). Έχειδειχθεί πως οι HSP90 συμμετέχουν στη σταθεροποίηση ενός δικτύου πρωτεϊνών-πελατών (client proteins) που εμπλέκονται σε ποικίλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επηρεάζουν την ανάπτυξη (Pearl and Prodromou, 2006; Echeverria and Picard, 2010).

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 προσδέονται σε πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο αναδίπλωσης και είναι έτοιμες για ενεργοποίηση ή αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες (Jacob *et al.*, 1995).

Οι HSP90 εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην αποδόμηση των πρωτεϊνών (Young, 2001). Αντίθετα με τα άλλα τσαπερόνια η HSP90 χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό εξειδίκευσης ως προς τις πρωτεΐνες-στόχους. Οι HSP90 δρουν συνεργιστικά με άλλες ομάδες μοριακών συνοδών, όπως είναι οι HSP70, καθώς και με πλήθος συν-τσαπερονίων όπως HSP40, HIP, HOP και p23 (Wang *et al.*, 2004). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη δράση τους είναι η παρουσία και η υδρόλυση του ATP (Εικόνα 1.4B).

Παρά τη μεγάλη αφθονία των HSP90 σε σύγκριση με εκείνη των «πελατών» τους, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης σε απόκριση στο στρες, η ύπαρξή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια υποδεικνύει ότι οι HSP90 συμβάλουν σε πληθώρα λειτουργιών στο κυτταρόπλασμα και στα οργανίδια, είτε υπό φυσιολογικές είτε υπό στρεσογόνες συνθήκες (Berardini *et al.*, 2001). Η απουσία των HSP90 πρωτεϊνών οδηγεί σε μη λειτουργικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών, αλλά ακόμα και στο θάνατο του οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες (Borkovich *et al.*, 1989; Picard, *et al.*, 1990). Επιπλέον μελέτες 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). Χειρισμός των φυτών με το ρυθμιστή ανάπτυξης 24-epibrassinolide οδήγησε σε αύξηση τόσο του αριθμού των μεταγραφημάτων όσο και των επιπέδων της πρωτεΐνης (Wilén *et al.*, 1995; Dhaubhadel *et al.*, 1999).

Η έκφραση των HSP90 εντοπίζεται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, όπως 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, όπως στις μεριστωματικές ζώνες του βλαστού και της ρίζας (Koning *et al.*, 1992) και στα άνθη (Krishna *et al.*, 1995).

Στον άνθρωπο έχει δειχθεί ότι οι HSP90 επηρεάζουν την ενεργοποίηση και σταθερότητα πολλών πρωτεϊνών «στόχων», οι οποίες λειτουργούν σαν ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης και απόπτωσης. Πάνω από 100 γνωστές πρωτεΐνες-πελάτες των HSP90 ρυθμίζουν την πολλαπλή μεταγωγή σήματος που ενεργοποιείται σε διάφορες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο. Η παρεμπόδιση των HSP90 οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση των εν λόγω πρωτεϊνών «πελατών» μέσω του πρωτεασώματος, λειτουργώντας σαν αντικαρκινικός παράγοντας (Kamal *et al.*, 2004).

1.3 Τα Μπρασσινοστεροειδή (Brassinosteroids, BRs)

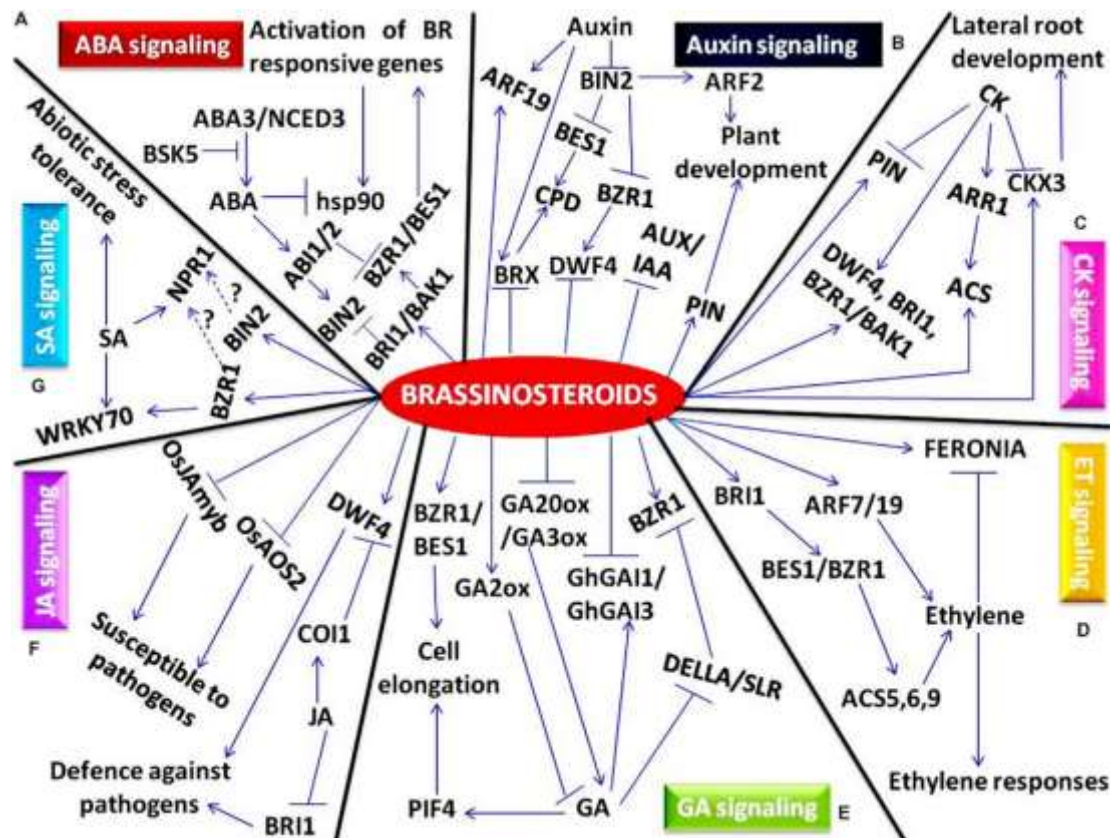
Τα φυτά, προκειμένου να μπορέσουν να αναπτυχθούν σε ένα συνεχόμενα μεταβαλλόμενο περιβάλλον, αλλάζουν συνεχώς το σχήμα τους. Αυτήν η προσαρμοστική ιδιότητα των φυτών απαιτεί την «ενορχήστρωση» πολύπλοκων περιβαλλοντικών σιγνάλων σε κυτταρικό επίπεδο (Belkhadir and Jaillais, 2015). Οι φυτορμόνες επιτρέπουν στα φυτά να αλλάζουν το σχήμα τους, χρησιμοποιώντας δίκτυα μεταγωγής σήματος. Ανάμεσα σε αυτές τις ορμόνες ανήκουν τα μπρασσινοστεροειδή (Brassinosteroids, BRs), μία ομάδα στεροειδών ορμονών η οποία επηρεάζει την απόκριση του φυτού στο περιβάλλον, προωθώντας ή επεμβαίνοντας σε διάφορες πτυχές της ανάπτυξής του (Belkhadir and Jaillais, 2015). Ρυθμίζουν (i) την επιμήκυνση και τη διαίρεση του κυττάρου σε βλαστούς και ρίζες, (ii) τη φωτομορφογένεση, (iii) την αναπαραγωγική ανάπτυξη, (iv) τη γήρανση του φύλλου και (v) την απόκριση σε καταπονήσεις (Clouse and Sasse, 1998). Την οριστική απόδειξη ότι τα μπρασσινοστεροειδή λειτουργούν σαν φυτικές ορμόνες, έδωσαν γενετικές αναλύσεις σε μεταλλάγματα *Arabidopsis Thaliana* στα οποία έχει διαταραχθεί η ομαλή λειτουργία του μονοπατιού των BR ορμονών. Τα φυτά αυτά παρουσιάζουν (i) μικρότερο μήκος υποκοτυλίου, βλαστού και μίσχων λόγω μη ομαλής επιμήκυνσης των κυττάρων σε αυτά τα όργανα, (ii) πιο σκούρα πράσινα φύλλα, (iii) μειωμένη κυριαρχία κορυφής, (iv) καθυστερημένη γήρανση, (v) αρρενοστεριότητα καθώς και (vi) αλλοιώσεις στο σχηματισμό του αγγειακού ιστού (Clouse *et al.*, 1996; Haubrick and Assmann, 2006; Nemhauser and Chory, 2004). Μεταλλάγματα με ανεπαρκή επίπεδα BR, *det2* (de-etiolated 2) και *cpd* (constitutive photomorphogenesis and dwarfism), ενώ παραμένουν για αρκετές ημέρες σε απόλυτο σκοτάδι, εμφανίζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά φυτών που αναπτύσσονται στο φως (Li and Chory 1997; Szekeres *et al.*, 1996). Όλα τα παραπάνω προβλήματα ανάπτυξης που παρουσιάζονται σε μεταλλάγματα με ανεπαρκή επίπεδα μπρασσινοστεροειδών μπορούν να ανατραπούν με χορήγηση εξωγενούς μπρασσινολιδίου (Brassinolide, BL) στο θρεπτικό μέσο, επαναφέροντας έτσι τον κανονικό φαινότυπο.

Αν και το μονοπάτι σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών είναι κυρίως γνωστό για τις δράσεις του στην ανάπτυξη του κυττάρου, πιθανότατα συμβάλλει και στην αυξημένη προσαρμογή στις διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Belkhadir and Chory, 2006) και κατ' επέκταση στην προσαρμογή του φυτού στο περιβάλλον του (Fridman and Savaldi-Goldstein, 2013). Χειρισμός σποροφύτων του φυτού *Brassica napus* με επιβρασσινολιδίο (epibrassinolide, eBL) ενδέχεται να ενισχύει την ανθεκτικότητα του οργανισμού σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης, αυξάνοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση και τη παραγωγή των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών καθώς και μορίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της μετάφρασης (Dhaubhadel *et al.*, 2002). Η μελέτη των Martins *et al.* 2017, έδειξε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την ανάπτυξη της ρίζας, η οποία σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης BRI1.

Οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες που είναι κοινές ανάμεσα στα ζώα και στα φυτά. Ανάμεσα στις διεργασίες αυτές συμπεριλαμβάνονται η κυτταρική διαίρεση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Έχει δειχθεί πως τα μπρασσινοστεροειδή συμμετέχουν σε ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διεργασιών, όπως η ανάπτυξη δευτερογενών ριζών μέσω της τροποποίησης της πολικής μεταφοράς της αυξίνης (Bao *et al.*, 2004), η κυτταρική διαίρεση στους βλαστούς (Nakaya *et al.*, 2002), η ανάπτυξη ινών στο βαμβάκι, η διατήρηση της κυριαρχίας κορυφής, η χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος (Zurek *et al.*, 1994)

κ.ά.. Επιπλέον προωθούν τη φύτευση των σπερμάτων αλληλεπιδρώντας με άλλες ορμόνες όπως GA (Gibberelic Acid, GA) και ABA (Absisic Acid, ABA) (Müssig, 2005), ενισχύουν την επιμήκυνση του γυρεοσωλήνα (Szekeres *et al.*, 1996; Clouse and Sasse, 1998), και προωθούν τη διαφοροποίηση του ξυλώματος κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των αγγείων (Fukuda, 2004) (Εικόνα 1.5).

Η ανάπτυξη των φυτών διαμορφώνεται από τη σύγκλιση πολλών περιβαλλοντικών και ενδογενών σημάτων. Μια τέτοια περίπτωση είναι και η από κοινού δράση του μονοπατιού των BR ορμονών και του μονοπατιού των GA ορμονών για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης κατά τη φωτομορφογένεση. Μία εξήγηση σε μοριακό επίπεδο του ρόλου των BR ορμονών κατά τη φωτομορφογένεση έχει προταθεί από τη μελέτη των Oh *et al.*, 2012 η οποία δείχνει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας PIF4 και BZR1 δημιουργούν ετεροδιμερή, ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση κοινών γονιδίων στόχων. Οι μηχανισμοί όμως που επιτρέπουν την ενοποίηση τέτοιων σηματοδοτικών μονοπατιών παραμένουν ακόμα άγνωστοι.



Εικόνα 1.5 Σχηματικό μοντέλο που απεικονίζει τις αλληλοεπικαλύψεις (crosstalk) διαφόρων φυτορμονών με τα Μπρασσινοστεροειδή (BRs). **A.** BRs – αμπισισικό οξύ, **B.** BRs - αυξίνη, **C.** BRs - κυτοκνίνη CK, **D.** BRs - αιθυλένιο ET **E.** BRs - γιββερελίνη GA, **F.** BRs - jasmonic acid JA, **G.** BRs - salicylic acid SA. Παρουσίαση των διαφορετικών γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων ως βασικό συστατικό στην μεταγραφική ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών. Τα βέλη υποδηλώνουν θετικές επιδράσεις, οι ράβδοι υποδηλώνουν καταστολή και οι άγνωστες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται με διακεκομμένα βέλη (Saini *et al.*, 2015).

1.3.1 Το Μονοπάτι Μεταγωγής Σήματος των Μπρασσινοστεροειδών

Από περίπου 8 φυτορμόνες που ελέγχουν την ανάπτυξη των φυτών, οι BR ορμόνες οι οποίες εμπλέκονται σε σχεδόν όλες τις φάσεις ανάπτυξης του φυτού, είναι οι μόνες που χρησιμοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς για την αντίληψη του

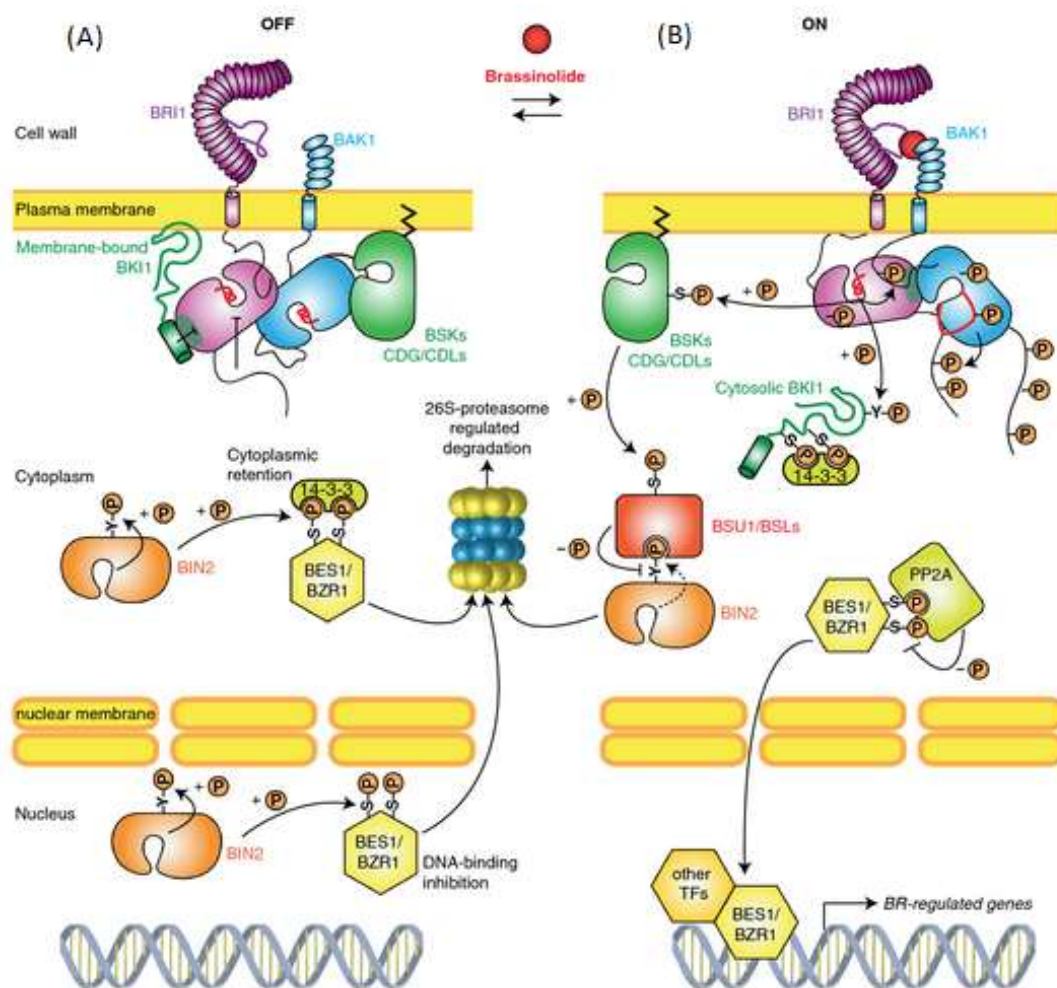
σήματος (Vert and Chory, 2011; Jaillais and Chory 2010; Belkhadir and Chory, 2006; Jaillais and Vert, 2012) Οι υποδοχείς των υπόλοιπων φυτορμονών διανέμονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Vert and Chory, 2011; Jaillais and Chory, 2010).

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασινωστεροειδών ορμονών ξεκινά στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου η ορμόνη γίνεται αντιληπτή από μία οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων LRR-RKs (Leucine Rich Repeats – Receptor Kinases, LRR-RKs). Η πρωτεΐνη BRI1 (Brassinosteroid Insensitive 1) είναι το κύριο μέλος αυτής της οικογένειας. Η πρόσδεση της ορμόνης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα ξεκινά μια αλληλουχία σηματοδότησης που τερματίζεται στον πυρήνα (Belkhadir and Chory, 2006). Η μεταγωγή σήματος από τις BL ορμόνες γίνεται με την εμπλοκή διαφόρων σηματοδοτικών στοιχείων.

Το μπρασινολίδιο (BL), που αποτελεί τον πιο διαδεδομένο και δραστικό εκπρόσωπο των μπρασινωστεροειδών ορμονών στους φυτικούς οργανισμούς, συνδέεται στον υποδοχέα BRI1 μέσω της περιοχής πρόσδεσης στεροειδών που αποτελείται από 100 περίπου αμινοξέα και περιλαμβάνει την περιοχή ID (Island Domain) και τη γειτονική της ακολουθία LRR21 (Εικόνα 1.7). Με την πρόσδεση του BL στον υποδοχέα BRI1, εκείνος ενεργοποιείται, και οδηγεί με τη σειρά του στον ετεροδιμερισμό ενός δεύτερου διαμεμβρανικού υποδοχέα, του BAK1 (BRI1 Associated receptor Kinase 1) (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002; Russinova *et al.*, 2004). Ταυτόχρονα ο υποδοχέας BRI1 φωσφορυλιώνεται *in vivo* σε πολλαπλές ενδοκυτταρικές θέσεις (JM, CT, Kinase) (Εικόνα 1.6, 1.7), διαδικασία που ελέγχει την αποσύνδεση του καταστολέα BKI1 (BRI1-Kinase Inhibitor 1) από την πλασματική μεμβράνη (Jaillais *et al.*, 2011) και την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι BSKs (BR-Signaling Kinase) (Wang *et al.*, 2005; Wang and Chory, 2006; Tang *et al.*, 2008). Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών BSKs από το ετεροδιμερές BRI1/BAK1 (ενεργοποιημένη μορφή υποδοχέα) επάγει την ενεργοποίηση της φωσφατάσης BSU (BRI1-Suppressor 1). Η BSU με τη σειρά της απενεργοποιεί τον αρνητικό ρυθμιστή BIN2 (BR Insensitive 2) (Li *et al.*, 2002). Το γονίδιο *BIN2* κωδικοποιεί για μία κινάση με ομολογία στην κινάση 3 της συνθάσης του γκυκογόνου (GSK3) της ζύμης και των ζώων (Li and Nam, 2002; Choe *et al.*, 2002) (Εικόνα 1.6).

Απουσία BRs η κινάση BIN2 διατηρεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος σε καταστολή φωσφορυλιώνοντας δύο πυρηνικές πρωτεΐνες την BES1 (BRI1-EMS-suppressor1) και την BZR1 (Brassinazole-Resistant 1), σε πολλαπλές ρυθμιστικές περιοχές αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους (He *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005). Η περιοχή με δράση κινάσης στο μόριο της πρωτεΐνης BRI1 παραμένει ανενεργή λόγω της αλληλεπίδρασης του μορίου με την πρωτεΐνη-καταστολέα BKI1. Οι BES1 και BZR1 είναι στενά συγγενικοί μεταγραφικοί παράγοντες που παρουσιάζουν 90% ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο, και αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα (Ryu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002). Η φωσφορυλίωση των BES/BZR1 από την BIN2 αναστέλλει τη δράση τους μέσω των παρακάτω μηχανισμών: (i) Οι πρωτεΐνες 14-3-3s διατηρούν στο κυτταρόπλασμα τους φωσφορυλιωμένους μεταγραφικούς παράγοντες BES1/BZR1 (Gampala *et al.*, 2007). (ii) Οι φωσφορυλιωμένες BES1/BZR1 οδηγούνται για αποδόμηση από το 26S-πρωτεάσωμα μέσω άγνωστου μέχρι στιγμής μηχανισμού (He *et al.*, 2002). (iii) Οι φωσφορυλιωμένοι παράγοντες BES1/BZR1 χάνουν τη δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA *in vitro* (Vert and Chory, 2006) παρεμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή των BR ρυθμιζόμενων γονιδίων (Εικόνα 1.6Α).

Παρουσία BR ορμονών, ενεργοποιείται το μονοπάτι το οποίο περιλαμβάνει και την αποφωσφορυλίωση της κινάσης BIN2 από την φωσφατάση BSU, η οποία ενισχύει την αποδόμηση της BIN2 από το πρωτεάσωμα, παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση της (Peng *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού ενεργοποιεί και μία οικογένεια φωσφατάσης, την PP2A (Protein Phosphatase 2A) η οποία αποφωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες BZR1/BES1 (Tang *et al.*, 2011). RNAi σειρές για γονίδια της οικογένειας *BES1* υποστηρίζουν τον αλληλεπικαλυπτόμενο ρόλο των πρωτεϊνών αυτών στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος των μπρασσινοστεροειδών (Yin *et al.*, 2005). Η ανενεργή πρωτεΐνη BIN2 επιτρέπει στους αποφωσφορυλιωμένους παράγοντες BES1/BZR1 να συσσωρευτούν στον πυρήνα, όπου μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων στόχων (Εικόνα 1.6B).



Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος των BR ορμονών- Α. Όταν το μονοπάτι είναι ανενεργό (απουσία BRs) **Β.** Όταν το μονοπάτι είναι ενεργό (παρουσία BR). Οι φωσφορυλιώσεις αναπαριστώνται με το γράμμα P σε κύκλο, οι κινάσες με μορφές σε σχήμα νεφρού, οι μεταγραφικοί παράγοντες με εξάγωνα και οι φωσφατάσες με ορθογώνια (Belkhadir and Jaillais, 2015).

Στα ζωικά συστήματα η μετάδοση σήματος των στεροειδών ορμονών ξεκινάει κυρίως από ενδοκυτταρικούς υποδοχείς, οι οποίοι ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια δομικά συγγενών πυρηγικών υποδοχέων. Η χαρακτηριστική δομή των τελευταίων αποτελείται από τις ακόλουθες περιοχές: (i) την αμινο-τελική περιοχή ενεργοποίησης

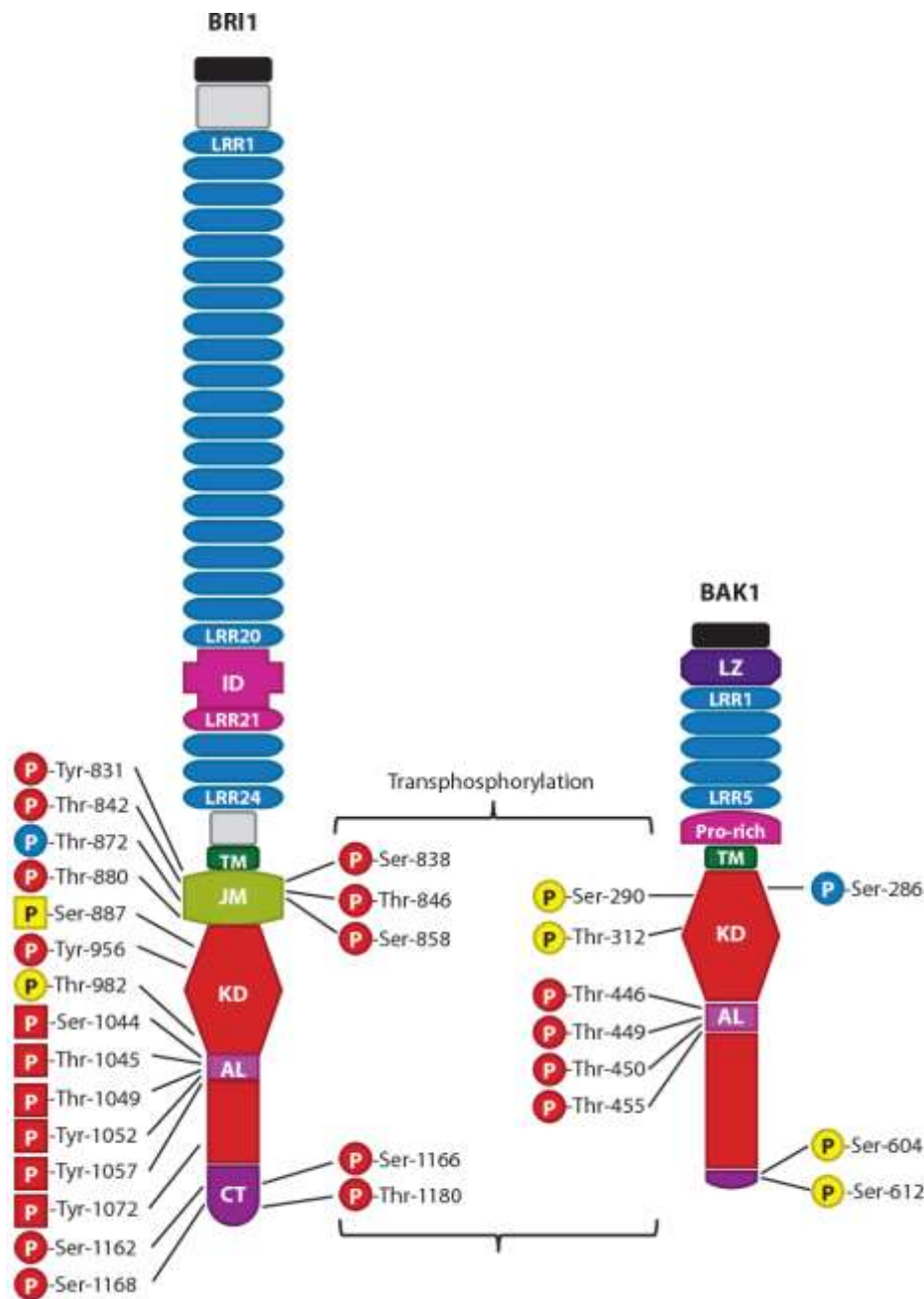
της μεταγραφής, (ii) την μεσαία περιοχή πρόσδεσης στο DNA και (iii) την καρβοξυτελική περιοχή διμερισμού και πρόσδεσης του υποκαταστάτη (Aranda and Pascual, 2001). Απουσία ορμόνης οι υποδοχείς παραμένουν σε μη λειτουργικές διαμορφώσεις, ακινητοποιημένοι μέσω σύνδεσης με θερμοεπαγώμενες πρωτεΐνες και άλλα συντσαπερόνια. Η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του φυτού *A. thaliana* δεν αποκάλυψε την ύπαρξη πρωτεΐνης με υψηλή ομολογία με τους υψηλά συντηρημένους πυρηνικούς υποδοχείς στεροειδών των ζωικών συστημάτων (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

1.3.2 Η Αντίληψη των BR ορμονών

Η πρωτεΐνη BRI1 (Brassinosteroid Insensitive1) αποτελεί το πρώτο στοιχείο του μονοπατιού σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών, το οποίο ταυτοποιήθηκε έπειτα από ανάλυση μεταλλαγμένων σειρών του φυτού *Arabidopsis thaliana* που έδειξε ότι αλλοιώσεις στην εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης BRI1 μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές αναπτυξιακές δυσμορφίες, όπως ακραίους νανισμούς, αλλοιωμένη μορφολογία φύλλων και αγγειακών ιστών, καθυστέρηση στις διαδικασίες της γήρανσης και της άνθησης καθώς και αρρενοστεριότητα (Clouse *et al.*, 1996; Montoya *et al.*, 2002). Επιπλέον, φαινοτυπικές μεταβολές που προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRI1* υποδηλώνουν έντονα την εμπλοκή της κινάσης BRI1 στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των μπρασσινοστεροειδών, σαν υποδοχέας του σήματος (Li and Chory, 1997). Τα μεταλλάγματα *bri1* είναι φαινοτυπικά όμοια με μεταλλάξεις που οδηγούν σε ανεπαρκή επίπεδα BRs με τη διαφορά ότι δεν μπορούν να διασωθούν με εξωγενή, χορήγηση BL (Kauschmann *et al.*, 1996; Li and Chory, 1997). Πρόκειται για έναν υποδοχέα με δράση κινάσης που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (LRR-RK) (Belkhadir and Chory, 2006) (Εικόνα 1.7). Το BL προσδέεται απευθείας με υψηλή εξειδίκευση στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα BRI1 (Kinoshita *et al.*, 2005).

Οι LRR-RKs υποδοχείς αποτελούν τη μεγαλύτερη κλάση υποδοχέων που υπάρχει στο γονιδίωμα της *Arabidopsis thaliana*. Μελέτες πρόσθιας γενετικής, έχουν αποδώσει ρόλους ελέγχου ανάπτυξης καθώς και άμυνας για τις LRR-RK πρωτεΐνες στα φυτά (De Smet *et al.*, 2009; Torii 2004; Marshall *et al.*, 2012). Πάνω από 200 LRR-RKs πρωτεΐνες έχουν μέχρι τώρα αναγνωριστεί στο γονιδίωμα της *Arabidopsis* και αυτές οι πρωτεΐνες είναι πιθανό να αντικατοπτρίζουν μία στρατηγική προσαρμοστικότητας κατά την οποία τα φυτά ενσωματώνουν εξωκυττάρια σήματα για τον προσδιορισμό της τρέχουσας κατάστασης του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται (Dievart *et al.*, 2011; Shiu and Bleecker, 2001). Αυτή η οικογένεια χαρακτηρίζεται από μια συντηρημένη πρωτεϊνική δομή που αποτελείται από (i) μία αμινο-τελική εξωκυτταρική περιοχή (extracellular LRR domain), με πολλαπλά συνεχόμενα μοτίβα LRR (Leucine Rich Repeats) που είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση της ορμόνης, (ii) μια διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane Segment, TM) και (iii) μια κυτταροπλασματική περιοχή (intracellular Kinase Domain, KD) με εξειδικευμένη δράση κινάσης σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Στην περίπτωση του υποδοχέα BRI1, η εξωκυτταρική περιοχή αποτελείται από: (i) ένα αμινο τελικό πεπτίδιο σήματος (N-terminal Signal Peptide) και (ii) μια ομάδα 70 αμινοξέων (Island Domain) που διακόπτει τα LRR μεταξύ των LRR20 και LRR21 (Kim and Wang, 2010; Kinoshita *et al.*, 2005). Έχει δειχθεί ακόμα ότι 94 aa, που περιλαμβάνουν την ID (Island Domain: 70 aa) και την γειτονική LRR21, αποτελούν την ελάχιστη θέση πρόσδεσης των μπρασσινοστεροειδών (Kinoshita *et al.*, 2005) (Εικόνα 1.7).

Όπως αναφέρθηκε, η ορμόνη BL έχει προταθεί ότι δρα σαν «γέφυρα» (molecular bridge), η οποία προωθεί τη σύνδεση του υποδοχέα των BR ορμονών (BRI1) με έναν ακόμη διαμεμβρανικό υποδοχέα, την πρωτεΐνη BAK1 (Santiago *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2013). Η πρωτεΐνη BAK1, ακόμη μία LRR-RK πρωτεΐνη, γνωστή και με το όνομα SERK3 (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 3) ανήκει σε μία μικρή οικογένεια πρωτεϊνών η οποία απαρτίζεται από 5 μέλη. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας BRI1 έχει την ικανότητα να ετεροδιμερίζεται με τις ομόλογες με το BAK1 πρωτεΐνες SERK1 και SERK4 (Gou *et al.*, 2012). Οι μόνες δομικές διαφορές που παρατηρούνται στο μόριό του υποδοχέα BAK1 σε σχέση με τον BRI1 είναι ότι αποτελείται από μια μικρότερη εξωκυτταρική περιοχή με πέντε μόνο LRRs καθώς και ότι από το μόριο του λείπει η ομάδα των 70 αμινοξέων (Εικόνα 1.7) (Kim and Wang, 2010).



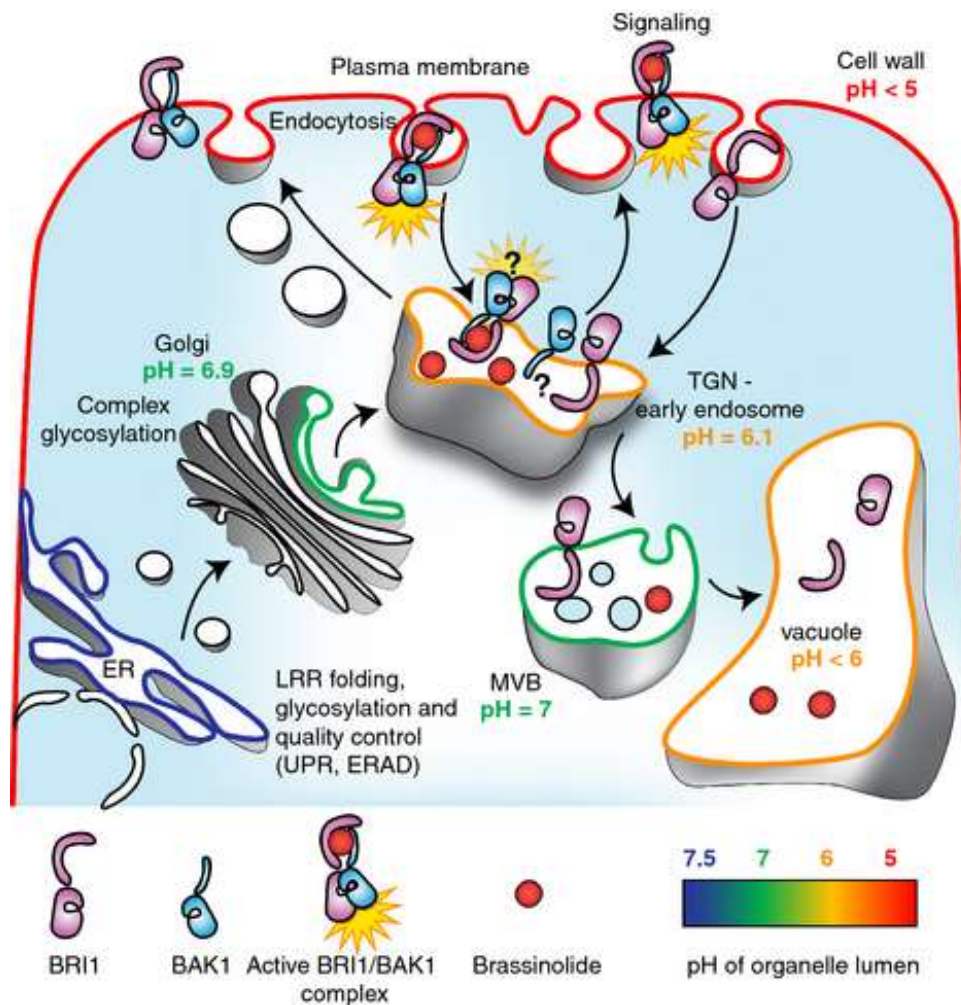
Εικόνα 1.7 Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων των BR ορμονών, BRI1 (Brassinosteroid-

insensitive1) και BAK1 (BRI1 associated receptor kinase 1). Η πρωτεΐνη BRI1 αποτελείται από 24 επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (LRR), μια ομάδα 70 αμινοξέων (ID), μια διαμεμβρανική αλληλουχία (TM), μια παραμεμβρανική περιοχή (JM), μια περιοχή κινάσης (KD) και μια καρβοξυτελική περιοχή (CT). Η πρωτεΐνη BAK1 αποτελείται από 4 φερμουάρ λευκίνης (LZ), 5 LRR, μια περιοχή πλούσια σε προλίνη (pro-rich), περιοχή TM, KD και CT. Οι περιοχές που δέχονται το σήμα απεικονίζονται με μαύρο κουτί, ενώ οι ακαθόριστες περιοχές με γκρι κουτί. Η περιοχή ενεργοποίησης των κινασών συμβολίζεται με (AL). Οι επιβεβαιωμένες θέσεις φωσφορυλίωσης συμβολίζονται με κύκλους και το γράμμα P, ενώ οι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης συμβολίζονται με τετράγωνο και το γράμμα P (Kim and Wang, 2010).

Αναλύσεις σε μεταλλάξεις της πρωτεΐνης BRI1 κατέδειξαν το σημαντικό ρόλο των διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης στη λειτουργία αυτής *in vivo* (Li and Chory 1997; Noguchi *et al.*, 1999; Friedrichsen *et al.*, 2000). Στην τομάτα, η πρωτεΐνη BRI1 βρέθηκε να συνδέεται, πέρα από τα στεροειδή, με ένα μικρό πεπτίδιο, τη συστεμίνη, το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς άμυνας έναντι παθογόνων (Wang and He, 2004).

Οι πρωτεΐνες BRI1 και BAK1 παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο έκφρασης και έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη BAK1 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης παρουσία της πρωτεΐνης BRI1 (Russinova *et al.*, 2004).

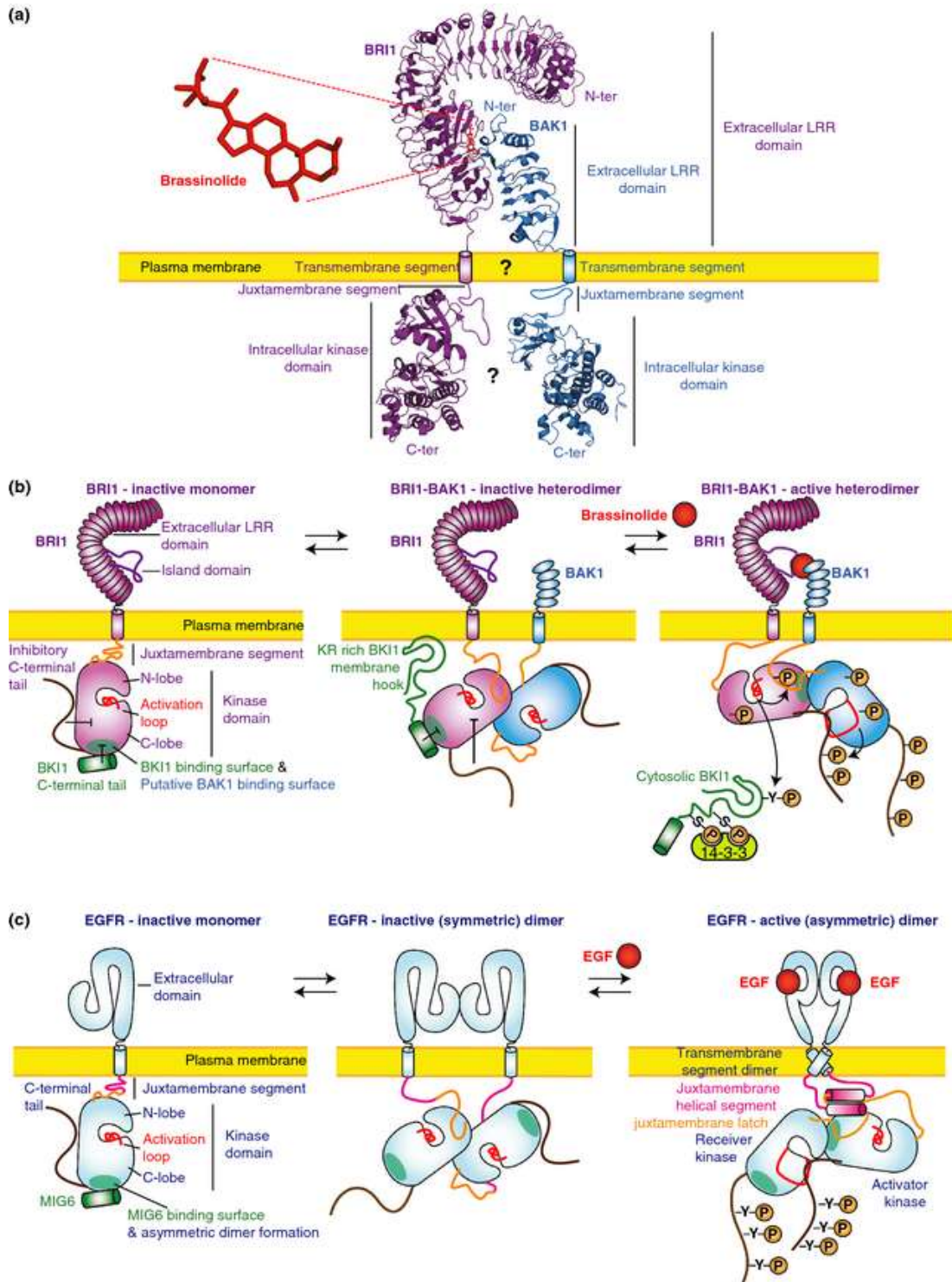
Μελέτες έχουν δείξει ότι ο BRI1 εντοπίζεται όχι μόνο στην πλασματική μεμβράνη αλλά και σε διάφορα ενδοκυτταρικά οργανίδια, όπως τα πρώιμα και όψιμα ενδοσώματα και στο χυμοτόπιο (Russinova *et al.*, 2004; Geldner *et al.*, 2007; Jaillais *et al.*, 2008). Πριν η πρωτεΐνη φθάσει στην πλασματική μεμβράνη η εξωκυττάρια περιοχή και συγκεκριμένα οι LRR περιοχές υποβάλλονται σε διάφορα στάδια ελέγχου που περιλαμβάνουν τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την αποικοδόμηση της (Su *et al.*, 2011; 2012). Μετά την έξοδο της πρωτεΐνης από το ER, αυτή αρχίζει να ανακυκλώνεται μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και των ευαίσθητων σε brefeldin A (BFA) ενδοσωμάτων, με τρόπο ανεξάρτητο της ορμόνης που προσδέεται (Geldner *et al.*, 2007). Αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης BRI1 στα ενδοσώματα, μετά από χειρισμό με BFA, παρατείνει τον σηματοδοτικό μηχανισμό των μπρασσινοστεροειδών (Geldner *et al.*, 2007). Όμως δεν είναι ακόμη σαφές εάν ο BRI1 μπορεί να σηματοδοτεί από δύο διαφορετικές υποκυτταρικές θέσεις (Belkhadir and Jaillais, 2015) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Η κυτταρική διακίνηση του υποδοχέα BRI1 και οι επιπτώσεις της σύνδεσης και αποσύνδεσης του BL. Το '?' υποδηλώνει ότι δεν είναι γνωστό εάν το διμερές BRI1/BAK1 θα μπορούσε να σηματοδοτεί από τα ενδοσώματα και εάν το μπρασσινολίδιο διαχωρίζεται από τον BRI1 όταν φθάσει στα ενδοσώματα (Belkhadir and Jaillais, 2015).

Απουσία ορμονών BR ο υποδοχέας BRI1 εντοπίζεται με ομοδιμερή διαμόρφωση στην πλασματική μεμβράνη (Kim and Wang, 2010; Jaillais *et al.*, 2011) εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εσφαλμένη μεταφορά σημάτων (Jaillais *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Συνεπώς η αρχική πρόσδεση του BL στην ID του υποδοχέα μπορεί να συμβαίνει σε μονομερή της BRI1 πρωτεΐνης, χωρίς να αποκλείεται η πιθανότητα το BL να προσδένεται στο BRI1 που αποτελεί μέρος ετεροδιμερούς με τον BAK1. Σε απουσία BRs, η περιοχή κινάσης του BRI1 διατηρείται σε αδρανή κατάσταση μέσω μηχανισμών cis- και trans- με τη σύνδεση του BKI1 στο C-τελικό άκρο (Wang *et al.*, 2005; Wang and Chory, 2006) (Εικόνα 1.9B). Η πρόσδεση του BL στο ανενεργό ετεροδιμερές επιτρέπει την ενεργοποίηση του συμπλόκου (Εικόνα 1.9B) η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση των κινασών τους (Li *et al.*, 2002; Nam and Li 2002; Russinova *et al.*, 2004). Έτσι φαίνεται πως η πρωτεΐνη BAK1 εμπλέκεται μάλλον στην ενεργοποίηση του BRI1, παρά στην μετάδοση του σήματος (Kim and Wang, 2010). Αντίθετα παρουσία του καταστολέα BKI1, μελέτες *in vitro* (Wang and Chory, 2006; Wang *et al.*, 2014) δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση και η αμοιβαία φωσφορυλίωση των κινασών δεν υφίσταται. Η δημιουργία του συμπλόκου BRI1-BL-BAK1 αποδεσμεύει με ταχύτατους ρυθμούς την πρωτεΐνη BKI1 από την πλασματική μεμβράνη (Wang and Chory, 2006) μέσω φωσφορυλίωσης ενός κατάλοιπου Tyr

(Y211) (Wang and Chory 2006; Jaillais *et al.*, 2011). Η αποδέσμευση αυτή, η οποία ενισχύεται από τη φωσφορυλίωση καταλοίπων Ser σε περιοχές της πρωτεΐνης 14-3-3, επιτρέπει την φωσφορυλίωση της κινάσης του BAK1 από το BRI1 (Wang *et al.*, 2005, 2008). Η φωσφορυλιωμένη πλέον BAK1 φωσφορυλιώνει το BRI1, διαδικασία που οδηγεί στη μετάδοση του σήματος από την πλασματική μεμβράνη στο κυταρόπλασμα. Παρόλο που το συγκεκριμένο μοντέλο ενεργοποίησης παραμένει υποθετικό, φαίνεται να είναι παρόμοιο με τους μηχανισμούς ενεργοποίησης των υποδοχέων RTKs (Receptor Tyrosine Kinases) στα ζώα. Η σηματοδότηση μέσω των RTK κατά την απουσία πρόσδεσης ligand δημιουργεί διμερή (ομοδιμερή στην περίπτωση του EGFR), τα οποία αναδιοργανώνονται μετά την πρόσδεση του μορίου δημιουργώντας ασύμμετρα διμερή (Zhang *et al.*, 2006; 2007; Jura *et al.*, 2009). Τον ρόλο του BKI1 σε αυτή την περίπτωση παίζει, μία πρωτεΐνη καταστολέας MIG6 (Mitogen Induced Gene 6) (Εικόνα 1.9C).



Εικόνα 1.9 Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την ενεργοποίηση του **BRI1**. **Α.** Σχηματικό μοντέλο αλληλεπίδρασης **BRI1/BAK1** και **Β.** Ενεργοποίησης, σε αναλογία με **Γ.** τον μηχανισμό ενεργοποίησης του υποδοχέα **EGFR** στον άνθρωπο. Οι φωσφορυλιώσεις αναπαριστώνται με το γράμμα **P** σε κύκλο. Το '?' υποδηλώνει ότι η συνεισφορά των διαμεμβρανικών περιοχών (transmembrane domains) στη δημιουργία του συμπλόκου **BRI1/BAK1** είναι άγνωστη (Belkhadir and Jaillais, 2015).

Η κατανόηση της απενεργοποίησης του υποδοχέα είναι εξίσου σημαντική με την κατανόηση του μηχανισμού της ενεργοποίησης του καθώς η ταχύτητα και ο τρόπος απενεργοποίησης θα καθορίσουν το εύρος και τη διάρκεια της σηματοδότησης που παρέχεται από την ορμόνη. Στα ζωικά συστήματα οι υποδοχείς

μπορούν να απενεργοποιηθούν με αποδέσμευση του υποκαταστάτη, που συμβαίνει λόγω αλλαγής pH κατά τη μεταφορά στα όξινα τμήματα των ενδοσωμάτων (Rudenko *et al.*, 2002). Στα φυτά όμως κάτι τέτοιο δε θα ήταν δυνατόν καθώς το pH είναι ήδη αρκετά χαμηλό στον εξωκυττάριο χώρο που γίνεται η πρόσδεση του BL στον BRI1. Σχεδόν τίποτα δεν είναι γνωστό για τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η απενεργοποίηση του BRI1. Η ταυτόχρονη υπερέκφραση των BRI1 και BAK1, οδήγησε σε δραματική μετατόπιση του BRI1 προς τα ενδοσώματα, όπως παρατηρήθηκε σε πρωτοπλάστες καπνού. Παρόμοιες μελέτες δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση BRI1/BAK1 εμφανίζεται στα ενδοσώματα κατά προτίμηση, καθώς και σε περιορισμένες περιοχές πλασματικής μεμβράνης (Russinova *et al.*, 2004). Αυτό υποδηλώνει ότι το BAK1 πιθανώς να ρυθμίζει με κάποιον τρόπο την ενδοκύτωση του BRI1 (Russinova *et al.*, 2004).

Μελέτες στα ζωικά συστήματα, στους υποδοχείς των οιστρογόνων (Devin-Leclerc *et al.*, 1998; Elbi *et al.*, 2004) και στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών ορμονών (Echeverría *et al.*, 2009) έχουν δείξει ότι για την μετακίνηση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στον πυρήνα είναι απαραίτητη η παρουσία των HSP90. Αν και για μεγάλο χρονικό διάστημα πιστευόταν ότι η HSP90 μπορεί να εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος των μπρασσινοστεροειδών στους φυτικούς οργανισμούς με τρόπο παρόμοιο με τη σηματοδότηση στα ζωικά συστήματα (Sangster and Queitsch, 2005), πρόσφατα αποδείχθηκε ότι οι HSP90 αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα BES1 (Lachowiec *et al.*, 2013; Shigeta *et al.*, 2014). Πρόσφατα δεδομένα τα οποία δείχνουν αλληλεπίδραση της BIN2 με τις HSP90.1 και HSP90.3 υποδεικνύουν ότι η ενεργή μορφή των HSP90 είναι απαραίτητη για την πυρηνική τοποθέτηση της κινάσης BIN2 (Samakovli *et al.*, 2014). Λανθασμένη τοποθέτηση της αλληλεπίδρασης HSP90/BIN2, καθιστά την κινάση BIN2 ανίκανη να δράσει σαν αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης των μπρασσινοστεροειδών στον πυρήνα (Samakovli *et al.*, 2014). Επιπλέον έχει δειχθεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των HSP90.1 και HSP90.3 με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα BRI1 (πειραματικά δεδομένα εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, ΓΠΑ) καθώς και με την εξωκυτταρική περιοχή του μορίου (Καλτσά Διπλωματική, 2017). Ακόμη προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ, φανερώνουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης ολόκληρης της πρωτεΐνης BAK1 με τις κυτταροπλασματικές HSP90, με τη μέθοδο BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) ή SPLIT-GFP.

Η μεταγωγή του σήματος των μπρασσινοστεροειδών ορμονών έχει πλέον δειχθεί ότι είναι διασυνδεδεμένη και αλληλοεπικαλυπτόμενη με μονοπάτια άλλων ορμονών που εν τέλει συνεισφέρουν στη δημιουργία ποικίλων φαινοτύπων για την καλύτερη προσαρμογή του φυτού στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποδεικνύουν αυτές τις αλληλοεπικαλύψεις στο επίπεδο κυρίως του αρνητικού ρυθμιστή BIN2 και των μεταγραφικών παραγόντων BES1/BZR1 (Wang *et al.*, 2014). Το μεταγραφικό δίκτυο των BR ορμονών, μέσα από τη δράση των BES1/BZR1 παρέχει ενδείξεις αλληλοεπικάλυψης διαφορετικών μονοπατιών, όπως η άνθηση, η φωτο-/σκοτο- μορφογένεση και η βλάστηση των σπερμάτων (Zhu *et al.*, 2013).

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Σαν υλικό για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana ecotype Columbia* το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Brassicaceae* (Σταυρανθή). Το φυτό *Arabidopsis* ενδείκνυται ιδιαίτερα για πειράματα λόγω του μικρού του μεγέθους, του μικρού κύκλου ζωής του, του μικρού του γενώματος, του μεγάλου αριθμού σπερμάτων που παράγει και των σχετικά εύκολων συνθηκών καλλιέργειάς του.

2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας φυτικού υλικού

Τα σπέρματα του φυτού ενυδατώνονται για 24 h στους 4 °C με σκοπό τη διακοπή του ληθάργου.

Τα σπέρματα απολυμαίνονται: Απομακρύνεται το νερό, με τη χρήση πιπέτας Pasteur και προστίθεται αιθανόλη 70%. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 10-20 sec και η αιθανόλη απομακρύνεται.

Προστίθεται χλωρίνη 30% και τα σπέρματα αναδεύονται για 1 min. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar flow).

Το διάλυμα χλωρίνης απομακρύνεται και ακολουθούν πέντε ξεπλύματα με dH₂O, 1 min τη φορά.

Τα σπέρματα μεταφέρονται σε τρυβλία Petri που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (MS), όπου «στρώνονται» σε σειρές.

Τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για περίπου 30 min και στη συνέχεια σφραγίζονται με ταινία parafilm.

Τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22 °C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 16 h φως/ 8 h σκοτάδι).

Μετά από δύο εβδομάδες περίπου τα νεαρά φυτά μεταφέρονται με τη χρήση λαβίδας σε γλαστράκια με χώμα, όπου θα συνεχίσουν την 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.

Στην παρούσα εργασία για τα πειράματα παρατήρησης φυτών 3 ημερών στο μικροσκόπιο ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Φυτά BAK1:BAK1:GFP και Col-0 στρώθηκαν σε τρυβλία MS (§1.1.2) για 3 ημέρες σε συνθήκες 16 h φως/8 h σκοτάδι. Οι ίδιες σειρές στρώθηκαν επίσης για την ανάπτυξή τους σε συνθήκες πλήρους σκότους.

Έπειτα από 3 ημέρες τα φυτά μεταφέρονται με τη βοήθεια λαβίδας σε διαφορετικά tubes με MS.

Κατάλληλη ποσότητα GDA προστίθεται σε MS σε τελική συγκέντρωση 10 μM.

Τα φυτά παραμένουν στο σκοτάδι, διότι το GDA είναι φωτοευαίσθητο, για 12 h (short treatment).

Ακολουθεί παρατήρηση των φυτών σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.1.2 Στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης φυτών MS (Murashige and Skoog)

MS:

0,444% w/v Murashige & Skoog inc. vitamins

0,05% w/v MES

2% w/v Sucrose

0,3% w/v Phytigel

pH= 5,7 (using KOH, 1N)

Στην περίπτωση που στο θρεπτικό μέσο είναι επιθυμητή η παρουσία αντιβιοτικού, η προσθήκη 0,3% w/v Phytigel κατά την παρασκευή του MS αντικαθίσταται από 0,6% w/v Agarose.

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

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Κάθε ένα από τα αντιδραστήρια (Πίνακας 2.1) προστίθεται σε φιαλίδιο χωρητικότητας 0,5ml, κατάλληλο για αντιδράσεις PCR (PCR tubes), που είναι τοποθετημένο στον πάγο. Ακολουθεί ανάμειξη και φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στην ειδική συσκευή η οποία προγραμματίζεται κατάλληλα για την αντίδραση (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.1 Γενικό πρωτόκολλο αντίδρασης PCR με το ένζυμο KAPA HiFi DNA Polymerase σε τελικό όγκο 50 μl.

Component	Final Concentration
5X KAPA HiFi Buffer⁽¹⁾	1X
10 mM dNTP Mix	0,3 mM each
10μM Forward Primer	0,3 μM
10μM Reverse Primer	0,3 μM
1U/μl KAPA HiFi DNA Polymerase	1 U
Template DNA	1 ng ⁽²⁾
ddH₂O	-

⁽¹⁾Το HiFi Buffer περιέχει MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 2 mM στο 1X.
⁽²⁾Σαν template χρησιμοποιείται 10-100 ng για γενωματικό DNA και 0,1-1ng για λιγότερο πολύπλοκο DNA (π.χ. πλασμιδιακό)

Πίνακας 2.2 Γενικό πρότυπο θερμοκύκλων αντίδρασης PCR.

Step	Temperature °C	Duration	Cycles
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing ⁽¹⁾	60 -75	15 sec	25-40
Extension	72	15-60 sec/kb	
Final Extension	72	1 min/kb	1
Hold	4-10	∞	1

⁽¹⁾Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το στάδιο του υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης T_m των εκκινητών και υπολογίζεται από τον τύπο $69,3 + 0,41 \times GC\% - 650/\text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$.

⁽²⁾Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος. Για τμήματα μεγαλύτερα των 2kb ο χρόνος επιμήκυνσης είναι 1min/kb.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές των οποίων η ακολουθία δίνεται στον Πίνακα 2.3. Για την ενίσχυση της εξωκυτταρικής περιοχής του γονιδίου *BAK1* (*BAK1-ED*) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *BAK1YeastF* και *BAKaYeastR*. Για την ενίσχυση της κινάσης του γονιδίου *BAK1* (*BAK1-KD*) χρησιμοποιήθηκαν οι *BAKbYeastF* και *BAK1YeastR*. Για την ενίσχυση της εξωκυτταρικής περιοχής που δεν διαθέτει πεπτίδιο συνθήματος (*BAK1-ED-sp*) χρησιμοποιήθηκαν οι *BAKaYeastF* και *BAKaYeastR*.

Πίνακας 2.3 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του *BAK1*.

<u>Όνομασία εκκινητή</u>	<u>Νουκλεοτιδική αλληλουχία</u>
<i>BAK1YeastF</i>	5' - CCCTGGATCCATATGGAACGAAGATTAATGA - 3'
<i>BAKaYeastR</i>	5' - TTAGGATCCATGCCGAAGGTGATGCTCTAAGTG - 3'
<i>BAKaYeastR</i>	5' - ATAGTCGACCCACCAAGCTAGTGCAATGG - 3'
<i>BAKbYeastF</i>	5' - TTTGGATCCATCGAAGGAAAAAGCCGCAGGAC - 3'
<i>BAK1YeastR</i>	5' - ATAGTCGACCCACCAAGCTGTGCAATGG - 3'

Το παραπάνω πρόγραμμα θερμοκύκλων αντίδρασης PCR του Πίνακα 2.2 αποτελεί ένα γενικό πρότυπο συνθηκών της αντίδρασης PCR και επιδέχεται τροποποίησης αναλόγως της εκάστοτε επιθυμητής εφαρμογής. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν τα προγράμματα που παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.4, 2.5, 2.6.

Πίνακας 2.4 Πρόγραμμα θερμοκύκλων αντίδρασης PCR για την ενίσχυση BAK1-ED.

<u>Step</u>	<u>Temperature °C</u>	<u>Duration</u>	<u>Cycles</u>
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing ⁽¹⁾	64	15 sec	25-40
Extension	72	60 sec	
Final Extension	72	2 min	1
Hold	10	∞	1

Πίνακας 2.5 Πρόγραμμα θερμοκύκλων αντίδρασης PCR για την ενίσχυση BAK1-KD.

<u>Step</u>	<u>Temperature °C</u>	<u>Duration</u>	<u>Cycles</u>
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing ⁽¹⁾	64	15 sec	25-40
Extension	72	80 sec	
Final Extension	72	2 min	1
Hold	10	∞	1

Πίνακας 2.6 Πρόγραμμα θερμοκύκλων αντίδρασης PCR για την ενίσχυση BAK1-ED-sp.

<u>Step</u>	<u>Temperature °C</u>	<u>Duration</u>	<u>Cycles</u>
Initial denaturation	95	3 min	1
Denaturation	98	20 sec	
Annealing ⁽¹⁾	65	15 sec	25-40
Extension	72	20 sec	
Final Extension	72	2 min	1
Hold	10	∞	1

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR, τα δείγματα αναλύονται σε gel αγαρόζης πυκνότητας 0,8-1,2% ανάλογα με το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων. Η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται στους -20 °C.

2.2.1 PCR αποικιών (PCR Colonies)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί έναν εύκολο τρόπο εντοπισμού αποικιών βακτηρίων (*E. coli* ή *A. Tumefaciens*) που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Χρησιμοποιείται συνήθως στις περιπτώσεις φορέων στους οποίους η ταυτοποίηση ύπαρξης του ένθετου DNA δεν είναι δυνατή με τη δοκιμή της β-

γαλακτοσιδάσης και κατά συνέπεια η επιλογή μπλε/άσπρων αποικιών. Όταν είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ένθετου DNA, σχεδιάζονται κατάλληλοι εκκινητές και το προϊόν της αντίδρασης πιστοποιεί την παρουσία ή απουσία του εν λόγω ενθέτου. Χρησιμοποιώντας την τεχνική αυτή η ταυτοποίηση γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα:

Με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγεται βακτηριακή αποικία από στερεό υπόστρωμα και τοποθετείται σε erpendorf που περιέχει 10-15 μl ddH₂O.

Σε PCR tube προστίθενται τα αντιδραστήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ενώ ως μήτρα DNA χρησιμοποιείται ποσότητα αιωρήματος της συγκεκριμένης βακτηριακής αποικίας.

Η θερμοκρασία υβριδισμού καθορίζεται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται και ο χρόνος επιμήκυνσης από το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται. Ο αριθμός των θερμοκύκλων είναι 20-25.

Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα PCR τα δείγματα αναλύονται σε gel αγαρόζης. Τα αιωρήματα των θετικών βακτηριακών αποικιών μεταφέρονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν χρησιμοποιούνται για περαιτέρω επεξεργασία ή/και αναμιγνύονται με γλυκερόλη για αποθήκευση στους -80 °C.

2.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων η οποία είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός (UV). Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,8% ως 2% αγαρόζη w/v.

2.3.1 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Σε διάλυμα 1X TAE προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης.

Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα γίνει διαφανές.

Προσθήκη διαλύματος EtBr σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v.

Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Η χτένα απομακρύνεται, η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα χρωστικής 5X Loading dye.

Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής που δημιουργήθηκαν από τη χτένα («πηγάδια»).

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται σε ηλεκτρικό πεδίο και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120 V που ποικίλλει ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής και την περιεκτικότητά της σε αγαρόζη. Τα δείγματα μεταναστεύουν από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο αφού είναι αρνητικά φορτισμένα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν gel αγαρόζης από 0,8% έως 2% καθώς και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται παρακάτω.

0,8% Agarose gel:

0,8% w/v agarose, 1XTAE, 0,005% v/v EtBr

2% Agarose gel:

2% w/v agarose, 1XTAE, 0,005% v/v EtBr

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης:

1XTAE, 0,005% v/v EtBr

5X Loading Dye:

1,25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 1,25% w/v κυανολοξυλένιο
Στην τελική σύσταση του 1X διαλύματος χρωστικών, προστίθεται 50% w/v σουκρόζη

TAE 50X:

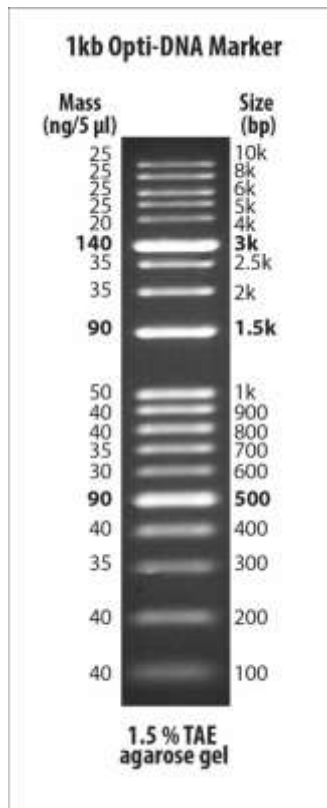
24,2g (w/v) Tris-base, 100 ml 0,5 EDTA pH= 8 (Ethylene- Diamine- Tetracetic Acid disodium salt), 57 ml CH₃COOH για 1 L διαλύματος.

Ethidium Bromide (EtBr):

10mg/ml H₂O. Αποθήκευση σε σκουρόχρωμο γυάλινο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

2.3.2 Δείκτης μοριακών μεγεθών

Για εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών του DNA (π.χ. μετά από πέψη), στην ηλεκτροφόρηση δίπλα στα δείγματα τοποθετείται δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder) ο οποίος έχει καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 1 kb Opti-DNA ladder.

2.4 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Όταν είναι επιθυμητή η ανάκτηση DNA από μία πηκτή αγαρόζης (π.χ. μετά από ενίσχυση γονιδίων ή μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού) πραγματοποιείται η εξής διαδικασία:

Όταν ο διαχωρισμός του επιθυμητού κλάσματος είναι ικανοποιητικός ακολουθεί αφαίρεση της ζώνης που περικλείει το επιθυμητό κλάσμα με τη βοήθεια κοπιδιού σε τράπεζα UV.

Τοποθέτηση του κομματιού της πηκτής που αφαιρέθηκε σε καθαρό φιαλίδιο erpendorf.

Απομόνωση και καθαρισμός του DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της *Macherey-Nagel, Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up Kit*, DNA extraction from agarose gel.

2.5 Πέψη νουλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού

Συνήθως οι πέψεις δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού λαμβάνουν χώρα σε σχετικά μικρούς όγκους, 20-50 µl.

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH₂O, 1/10 του όγκου 10X ρυθμιστικού διαλύματος, το DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού:

Πίνακας 2.7 Γενικό πρωτόκολλο αντίδρασης πέψης.

<u>Component</u>	<u>Final Concentration</u>
10X Buffer	10%
DNA	max 80%
Restriction enzyme(s)	max 10%
ddH ₂ O	Up to 100%

Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 1-12 h στην βέλτιστη θερμοκρασία δράσης για κάθε ένζυμο. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού αν και η πλειονότητά τους λειτουργεί άριστα σε θερμοκρασία 37 °C.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πέψεις με σκοπό τη δημιουργία συμπληρωματικών άκρων μεταξύ φορέα και ενθέτου καθώς και διαγνωστικές πέψεις μετά τη διαδικασία της λιγοποίησης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα ένζυμα, οι συνθήκες αντίδρασης και τα συστατικά της, όπως χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα.

Πίνακας 2.8 Ένζυμα περιορισμού με τις αντίστοιχες θέσεις κοπής, που χρησιμοποιήθηκαν.

<u>Restriction enzyme</u>	<u>Sequence</u>	<u>Reaction Conditions</u>
BamHI (Promega)	5'... G [▼] GATCC... 3' 3'... CCTAGG [▲] ... 5'	37 °C
XhoI (NEB)	5'... C [▼] TGAG... 3' 3'... GAGCT [▲] C... 5'	37 °C
SalI (NEB)	5'... G [▼] TCGAC... 3' 3'... CAGCT [▲] G... 5'	37 °C
EcoRI (Promega)	5'... G [▼] AATTC... 3' 3'... CTTAAG [▲] ... 5'	37 °C
PstI	5'... C [▼] TGCA [▼] G... 3' 3'... G [▲] ACGTC... 5'	37 °C
HindIII	5'... A [▼] AGCTT... 3' 3'... TTCGAA [▲] ... 5'	37 °C

2.6 Ενοποίηση τμημάτων DNA

Κατά την αντίδραση ενοποίησης δίκλινα μόρια, DNA με κολλώδη άκρα (3' ή 5' προεξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα ενώνονται μεταξύ τους. Η αντίδραση ενοποίησης πραγματοποιείται κάτω από κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό μορίων-χίμαιρες. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων DNA και η χρήση αλκαλικής φωσφατάσης διευκολύνουν κατά κανόνα το σχηματισμό τέτοιων μορίων.

Η διαδικασία της ενοποίησης στηρίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να αναγνωρίζει άκρα και να συνδέει τμήματα με κολλώδη (5' ή 3' προεξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα, χρησιμοποιώντας ATP ως συνένζυμο. Οι χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς καθίστανται γραμμικοί μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού, οπότε και είναι δυνατή η ενοποίησή τους με κατάλληλο τμήμα DNA μέσω της λιγάσης. Πριν την αντίδραση, προηγείται απομόνωση και καθαρισμός από πηκτή αγαρόζης (§2.4) τόσο του προς κλωνοποίηση κλάσματος DNA όσο και του πλασμιδιακού φορέα στον οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί.

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται:

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

Αναλογία = μέγεθος φορέα (Kb) x ng ενθέτου/ng φορέα x μέγεθος ενθέτου (Kb).

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

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

1 μl T4 DNA λιγάσης (3 Weiss units).

ddH₂O μέχρι συμπλήρωση του όγκου της αντίδρασης.

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

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς, pGEM T-Easy και pGADT7, pGBK7. Η κάθε αντίδραση ενοποίησης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 15-20 μl.

2.7 Βακτηριακά κύτταρα και μετασχηματισμός

2.7.1 *Escherichia Coli (E.coli)*

Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA είναι το στέλεχος DH5a. Το στέλεχος αυτό έχει υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού (>2x10⁶ transformants/μg of plasmid DNA). Η έλλειψη της Δ(lacZ) M15 περιοχής από το γονότυπό του είναι χαρακτηριστικό του στελέχους DH5a. Η περιοχή αυτή είναι η περιοχή που εκφράζει το καρβόξυ- τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την α-συμπληρωματικότητα με το lac a τμήμα, το οποίο κωδικοποιείται από αρκετούς πλασμιδιακούς φορείς. Η ιδιότητα αυτή παρέχει τη δυνατότητα επιλογής μπλέ - άσπρων αποικιών σε θρεπτικό μέσο με τη δοκιμή X-gal και IPTG.

2.7.1.1 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. Coli*

Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους DH5a αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 h στους 37 °C. Το βακτηριακό αυτό στέλεχος χρησιμοποιείται συνήθως για την κλωνοποίηση πλασμιδίων έχοντας υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ($>1 \times 10^6$ transformants/ μg pUC19 DNA). Ο γενότυπος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη $\Delta(\text{lacZ})$ M15.

2ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37 °C μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει $\text{OD}_{600} = 0,5$.

Η καλλιέργεια τοποθετείται για 10min στον πάγο και τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση για 5min στις 5000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.

Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε μισό όγκο του αρχικού, 25 mM παγωμένου CaCl_2 . Η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο.

Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης.

Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 75 mM παγωμένου CaCl_2 , σε όγκο διαλύματος που ισούται με το 1/15 του αρχικού της βακτηριακής καλλιέργειας.

Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης, ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι ίση με 15% v/v.

Αφού το δείγμα αναμιχθεί καλά μοιράζεται σε eppendorf tubes, 200 μl σε κάθε tube, και καταψύχεται αμέσως με τη βοήθεια υγρού αζώτου.

Τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται και διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -80 °C

2.7.1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* με πλασμιδιακό DNA

Σε 200 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a προστίθενται 10-15 ng πλασμιδιακού DNA.

Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30 min.

Θερμικό σοκ του μίγματος με επώαση στους 42 °C για 2 min.

Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB στο δείγμα, ενώ αυτό βρίσκεται στους 42 °C και επώαση στη συνέχεια στους 37 °C για 1 h.

Φυγοκέντρηση δείγματος στις 13000 rpm για 1 min και απομάκρυνση των 2/3 του υπερκειμένου.

Επαναδιάλυση του ιζήματος και επίστρωση κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB που περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό ως μέσο επιλογής που διαφέρει κατά περίπτωση. Στην περίπτωση χρήσης πλασμιδιακού φορέα ο οποίος φέρει το γονίδιο της β -γαλακτοσιδάσης, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών. Αυτό γίνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα ως επαγωγέας

του υποκινητή του lacZ γονιδίου, σε τελικές συγκεντρώσεις 5×10^{-3} mM και 50 mM αντίστοιχα.

Επώαση τρυβλίων σε θάλαμο 37°C για 12-16 h.

2.7.1.3 Υπολογισμός απόδοσης μετασχηματισμού

Μετά την ανάπτυξη αποικιών, το τρυβλίο χωρίζεται σε τεταρτημόρια και σε ένα από αυτά μετρείται ο αριθμός των αποικιών.

Έστω n ο αριθμός των αποικιών στο ένα τεταρτημόριο, επομένως $4n$ οι αποικίες σε όλο το τρυβλίο.

Έστω ότι τα βακτήρια έχουν μετασχηματιστεί με 10ng DNA

Επομένως: Στα 10 ng έχουμε $4n$ αποικίες

Στα 100 ng έχουμε x αποικίες, $\chi = 400n$ αποικίες

Οι 400n αποικίες αντιστοιχούν στην ποσότητα που επιστρώθηκε.

Έστω ότι επιστρώθηκαν y μl από τα z μl που είχαμε αρχικά.

Επομένως: Στα y μl που επιστρώθηκαν έχουμε 400n αποικίες

Στα z μl που επιστρώθηκαν έχουμε χ αποικίες, $\chi = 400nz/y$ αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA

Ικανοποιητικό εύρος αποδοτικότητας:

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

2.7.2 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

Μονή αποικία βακτηριακού στελέγχους, το οποίο πρόκειται να αποθηκευτεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών) στους 37°C για περίπου 12 h στην περίπτωση του *E.coli* και στους 28°C για 24-48 h στην περίπτωση του *A. tumefaciens*.

700 μl της καλλιέργειας μεταφέρονται σε eppendorf tube.

300 μl γλυκερόλης 100% προστίθενται στο eppendorf tube.

Το μίγμα αναδεύεται έντονα και ψύχεται σε υγρό άζωτο.

Αποθήκευση στους -80°C . Τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά για τουλάχιστον 10 χρόνια.

2.8 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E. coli*

2.8.1 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Alkaline Mini Preparation)

Μονή βακτηριακή αποικία, που περιέχει το προς απομόνωση πλασμίδιο, αναπτύσσεται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB στους 37 °C για 12 h.

1.5 ml της καλλιέργειας μεταφέρεται σε eppendorf tube και φυγοκεντρείται για 1 min στις 13000 rpm.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (pellet) αφήνεται όσο το δυνατό πιο στεγνό.

Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200 µl διαλύματος P1 (προσεκτικά για να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων αέρα).

Προσθήκη 200 µl διαλύματος P2.

Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση έως ότου το δείγμα να γίνει διαυγές.

Επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 1-1.5 min (όχι πάνω από 3 min).

Προσθήκη 200 µl παγωμένου διαλύματος P3 (3M CH₃COOK/5M CH₃COOH).

Καλή ανάμιξη έως ότου να σχηματιστούν λευκά νεφελώματα.

Επώαση στον πάγο για 15 min.

Φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube με προσοχή.

Προσθήκη 2V παγωμένης EtOH 100% και ανάμιξη.

Επώαση για 15-30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου.

Ξέπλυμα του δείγματος με 500 µl παγωμένης EtOH 70% .

Προσθήκη 25-50 µl ddH₂O, αφού το ίζημα στεγνώσει καλά.

Αποθήκευση στους -20 °C.

LB Υγρό Θρεπτικό Μέσο ανάπτυξης βακτηρίων:

0,5% w/v yeast extract

1% w/v NaCl

1% w/v peptone

Στην περίπτωση στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 1,4% w/v agar

P1 Ρυθμιστικό Διάλυμα Επαναδιάλυσης:

50 mM Tris-HCl pH= 8,0

10 mM EDTA pH= 8,0

100 µg/ml RNaseA

P2 Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης:

0,2 N NaOH

1% w/v SDS

P3 (3M CH₃COOK/5M CH₃COOH):

60 ml 5M CH₃COOK pH= 4,8-5,2 αναμιγνύονται με 11,5 ml CH₃COOH και 28,5 ml ddH₂O

RNaseA:

Διάλυμα RNaseA 10 mg/ml σε 10 mM Tris-HCl pH= 7,4 , 15 mM NaCl. Το διάλυμα υφίσταται βρασμό για 15 min. Ο βρασμός διακόπτεται για 20 min και επαναλαμβάνεται. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

2.9 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vivo*

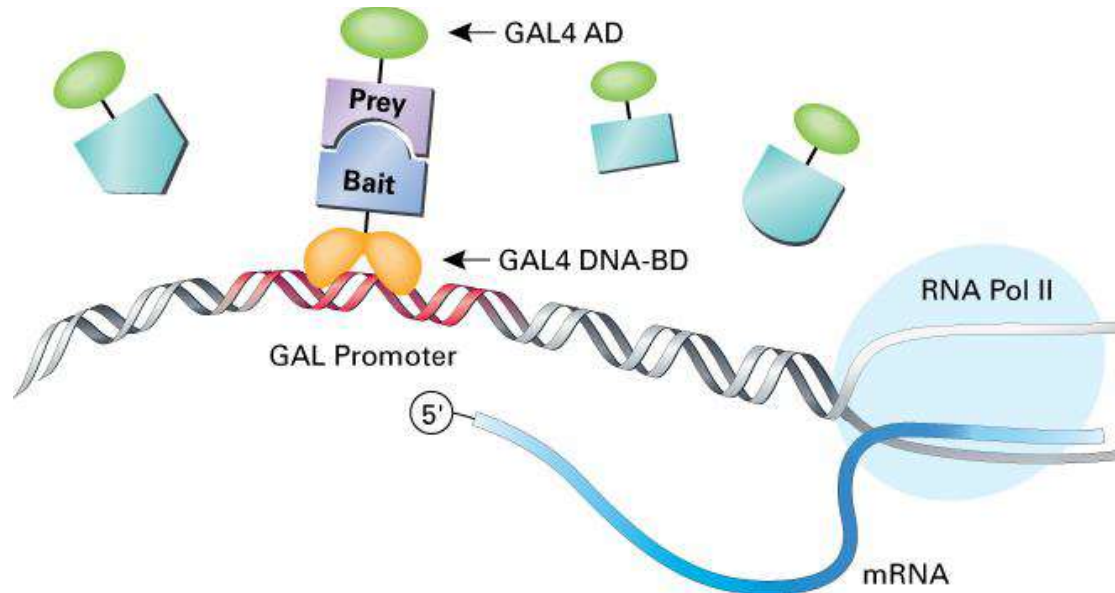
2.9.1 Σύστημα δύο υβριδίων (Yeast 2 hybrid)

Ένα ευρέως διαδεδομένο σύστημα ελέγχου αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vivo* είναι το σύστημα δύο υβριδίων (Yeast 2 hybrid) στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (κοιν. Σακχαρομύκητας).

Η έκφραση των πρωτεϊνών στον σακχαρομύκητα επιτρέπει τον σχηματισμό τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών, παρέχοντας ουδέτερο pH και άλλα χαρακτηριστικά σημαντικά για την διατήρηση της φυσικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Έτσι προωθείται η ανακάλυψη *de novo* πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον ο σακχαρομύκητας είναι αρκετά εύκολος στον χειρισμό και το γονιδίωμα της έχει αναλυθεί πλήρως.

Η βασική ιδέα του συστήματος των δύο υβριδίων βασίζεται στην ανίχνευση πιθανής αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών μέσω ανασύστασης ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος ενεργοποιεί ένα ή περισσότερα γονίδια αναφοράς (Fields and Song 1989). Το σύστημα βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι περιοχές μιας λειτουργικής πρωτεΐνης έχουν την ικανότητα να διαχωρίζονται και να ανασυνδυάζονται με αποτέλεσμα την ανασύστασή της. Συγκεκριμένα στο σύστημα αυτό ένας μεταγραφικός παράγοντας (ο GAL4) μπορεί να διαχωριστεί σε δύο επικράτειες: στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Binding Domain, DB) και στην περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activation Domain, AD). Σε ένα τέτοιο σύστημα η πρωτεΐνη X (αναφέρεται σαν «bait protein») για την οποία επιθυμείται να διερευνηθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις συγχωνεύεται σε μεταφραστική σύντηξη με την περιοχή BD του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης, GAL4. Αντίστοιχα, η Y πρωτεΐνη (αναφέρεται σαν «prey protein») κλωνοποιείται σε μεταφραστική σύντηξη με την AD του GAL4. Η πρώτη χιμαιρική πρωτεΐνη (bait-GAL4 BD), έχει την ικανότητα να προσδέεται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες ενεργοποίησης (UAS-Upstream Activating Sequence) αλλά δεν μπορεί να ενεργοποιήσει από μόνη της τη μεταγραφή, ενώ αντίστοιχα η δεύτερη (prey-GAL4 AD) μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή αλλά δεν μπορεί να προσδεθεί σε ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή.

Έτσι, μόνο όταν οι δύο συνεκφραζόμενες πρωτεΐνες (bait και prey) αλληλεπιδρούν, μπορούν να φέρουν κοντά τις δομικές περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (AD και BD) και να δημιουργήσουν την λειτουργική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ξεκινήσει τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς.



Εικόνα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση της αρχής του συστήματος δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα (Y2H). Οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται ξεχωριστά στη ζύμη: Η μία (bait protein) έχει κλωνοποιηθεί σε μεταφραστική σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 (Gal4 DNA-binding domain, BD) και η δεύτερη (prey protein) έχει συντηχθεί με την περιοχή ενεργοποίησής του (Gal4 transcriptional Activation Domain, AD). Εφόσον οι δύο πρωτεΐνες (bait, prey) αλληλεπιδρούν, οι δύο ρυθμιστικές περιοχές έρχονται κοντά, δημιουργώντας έτσι τον λειτουργικό μεταγραφικό παράγοντα Gal4 με τον οποίο καθίσταται δυνατή η ενεργοποίηση του γονιδίων αναφοράς (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System, Takara Bio).

2.9.1.1 Στελέχη και γονίδια αναφοράς

Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη SG335 και Y2HGold του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, των οποίων ο γενότυπος παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 2.9 Γενότυποι στελεχών σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν.

<u>Strain</u>	<u>Genotype</u>	<u>Reporters</u>	<u>Transformation Markers</u>
SG335 (Samakovli <i>et al.</i> , 2014)	<i>MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ⁽¹⁾, gal80Δ⁽¹⁾, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ</i>	<i>ADE2, HIS3, lacZ</i>	<i>trp1, leu2</i>
Y2HGold⁽²⁾ (Nguyen, unpublished)	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2:: GAL1UAS-Gal1TATA-His3, GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2 URA3 :: MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1</i>	<i>AbAr, HIS3, ADE2, MEL1</i>	<i>trp1, leu2</i>

⁽¹⁾Το στέλεχος Y2H Gold προέρχεται από το στέλεχος PJ69-2A (James *et al.* 1996).

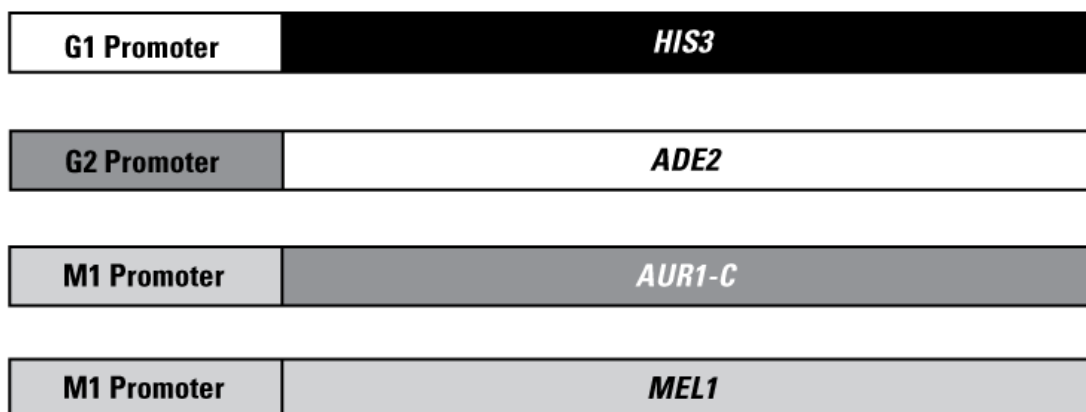
⁽²⁾Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες Gal4p και Gal80p επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων GAL1 GAL2 και GAL7, μέσω πρόσδεσης σε ρυθμιστικές περιοχές ενεργοποίησης UAS, ενεργοποιώντας έτσι τη μεταγραφή τους. Οι μεταλλαγές gal4Δ, και gal80Δ είναι διαγραφές που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας των αντίστοιχων ενδογενών γονιδίων.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.9, για τα δύο στελέχη χρησιμοποιούνται τα ίδια γονίδια αναφοράς για τον έλεγχο μετασχηματισμού (Transformation Markers). Τα στελέχη SG335 και Y2HGold αδυνατούν να συνθέσουν τρυπτοφάνη και λευκίνη, και άρα όταν ο (ταυτόχρονος) μετασχηματισμός είναι επιτυχής (δηλ. η ζύμη έχει μετασχηματιστεί και με τα δύο πλασμίδια), τα κύτταρα ζύμης μπορούν να αναπτυχθούν απουσία των δύο αμινοξέων (Trp, Leu).

Το στέλεχος SG335 διαθέτει 3 γονίδια αναφοράς για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης (Πίνακας 2.9). Άρα η μελέτη αλληλεπίδρασης μπορεί να γίνει με 3 τρόπους. Πρώτον σε θρεπτικό μέσο που λείπει ιστιδίνη (-His3), SD/-Trp/-Leu/-His (ή SD-3). Όταν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, η έκφραση της HIS3 (μέσω του GAL4) επιτρέπει στο κύτταρο να βιοσυνθέσει ιστιδίνη και να αναπτύσσεται σε μέσο που λείπει το συγκεκριμένο αμινοξύ. Δεύτερον κατά αντίστοιχο τρόπο σε θρεπτικό μέσο που λείπει αδενίνη, SD/-Trp/-Leu/-Ade, το στέλεχος αναπτύσσεται μόνο όταν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν. Επιπλέον σε αυτή την περίπτωση λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την ADE2 το στέλεχος αλλάζει χρώμα όταν αναπτύσσεται σε μέσο που λείπει αδενίνη. Σε περίπτωση όμως αλληλεπίδρασης, ο φαινότυπος επαναφέρεται. Τρίτον στο στέλεχος αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση αλληλεπίδρασης μέσω του μεταβολισμού του X-gal που αποτελεί υπόστρωμα για τη

β-γαλακτοσιδάση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς *LACZ* το οποίο μεταβολίζει το X-gal που περιέχεται στο φίλτρο ανίχνευσης. Το προϊόν μεταβολισμού του X-gal είναι η παραγωγή μπλε χρώματος, χρωματισμός που αποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη αποικία μετασχηματισμένης ζύμης. Βέβαια σχεδόν ποτέ δεν χρησιμοποιούνται μεμονωμένα οι παραπάνω τρόποι, διότι δίνουν αρκετές φορές ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Κατά αντίστοιχο τρόπο για το στέλεχος Y2HGold, ο έλεγχος αλληλεπίδρασης γίνεται σε θρεπτικό μέσο που λείπει η ιστιδίνη ή/ και αδενίνη. Επιπλέον μπορεί να γίνει με προσθήκη αντιβιοτικού Aureobasidin A (AbA), το οποίο αποτελεί εξαιρετικά τοξικό φάρμακο για τον σακχαρομύκητα. Σε περίπτωση αλληλεπίδρασης προκύπτει έκφραση του γονιδίου *AUR1-C* η οποία προσδίδει στη ζύμη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό (AbA). Το γονίδιο *MEL1* κωδικοποιεί για την α-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που απαντάται στη φύση σε πολλά στελέχη ζύμης. Με την αλληλεπίδραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών η α-γαλακτοσιδάση εκφράζεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα ζύμης. Παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-αpha-Gal, οι αποικίες που εκφράζουν το γονίδιο *MEL1* χρωματίζονται (μπλε) κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης (Πίνακας 2.9, Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Στο στέλεχος Y2Hgold τα γονίδια αναφοράς *HIS3*, *ADE2* και *MEL1/AUR1-C* βρίσκονται υπό τον έλεγχο τριών διαφορετικών υποκινητών, των G1, G2 και M1. Διαθέτουν όμως, μία κοινή συντηρημένη ακολουθία (17-mer) η οποία αναγνωρίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 (Giniger *et al.*, 1985; Giniger and Ptashne, 1988).

2.9.2 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *S. cerevisiae*

Ο έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Takara Bio, Yeastmaker Yeast Transformation System 2 (PT1172-1) και Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (PT4084-1):

- Στρώσιμο κυττάρων ζύμης στελέχους SG335 ή Y2HGold σε στερεό θρεπτικό μέσο YPDA και ανάπτυξη στους 30 °C για περίπου 3 ημέρες.

- Μονή αποικία (διαμέτρου 2-3 mm) κατάλληλου στελέχους ζύμης αναπτύσσεται σε 3ml υγρού θρεπτικού μέσου YPDA για 8-12 h στους 30 °C.
- Μεταφορά 5 μl της προηγούμενης καλλιέργειας σε φλάσκα που περιέχει 50 ml YPDA.
- Επώαση στους 30 °C για 16-20 h στις 250 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα να φθάσει $O.D._{600} = 0.15-0.3$.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 700 g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 100 ml φρέσκου YPDA.
- Επώαση στους 30 °C για 3-5 h στις 250 rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα να φθάσει $O.D._{600} = 0.4-0.6$.
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης (700 g, 5 min, RT). Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 60 ml ddH₂O.
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης (700 g, 5 min, RT). Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναιωρείται σε 3 ml 1.1XTE/LiAc.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 sec. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1200 μl 1.1X TE/LiAc.
- Τα δεκτικά πλέον κύτταρα ζύμης τοποθετούνται στον πάγο και χρησιμοποιούνται κατευθείαν για τη μεγαλύτερη δυνατή απόδοση μετασχηματισμού. Παρ' όλα αυτά μπορούν να αποθηκευτούν για λίγες ακόμη ώρες σε πάγο χωρίς σημαντική απώλεια στην απόδοσή τους.

2.9.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων ζύμης *S. cerevisiae* με τη μέθοδο PEG-LiAc

- Για κάθε μετασχηματισμό χρησιμοποιούνται erpendorf tubes τα οποία έχουν τοποθετηθεί στον πάγο. Σε καθ' ένα tube προστίθενται 100 ng πλασμιδιακού DNA, 50 μl δεκτικών κυττάρων και 50 μg Carrier DNA⁽¹⁾.
- Ακολουθεί ανάμειξη και προσθήκη 500 μl φρέσκου διαλύματος PEG/LiAc.
- Ανάμειξη και επώαση στους 30 °C για 30 min με αναστροφή των tubes κάθε 10 min.
- Προσθήκη DMSO 20μl και μίξη με αναστροφή.
- Ακολουθεί θερμική καταπόνηση για 15 min σε υδατόλουτρο στους 42 °C με αναστροφή των tubes κάθε 5 min.
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 13,300 rpm για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση του υγρού υπερκειμένου.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml YPDA.
- Ακολουθεί ανάκαμψη με επώαση στους 30 °C για 90 min στις 250 rpm.
- Επαναλαμβάνεται ο ίδιος τρόπος κατακρήμνισης (13,300 rpm, 15 sec, RT).
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml 0.9% (w/v) NaCl.
- Στρώσιμο των κυττάρων (100μl) σε κατάλληλα SD τρυβλία⁽²⁾ για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 3-5 ημέρες.

- Επιλογή των μεγαλύτερων αποικιών (2 mm) και μεταφορά των σε θρεπτικό με την ίδια επιλογή. Τα τρυβλία (master plates) σφραγίζονται με parafilm και διατηρούνται στους 4 °C για 1μήνα.

⁽¹⁾Carrier DNA: DNA από Salmon Sperm (2mg/ml). Πριν τη χρήση αποδιατάσσεται με βρασμό του DNA για 15 min και στη συνέχεια τοποθετείται γρήγορα στον πάγο για 1-2 min.

⁽²⁾Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός και με τα δύο είδη πλασμιδίων (cotransformation). Για αυτό το λόγο τα κύτταρα στρώθηκαν σε θρεπτικό SD/-Trp/-Leu.

2.9.3.1 Υπολογισμός απόδοσης μετασχηματισμού (cotransformation efficiency)

$$\frac{\text{cfu} \times \text{όγκος επαναιώρησης κυττάρων (ml)} \times \text{παράγοντα αραίωσης}}{\text{όγκος που στρώθηκε (ml)} \times \text{ποσότητα DNA (}\mu\text{g)}} = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

Έστω ότι:

300 αποικίες μεγάλωσαν στην αραίωση 1:10 (παράγοντας αραίωσης= 0.1),

είχαν στρωθεί 100 μl (0,1 ml) κυττάρων στο θρεπτικό από τον συνολικό όγκο του 1 ml (= όγκος επαναιώρησης) και

η ποσότητα πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε= 0.1μg.

$$\frac{300 \text{ cfu} \times 1 \text{ ml} \times 10^3 \mu\text{l/ml}}{0,1 \text{ ml} \times 0.1 \times 0.1 \mu\text{g}} = 3 \times 10^5 \text{ cfu}/\mu\text{g DNA}$$

2.9.3.2 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων ζύμης

Θρεπτικό μέσο YPDA :

1% (w/v) yeast extract

2% (w/v) D-glucose

2% (w/v) peptone

120 mg/L Adenine

2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

Θρεπτικό μέσο SD-2 (SD/-Leu/-Trp) :

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids⁽¹⁾

2% (w/v) D-glucose

0,14% (w/v) Yeast Synthetic Drop-out Media⁽²⁾

75mg/L Histidine

120 mg/L Adenine
Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N
2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

Θρεπτικό μέσο SD-3 (SD-Leu/-Trp/-His):

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids
2% (w/v) D-glucose
0,14% (w/v) Yeast Synthetic Drop-out Media
120 mg/L Adenine
Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N
2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

Θρεπτικό μέσο SD-4 (SD-Leu/-Trp/-His/-Ade):

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids
2% (w/v) D-glucose
0,14% (w/v) Yeast Synthetic Drop-out Media
Ρύθμιση pH στο 5,8 με KOH 1N
2% (w/v) agar (για στερεό θρεπτικό μέσο)

Για θρεπτικά με 3-AT γίνεται προσθήκη της επιθυμητής ποσότητας από 1 M 3-AT (stock). Η τελική συγκέντρωση 3-AT εξαρτάται από το στέλεχος ζύμης που χρησιμοποιείται κ.ά.. Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κυμαίνεται από 2-3 mM.

⁽¹⁾ Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids : Catalog Number Y0626 (Sigma Aldrich)

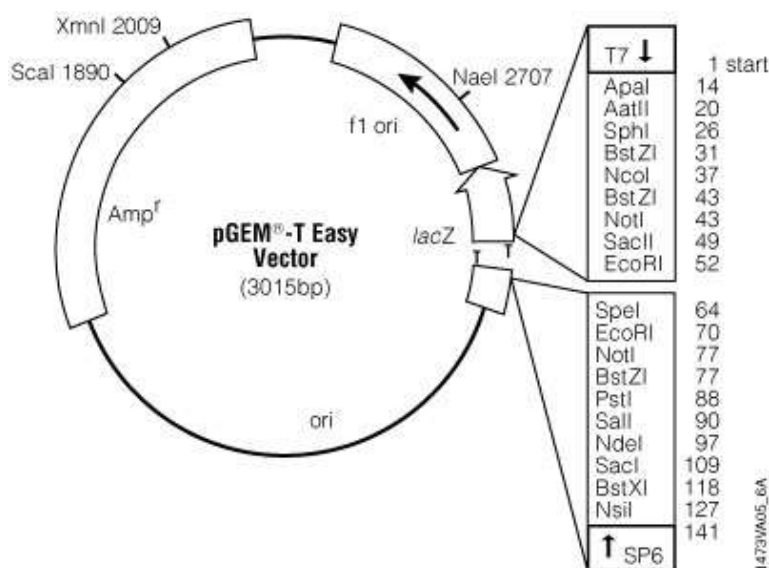
⁽²⁾ Yeast Synthetic Drop-out Media : Catalog Number Y2021: without histidine, leucine, tryptophan and adenine (Sigma Aldrich)

2.10 Πλασμιδιακοί φορείς

2.10.1 pGEM-T Easy

Ο φορέας pGEM-T Easy είναι ένας μικρός-3015bp, εύχρηστος, high copy φορέας που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Διαθέτει 3' προεξέχοντα άκρα θυμίνης-T στην θέση κλωνοποίησης του φορέα βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της ενοποίησης των άκρων (ligation) με προϊόντα αντίδρασης PCR, καθώς παρεμποδίζεται η πιθανή επανένωση του φορέα και παρέχονται συμβατά άκρα για ενοποίηση με προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί με συγκεκριμένες θερμοανθεκτικές πολυμεράσες. Η ύπαρξη της περιοχής ori επιτρέπει την ανεξάρτητη αντιγραφή του μέσα στα μετασχηματισμένα κύτταρα. Διαθέτει επιπλέον γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^r), παρέχοντας έτσι

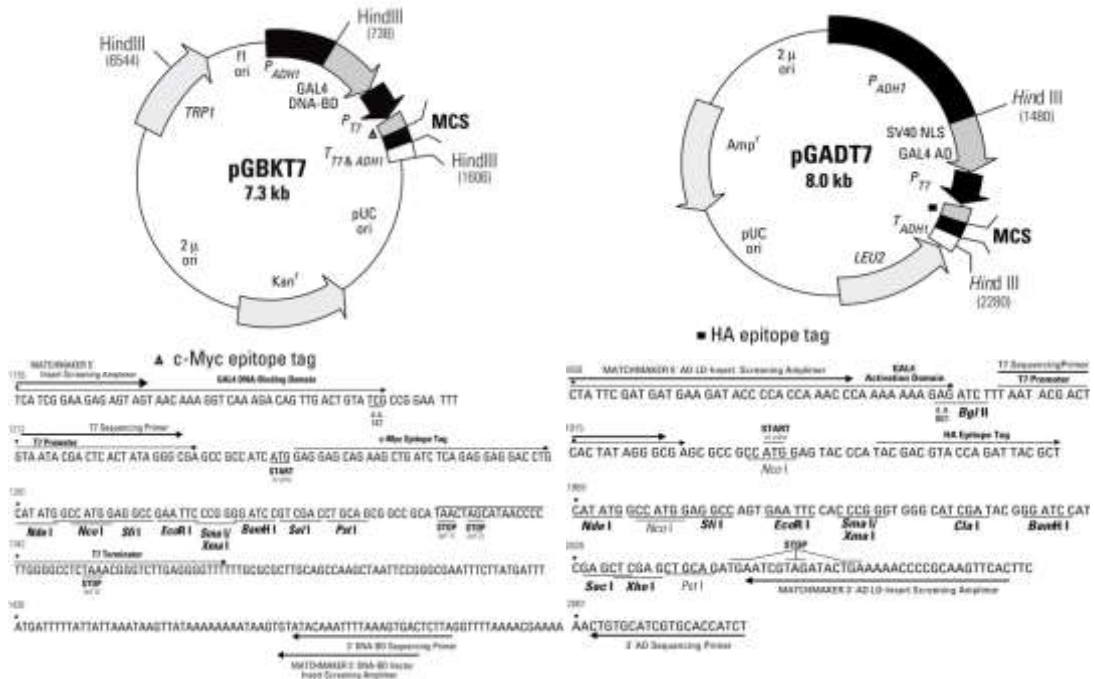
δυνατότητα επιλογής. Ακόμη διαθέτει γονίδιο που κωδικοποιεί για την β-γαλακτοσιδάση(lacZ), ένζυμο το οποίο παρουσία του υποστρώματος X-Gal δίνει μπλε χρώμα. Με εισαγωγή ενθέτου στην θέση κλωνοποίησης, διακόπτεται η αλληλουχία του γονιδίου lacZ με αποτέλεσμα να μην μπορεί να παραχθεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, επιτρέποντας έτσι την αναγνώριση ανασυνδυασμένων κυττάρων (εμφάνιση άσπρων αποικιών) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Χάρτης pGEM-T Easy Vector.

2.10.2 pGADT7 και pGBKT7

Οι πλασμιδιακοί φορείς pGBKT7 και pGADT7 είναι τεχνητοί φορείς που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της τεχνολογίας του συστήματος δύο υβριδίων και έχουν μέγεθος 7,3 και 8 kb αντίστοιχα. Οι φορείς περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Binding Domain) και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Activation Domain) αντίστοιχα, του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Διαθέτουν μια περιοχή αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού, MCS (Multiple Cloning Site), για τη διευκόλυνση κλωνοποίησης τμημάτων DNA και έχουν την ικανότητα να αντιγράφονται αυτόνομα σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και κύτταρα ζύμης *S. cerevisiae* μέσω των περιοχών pUC και 2 μ ori, αντίστοιχα. Καθ' ένας από τους φορείς παρέχει τη δυνατότητα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται συντηγμένες στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA ή στην περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Οι χημικτικές αυτές πρωτεΐνες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη ζύμη μέσω του καθολικού προαγωγέα P_{ADHI}. Επιπλέον η χημικτική πρωτεΐνη που έχει προκύψει από την σύντηξη της υπό μελέτη πρωτεΐνης με τη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής AD έχει την ικανότητα να στοχεύει στον πυρήνα καθώς διαθέτει ακολουθίες τοποθέτησης στον πυρήνα (SV40 NLS).

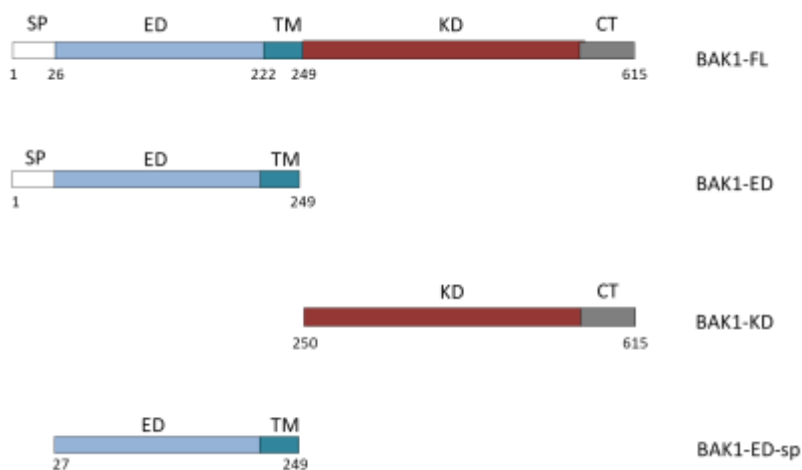


Εικόνα 2.4 Χάρτες πλασμιδιακών φορέων πρωτεϊνικής έκφρασης pGBKT7 και pGADT7 που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης στο σύστημα δύο υβριδίων. Ο pGBKT7 εκφράζει πρωτεΐνες που είναι συντηγμένες με τα αμινοξέα 1-147 του GAL4 μεταγραφικού παράγοντα (DNA binding domain) ενώ αντίστοιχα ο pGADT7 εκφράζει πρωτεΐνες που είναι συντηγμένες με τα αμινοξέα 768-881 του GAL4 μεταγραφικού παράγοντα (activation domain) MCS: Multiple-Cloning Site.

3. Αποτελέσματα

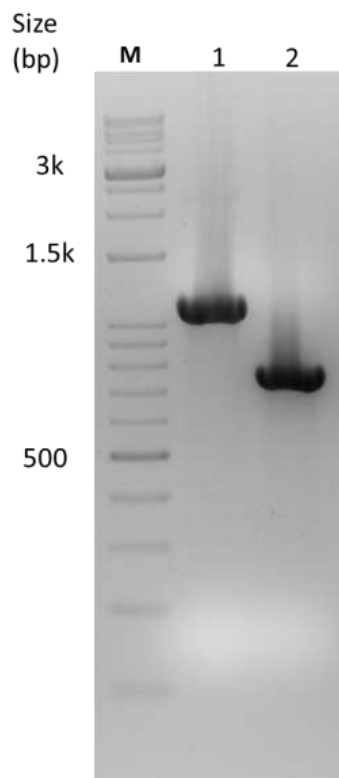
3.1 Δημιουργία κατασκευών

Το γονίδιο *BAK1* (AT4G33430.2) κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 68.17 kDa, και αποτελείται από 615 αμινοξέα (aa). Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των περιοχών του γονιδίου *BAK1*. Σε πρώτο χρόνο πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της εξωκυτταρικής περιοχής της πρωτεΐνης *BAK1*, και της κυτταροπλασματικής περιοχής με δράση κινάσης. Στην παρούσα μελέτη, η περιοχή *BAK1-ED* (Extracellular Domain) αναφέρεται στην περιοχή της πρωτεΐνης *BAK1* που αποτελείται από την εξωκυττάρια, τη διαμεμβρανική (Transmembrane Domain) περιοχή καθώς και το πεπτίδιο συνθήματος (Signal Peptide) της πρωτεΐνης *BAK1* και διαθέτει 249 aa (Εικόνα 3.1). Η περιοχή *BAK1-KD* (Kinase Domain) αναφέρεται στην περιοχή της πρωτεΐνης *BAK1* που αποτελείται από την κυτταροπλασματική περιοχή και το καρβόξυ-τελικό άκρο (C Terminus) και διαθέτει 365 aa (από 250 έως 615aa) (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών της πρωτεΐνης *BAK1* που ενισχύθηκαν. FL: Full Length, SP: Signal Peptide, ED: Extracellular Domain, TM: Transmembrane Domain, KD: Kinase Domain and CT: C Terminus.

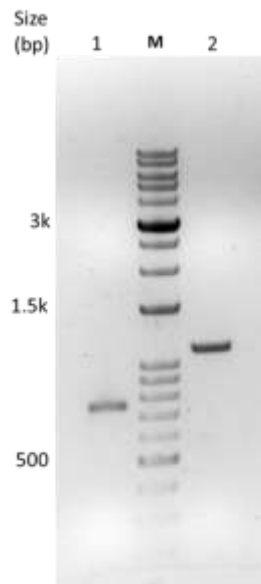
Για την ενίσχυση των περιοχών *BAK1-ED* και *BAK1-KD* του γονιδίου *BAK1* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR (§2.2) με μήτρα πλασμιδιακό DNA το οποίο υπήρχε διαθέσιμο στο εργαστήριο. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με χρήση εκκινητών κατάλληλα σχεδιασμένων ούτως ώστε να ενισχύουν την κωδική αλληλουχία (cds) του γονιδίου *BAK1*. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των περιοχών *BAK1-ED* και *BAK1-KD* (§2.2, Πίνακας 2.3) τους προσδίδουν άκρα με θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα *Bam*HI/*Sal*I και *Bam*HI/*Xho*I αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η μετέπειτα κλωνοποίηση του γονιδίου στο MCS (Multiple Cloning Site) του φορέα pGBKT7. Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της αντίδρασης PCR για το *BAK1-ED* ήταν στις 747 bp και για το *BAK1-KD* στις 1098 bp (Εικόνα 3.2).



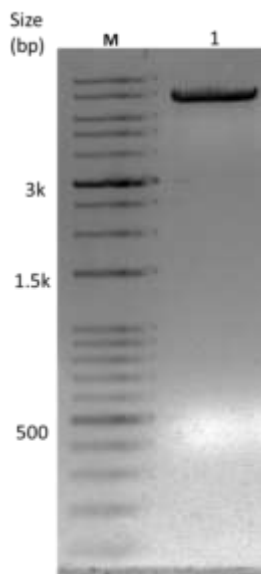
Εικόνα 3.2 Προϊόν της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση των περιοχών του γονιδίου *BAK1*. **1:** *BAK1-KD*, 1098 bp **2:** *BAK1-ED*, 747bp. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb Opti-DNA ladder. Ανάλυση σε πηκτική αγαρόζης 1%.

Μετά την ανάλυση των προϊόντων των PCR αντιδράσεων σε πηκτική αγαρόζης ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων από το ένζυμο της αντίδρασης (§2.4). Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικοποίηση του DNA και κλωνοποίηση των κλασμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7. Για τον σκοπό αυτό ο φορέας αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής (καναμυκίνη) και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Για την κλωνοποίηση στον φορέα pGBKT7 ήταν απαραίτητο να δημιουργηθούν συμβατά άκρα ούτως ώστε να μπορεί να γίνει στη συνέχεια η αντίδραση της ενοποίησης (ligation) του φορέα με τα αντίστοιχα ένθετα. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν διπλές πέψεις στα κλάσματα DNA *BAK1-FL*, *BAK1-ED*, *BAK1-KD* καθώς και στον φορέα pGBKT7. Ο συνδυασμός ενζύμων που χρησιμοποιήθηκε ήταν BamHI/XhoI, για τα *BAK1-FL*, *BAK1-KD* και BamHI/SalI για τα *BAK1-ED* και pGBKT7 (§2.5). Παρότι για δύο από τα κλάσματα (*BAK1*, *BAK1-KD*) δεν χρησιμοποιήθηκαν ταυτόσημα ένζυμα (BamHI/XhoI) με αυτά του φορέα (BamHI/SalI), η αντίδραση της ενοποίησης είναι εφικτή καθώς μετά την πέψη των δύο κομματιών δημιουργούνται συμπληρωματικά άκρα (compatible cohesive ends). Βέβαια, μετά την ενοποίηση το «καινούργιο» πλέον εξανουκλεοτίδιο που δημιουργείται δεν αναγνωρίζεται από κανένα από τα δύο ένζυμα.

Μετά από τις διπλές πέψεις οι επιθυμητές ζώνες απομονώθηκαν και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1% με σκοπό την ποσοτικοποίηση τους (Εικόνα 3.3, 3.4).

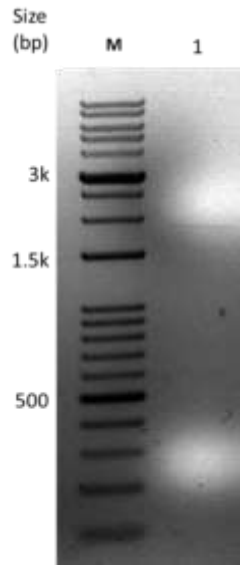


Εικόνα 3.3 Διπλές πέψεις ενθέτων για τη δημιουργία συμβατών άκρων. **1:** BAK1-ED, BamHI/SalI **2:** BAK1-KD, BamHI/XhoI. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb Opti-DNA ladder. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1%.



Εικόνα 3.4 Διπλή πέψη του πλασμιδιακού φορέα rGBKT7 για τη δημιουργία συμβατών άκρων. **1:** rGBKT7, BamHI/SalI. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb Opti-DNA ladder. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Ταυτόχρονα το γονίδιο *BAK1* απομονώθηκε από πλασμίδιο με πέψεις BamHI/XhoI και αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% με σκοπό την ποσοτικοποίησή του (Εικόνα 3.5).

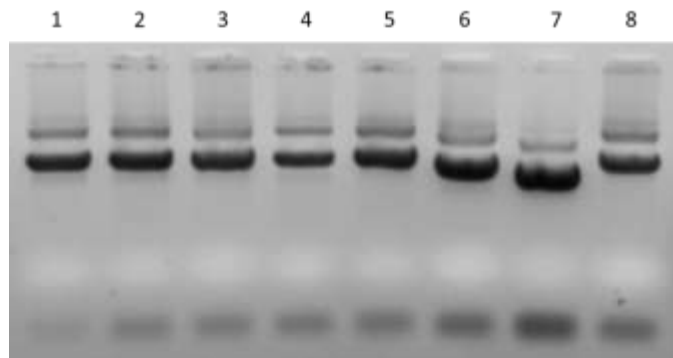


Εικόνα 3.5 Διπλή πέψη *BAK1* για τη δημιουργία συμβατών άκρων. **1:** *BAK1-FL*, BamHI/XhoI. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb DNA ladder, Nippon genetics. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Ακολούθησε αντίδραση ενοποίησης των άκρων (ligation) (§2.6) του φορέα pGBKT7 με τα αντίστοιχα ένθετα που διέθεταν συμβατά άκρα. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και μία αντίδραση ενοποίησης ελέγχου (self-ligation) του φορέα pGBKT7 στην οποία δεν προστέθηκε ένθετο.

Τα διαλύματα της αντίδρασης ενοποίησης για τις κατασκευές pGBKT7::*BAK1*, pGBKT7::*BAK1-ED* και pGBKT7::*BAK1-KD*, χρησιμοποιήθηκαν εν συνεχεία για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (στέλεχος DH5a) (§2.7.1.2), τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (καναμυκίνη) και αναπτύχθηκαν αποικίες.

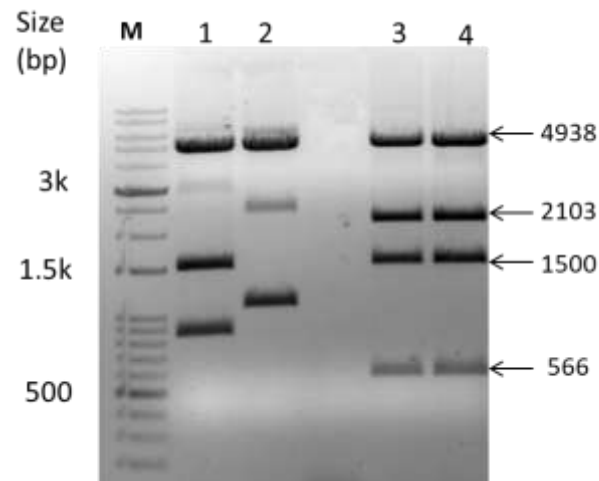
Για την επιβεβαίωση παρουσίας των ενθέτων, ελέγχθηκαν 4 αποικίες από κάθε κατασκευή και ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA το οποίο αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 0.8% με σκοπό την εξακρίβωση της ποιότητας και ποσότητας της απομόνωσης (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6 Ανάλυση απομονωμένου πλασμιδιακού DNA. **1-4:** pGBKT7::*BAK1-ED*, **5-8:** pGBKT7::*BAK1-KD*. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 0.8%.

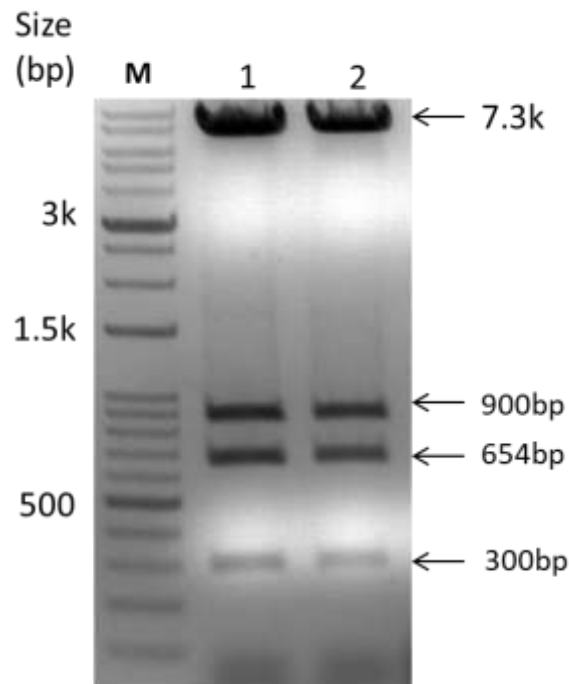
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις επιβεβαίωσης για την κάθε κατασκευή. Για την επιβεβαίωση παρουσίας του γονιδίου *BAK1* στον φορέα pGBKT7 πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με χρήση των ενζύμων HindIII/SpeI. Το

ένζυμο HindIII κόβει στις θέσεις 738 bp, 1606 bp, 6544 bp του φορέα pGBKT7. Το ένζυμο SpeI κόβει στη θέση 1560 bp του ένθετου *BAK1-FL*. Τα αναμενόμενα μεγέθη των πέψεων είναι στις 1494, 4938 bp (φορέας), 2103 και 566 bp (Εικόνα 3.7).



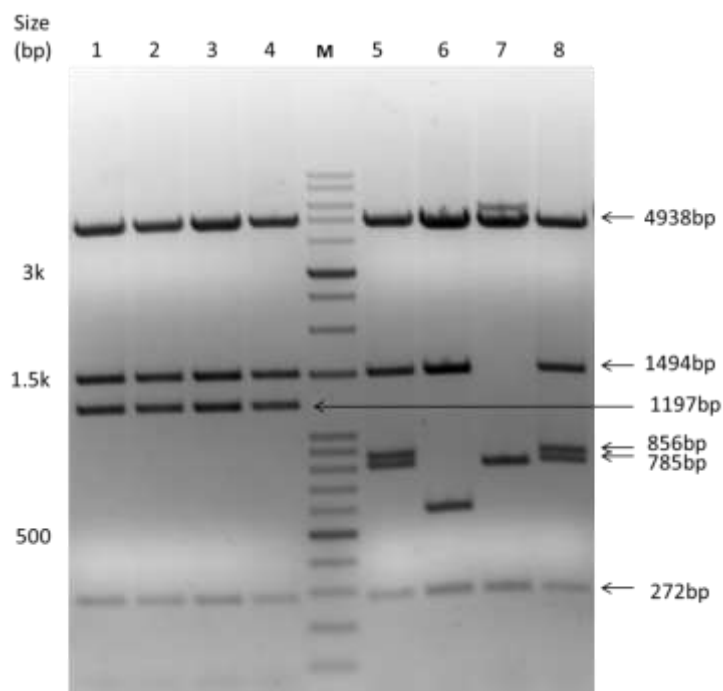
Εικόνα 3.7 Διπλές πέψεις για ταυτοποίηση ύπαρξης ενθέτου. **1-4:** Πέψη pGBKT7::*BAK1-FL* με HindIII/SpeI. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb DNA ladder, Nippon genetics. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Από τις 4 αποικίες που ελέγχθηκαν φαίνεται οι δύο (3,4) να περιέχουν το ένθετο που μας ενδιαφέρει. Σε αυτές τις δύο πραγματοποιήθηκε ακόμη μία πέψη επιβεβαίωσης με τα ένζυμα BamHI/PstI (Εικόνα 3.8). Το ένζυμο PstI κόβει στις θέσεις 654, 699, 989 bp του γονιδίου *BAK1* και στη θέση 1335 bp του φορέα.



Εικόνα 3.8 Διπλές πέψεις για ταυτοποίηση ύπαρξης ενθέτου. **1-2:** Πέψη pGBKT7::*BAK1-FL* με BamHI/PstI. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb DNA ladder, Nippon genetics. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Για την επιβεβαίωση παρουσίας του *BAK1-ED* και αντίστοιχα του *BAK1-KD* στον φορέα pGBKT7 πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τα ένζυμα HindIII/PstI. Για την κατασκευή pGBKT7::*BAK1LRR* τα αναμενόμενα μεγέθη των πέψεων ανέρχονταν στις 1494, 4938, 272 bp (φορέας) και στις 1197 bp (εικόνα 3.12). Αντίστοιχα για την κατασκευή pGBKT7::*BAK1KD* τα αναμενόμενα μεγέθη των πέψεων ανέρχονταν στις 1494 4938 και 272 bp (φορέας) και στις 785, 856 bp (διπλή ζώνη) (Εικόνα 3.9).

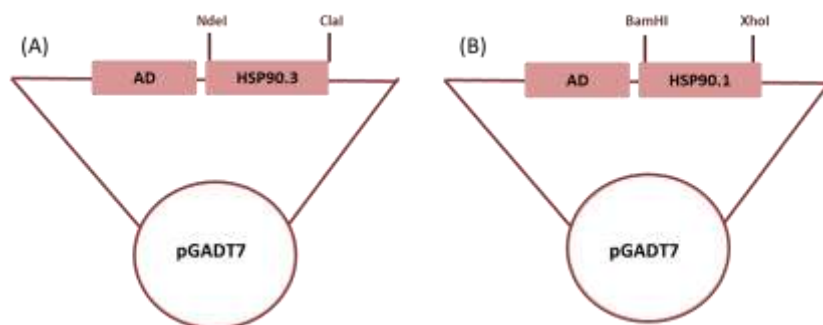


Εικόνα 3.9 Διπλές πέψεις για ταυτοποίηση ύπαρξης ενθέτου. **1-4:** pGBKT7::*BAK1-ED* HindIII/PstI **5-8:** pGBKT7::*BAK1-KD* HindIII/PstI. **M:** Δείκτης μοριακών βαρών, 1 kb DNA ladder, Nippon genetics. Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

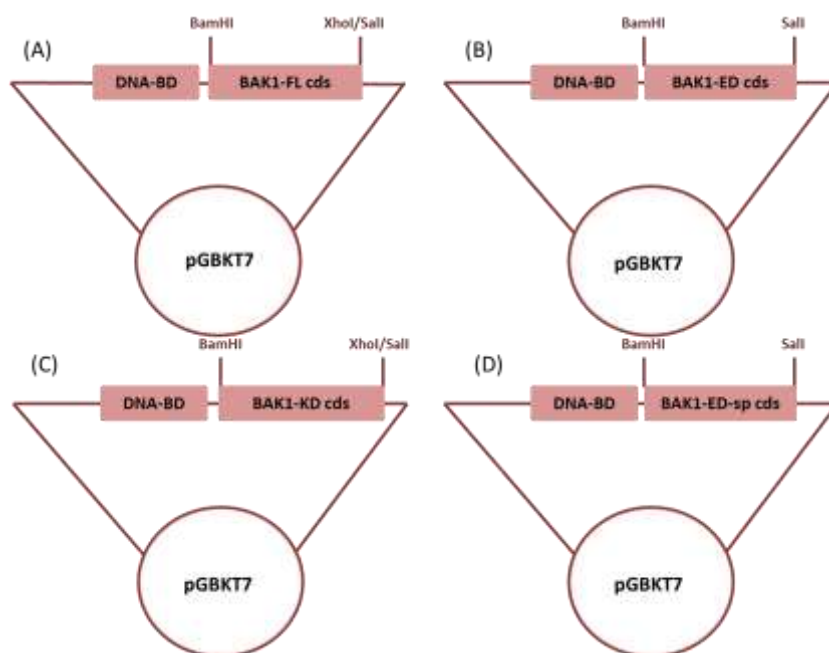
3.2 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vivo*

Προηγούμενες αδημοσίευτες μελέτες του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ, φανερώνουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης ολόκληρης της πρωτεΐνης BAK1 με τις κυτταροπλασματικές HSP90, με τη μέθοδο BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) ή SPLIT-GFP. Για τον λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε αρχικά η προσπάθεια επιβεβαίωσης της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης αλλά και η εύρεση της περιοχής εκείνης που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα. Σε αυτό το σύστημα, όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιούνται δύο πλασμιδιακοί φορείς, εκ των οποίων ο ένας φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και ο άλλος την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς. Ένα τέτοιο ζεύγος πλασμιδιακών φορέων αποτελούν οι πλασμιδιακοί φορείς της Takara Bio, ο pGBKT7 που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, και ο pGADT7 που φέρει τη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Στο εργαστήριο υπήρχαν οι

κατασκευές που περιείχαν κλωνοποιημένες τις κωδικές περιοχές των γονιδίων *HSP90.1* και *HSP90.3* (Εικόνα 3.10). Για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων η κωδική περιοχή του γονιδίου *BAK1* καθώς και επιμέρους περιοχές του κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7 (Εικόνα 3.11). Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε σε μεταφραστική σύντηξη με τη ρυθμιστική περιοχή του εκάστοτε φορέα.

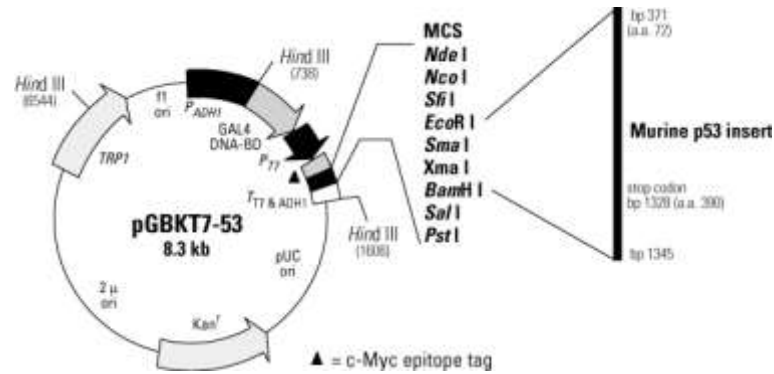


Εικόνα 3.10 Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών **A)** pGADT7::*HSP90.3*, **B)** pGADT7::*HSP90.1* που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο Yeast 2 hybrid.

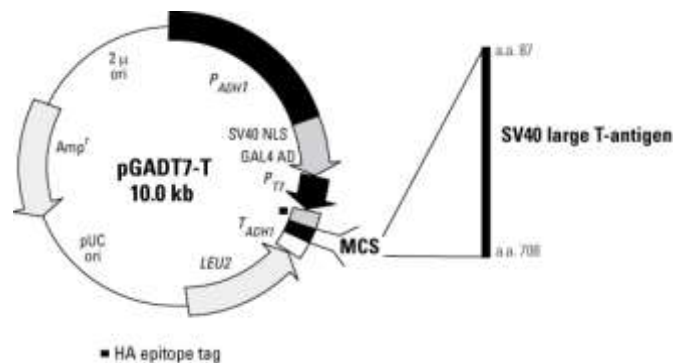


Εικόνα 3.11 Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών **A)** pGBKT7::*BAK1*, **B)** pGBKT7::*BAK1-ED*, **C)** pGBKT7::*BAK1-KD* και **D)** pGBKT7::*BAK1-ED-sp* που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο Yeast 2 hybrid. Στις περιπτώσεις **A**, **C** η αναγραφή δύο ενζύμων στο 3' άκρο υποδηλώνει ότι το πρώτο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε για πέψη του ενθέτου και το δεύτερο για πέψη του φορέα. Μετά το πέρας αυτών δημιουργούνται συμπληρωματικά άκρα που επιτρέπουν την ενοποίηση αλλά και την αδυναμία πέψης της θέσης που δημιουργείται.

Για τον θετικό έλεγχο του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές pGBKT7::*53* pGADT7::*T*. Οι πρωτείνες 53 και T αλληλεπιδρούν ισχυρά στη ζύμη. Οι χάρτες των κατασκευών παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.12 και 3.13.



Εικόνα 3.12 Χάρτης της κατασκευής pGBKT7::53 για τον θετικό έλεγχο της μεθόδου. Η κατασκευή κωδικοποιεί για μία χειμερινή πρωτεΐνη που αποτελείται από την p53 murine πρωτεΐνη (a.a. 72–390) και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (a.a. 1–147). Το cDNA της p53 (GenBank Accession No. K01700) κλωνοποιήθηκε στον pGBKT7 στις θέσεις EcoRI, BamHI. Το παρόν p53 προήλθε από πλασμίδιο που περιγράφεται από τους in Iwabuchi *et al.*, 1993 και τροποποιήθηκε από την Takara Bio.



Εικόνα 2.13 Χάρτης της κατασκευής pGADT7::T για τον θετικό έλεγχο της μεθόδου. Η κατασκευή κωδικοποιεί για μία χειμερινή πρωτεΐνη που αποτελείται από την SV40 large T antigen (a.a. 87–708) και την περιοχή ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (a.a. 768–881). Το cDNA της SV40 large T antigen (GenBank Locus SV4CG), που προήλθε από αναφερόμενο πλασμίδιο των Li and Fields, 1993 κλωνοποιήθηκε και τροποποιήθηκε από την Takara Bio. Δεν είναι γνωστό το πώς έχει κλωνοποιηθεί και αν οι θέσεις αναγνώρισης από ένζυμα είναι μοναδικές.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός (co-transformation) με τις δύο κάθε φορά κατασκευές και όχι διαδοχικός παρότι η απόδοση μετασχηματισμού είναι μικρότερη. Οι συνδυασμοί πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό ήταν οι εξής:

- pGADT7::HSP90.1 // pGBKT7::BAK-FL
- pGADT7::HSP90.3 // pGBKT7::BAK-FL
- pGADT7::HSP90.1 // pGBKT7::BAK1-ED
- pGADT7::HSP90.3 // pGBKT7::BAK1-ED
- pGADT7::HSP90.1 // pGBKT7::BAK1-KD
- pGADT7::HSP90.3 // pGBKT7::BAK1-KD
- pGADT7::T // pGBKT7::53
- pGADT7 // pGBKT7::BAK1
- pGADT7 // pGBKT7::BAK1-ED

- j) pGADT7 // pGBKT7::*BAK1-KD*
- k) pGADT7::*HSP90.1* // pGBKT7
- l) pGADT7::*HSP90.3* // pGBKT7

3.2.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης στο στέλεχος SG335

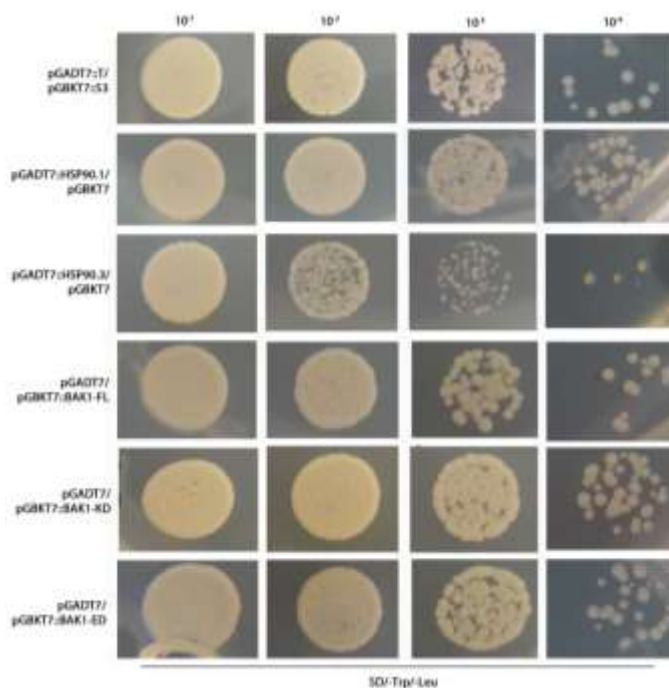
Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον μετασχηματισμό (§2.9.3) ήταν τα κύτταρα SG335. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε θρεπτικό μέσο (SD) από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και λευκίνη (SD-2 ή SD-Trp/-Leu). Η ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό SD-Trp/-Leu υποδηλώνει ότι ο μετασχηματισμός ήταν επιτυχής, καθώς η αναπτυσσόμενη ζύμη έχει μετασχηματιστεί και με τα δύο πλασμίδια. Από κάθε ένα μετασχηματισμό (έπειτα από περίπου 4 ημέρες ανάπτυξης στους 30 °C) επιλέχθηκαν οι μεγάλες (2 mm) αποικίες οι οποίες επιστρώθηκαν και πάλι σε θρεπτικό μέσο SD-2 και αναπτύχθηκαν στους 30 °C για 2 περίπου ημέρες. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν ορισμένες αποικίες για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης. Οι αποικίες που επιλέχθηκαν στρώθηκαν σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, λευκίνη και ιστιδίνη (SD-3 ή SD-Trp/-Leu/-His). Η επιλογή του τρίτου αμινοξέος εξαρτάται από τον γενότυπο της ζύμης που χρησιμοποιείται (§2.9.1.1). Στο συγκεκριμένο στέλεχος ένα από τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την παραγωγή ιστιδίνης (*HIS3*). Συνεπώς το συγκεκριμένο γονίδιο ενεργοποιείται μόνο όταν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και άρα η ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό SD-3 υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης. Βέβαια στα συστήματα που χρησιμοποιείται μόνο ένα αυξοτροφικό γονίδιο αναφοράς (π.χ. *HIS3*) για διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων συχνά παρατηρείται αυξημένος αριθμός εσφαλμένων θετικών αποικιών. Αυτές προκύπτουν είτε από την έκφραση του αυξοτροφικού γονιδίου ανεξαρτήτως αλληλεπίδρασης (leakage) είτε λόγω υπερβολικά πυκνού στρώσιματος μετασχηματισμένων κυττάρων (οι δύο αυτές περιπτώσεις αναφέρονται σαν «background colonies»). Στην παρούσα μελέτη κρίθηκε απαραίτητο στο υπόστρωμα να προστεθεί ο παράγοντας 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT), ανταγωνιστής στην παραγωγή ιστιδίνης, για να μειωθεί ο αριθμός των εσφαλμένα θετικών αποικιών. Με αυτό τον τρόπο, μόνο στην περίπτωση αυξημένης παραγωγής ιστιδίνης (μέσω αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών) μπορούν να επιβιώσουν τα κύτταρα, παρεμποδίζοντας έτσι την εμφάνιση λανθασμένα θετικών αλληλεπιδράσεων. Επίσης υπάρχει και η περίπτωση, αν και είναι λιγότερο συχνό φαινόμενο, η πρωτεΐνη «prey», ανεξαρτήτως της «bait» να έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να προσδένεται στις ρυθμιστικές αλληλουχίες. Το αποτέλεσμα προσθήκης του ανταγωνιστή σε θρεπτικό SD-3, έδειξε ότι, παρότι είχε προστεθεί ο παράγοντας 3-AT, οι ζύμες που αποτελούσαν τον αρνητικό έλεγχο του πειράματος (*h-l*) αναπτύσσονταν κανονικά. Συνεπώς προχωρήσαμε σε μία ακόμη συμπληρωματική μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στο στέλεχος αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών μέσω του μεταβολισμού του X-gal που αποτελεί υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς *LACZ* το οποίο μεταβολίζει

το X-gal που περιέχεται στο φίλτρο ανίχνευσης. Το προϊόν μεταβολισμού του X-gal είναι η παραγωγή μπλε χρώματος, χρωματισμός που αποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη αποικία μετασχηματισμένης ζύμης. Και σε αυτή την περίπτωση, το αποτέλεσμα που αποτυπώθηκε στο φίλτρο ανίχνευσης ήταν εμφάνιση μπλε χρώματος σε όλες τις αποικίες που χρησιμοποιήθηκαν (a-l).

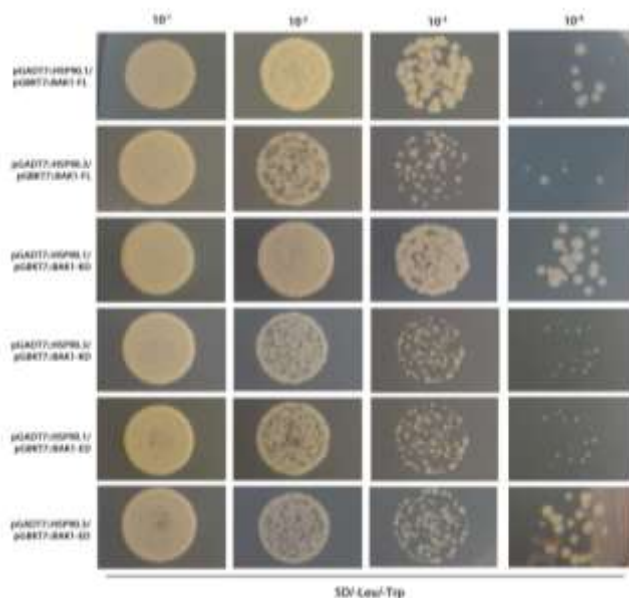
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η συμπεριφορά των κυττάρων αποκλίνει από την αναμενόμενη, με βάση τον γενότυπο (§2.9.1.1). Για το λόγο αυτό η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές ακόμη, χωρίς καμία αλλαγή στο πρότυπο ανάπτυξης. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε και έλεγχος ανάπτυξης των μετασχηματισμένων σε θρεπτικό υπόστρωμα που λείπουν λευκίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και αδενίνη (SD-4). Με την ίδια λογική, αναμένεται να αναπτυχθούν κύτταρα των οποίων οι πρωτεΐνες με τις οποίες μετασχηματίστηκαν, αλληλεπιδρούν. Επειδή φαίνεται ότι το πρότυπο ανάπτυξης του θετικού ελέγχου (g: 53/T) δεν διαφέρει καθόλου σε σχέση με αυτό των αρνητικών ελέγχων, η διαδικασία επαναλήφθηκε με χρήση διαφορετικού στελέχους ζύμης.

3.2.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης στο στέλεχος Y2HGold

Κατά αντίστοιχο τρόπο ο μετασχηματισμός κυττάρων Y2HGold (§2.9.3) έδωσε αποικίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο SD-2, γεγονός που υποδηλώνει επιτυχή μετασχηματισμό. Οι μεγαλύτερες αποικίες επιλέχθηκαν για τη μελέτη αλληλεπίδρασης. Στις αποικίες αυτές πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} οι οποίες επιστρώθηκαν σε θρεπτικό μέσο SD-2 και αναπτύχθηκαν για 2 ημέρες (Εικόνα 3.14, 3.15). Για την αραιώση οι αποικίες διαλύθηκαν σε νερό και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητά τους (στην αραιώση 10^{-1}). Στην εικόνα 3.14 φαίνονται μετασχηματισμένες ζύμες με τον θετικό και αρνητικό έλεγχο του πειράματος, και στην εικόνα 3.15 με τις κατασκευές που μας ενδιαφέρει να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση.



Εικόνα 3.14 Μετασηματισμένα κύτταρα Y2HGold που επιλέχθηκαν από κάθε μετασηματισμό και αναπτύχθηκαν σε SD/-Trp/-Leu (SD-2). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} . Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης στους 30 °C.

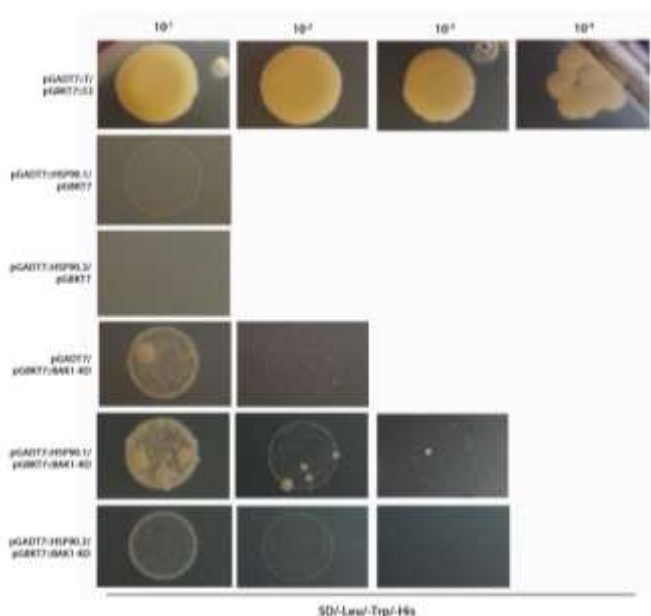


Εικόνα 3.15 Μετασηματισμένα κύτταρα Y2HGold που επιλέχθηκαν από κάθε μετασηματισμό και αναπτύχθηκαν σε SD/-Trp/-Leu (SD-2). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} . Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης στους 30 °C.

Με βάση τον γενότυπο αυτού του στελέχους όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο §2.9.1.1 όταν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν φέρνουν κοντά τις περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 για τη μεταγραφή τεσσάρων διαφορετικών γονιδίων αναφοράς (*AUR1-C*, *ADE2*, *HIS3* και *MEL1*).

Στην παρούσα μελέτη για τη μελέτη αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό από το οποίο λείπουν η λευκίνη, η τρυπτοφάνη, η ιστιδίνη και η αδενίνη

(SD-4 ή SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) καθώς και θρεπτικό SD-3 (SD/-Leu/-Trp/-His). Έτσι επιλεγμένα κύτταρα τα οποία επιστρώθηκαν σε θρεπτικό SD-2, επιστρώθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και σε θρεπτικά μέσα SD-3 (Εικόνα 3.16) και SD-4.



Εικόνα 3.16 Μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ BAK1-KD και HSP90. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα Y2HGold που επιλέχθηκαν από κάθε μετασχηματισμό αναπτύχθηκαν σε SD/-Leu/-Trp/-His (SD-3). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} . Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης στους 30 °C.

Τα αποτελέσματα του πειράματος, δεν επιβεβαιώνουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης BAK1 και των περιοχών της, με τις πρωτεΐνες HSP90.1 και HSP90.3, στο σακχαρομύκητα.

Είναι γνωστό ότι προκειμένου να μπορέσουν να ανιχνευθούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με το σύστημα αυτό, οι πρωτεΐνες θα πρέπει να μετακινηθούν στον πυρήνα. Έτσι, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαθέτουν πεπτιδιο συνθήματος (Signal Peptide) συχνά δεν είναι ικανές να φθάσουν στον πυρήνα και ως εκ τούτου ορισμένες φορές δεν καθίσταται δυνατό να ανιχνευθεί το γεγονός της αλληλεπίδρασης (Auerbach and Stagljar 2005).

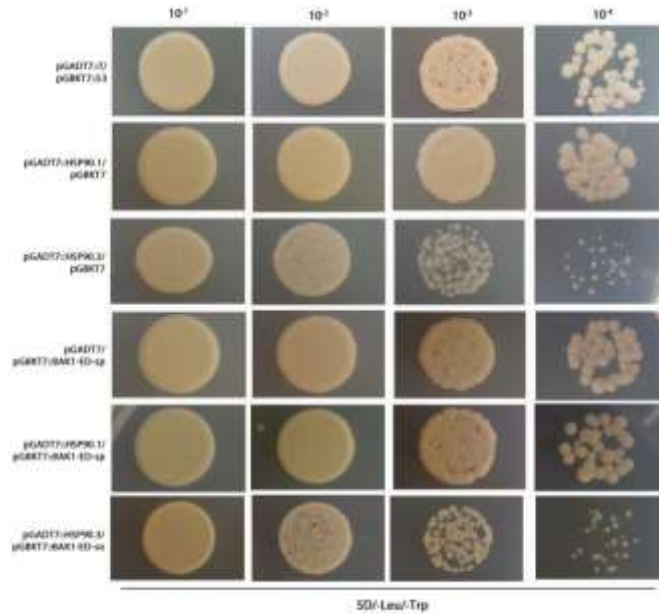
Για τον λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμη η τροποποίηση της εξωκυτταρικής επικράτειας ούτως ώστε να μην διαθέτει το πεπτιδιο συνθήματος. Έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητές που να ενισχύουν την εξωκυτταρική περιοχή του γονιδίου *BAK1*, απουσία του πεπτιδίου συνθήματος (Εικόνα 3.1, BAK1-ED-sp). Ακολούθησε κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7 (Εικόνα 3.11), διαδικασία αντίστοιχη με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο §3.1.

Στη συνέχεια ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων Y2HGold με τις κατασκευές:

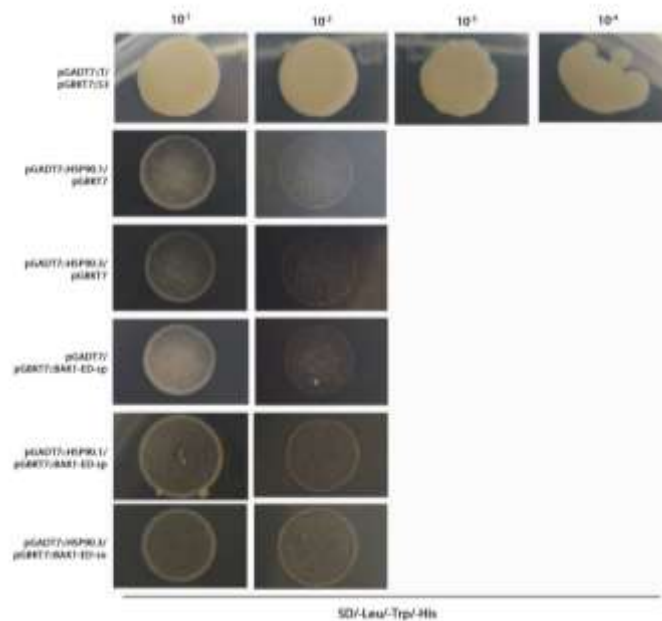
- a) pGADT7::*HSP90.1* // pGBKT7::*BAK1-ED-sp*
- b) pGADT7::*HSP90.3* // pGBKT7::*BAK1-ED-sp*
- c) pGADT7::*T* // pGBKT7::*53*
- d) pGADT7 // pGBKT7::*BAK1-ED-sp*
- e) pGADT7::*HSP90.1* // pGBKT7

f) pGADT7::*HSP90.3* // pGBKT7

Προέκυψαν αποικίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο SD-2, γεγονός που υποδηλώνει επιτυχή μετασχηματισμό. Επιλέχθηκαν οι μεγαλύτερες αποικίες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} οι οποίες στρώθηκαν σε θρεπτικό μέσο SD-2 (Εικόνα 3.17) αλλά και σε θρεπτικά μέσα SD-3, SD-4 για τη μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.17 Μετασχηματισμένα κύτταρα Y2HGold που επιλέχθηκαν από κάθε μετασχηματισμό και αναπτύχθηκαν σε SD/-Trp/-Leu (SD-2). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} . Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης στους 30 °C.



Εικόνα 3.18 Μελέτη αλληλεπίδρασης μεταξύ BAK1-ED-sp και HSP90. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα Y2HGOLD που επιλέχθηκαν από κάθε μετασχηματισμό αναπτύχθηκαν σε SD/-Leu/-Trp/-His (SD-3). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} και 10^{-4} . Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν έπειτα από 2 ημέρες ανάπτυξης στους 30 °C.

Παρ' ότι τροποποιήθηκε η εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης BAK1 ούτως ώστε να διευκολυνθεί η ανίχνευση πιθανής αλληλεπίδρασης, δεν φαίνεται να υπάρχει αλλαγή στο αποτέλεσμα του πειράματος.

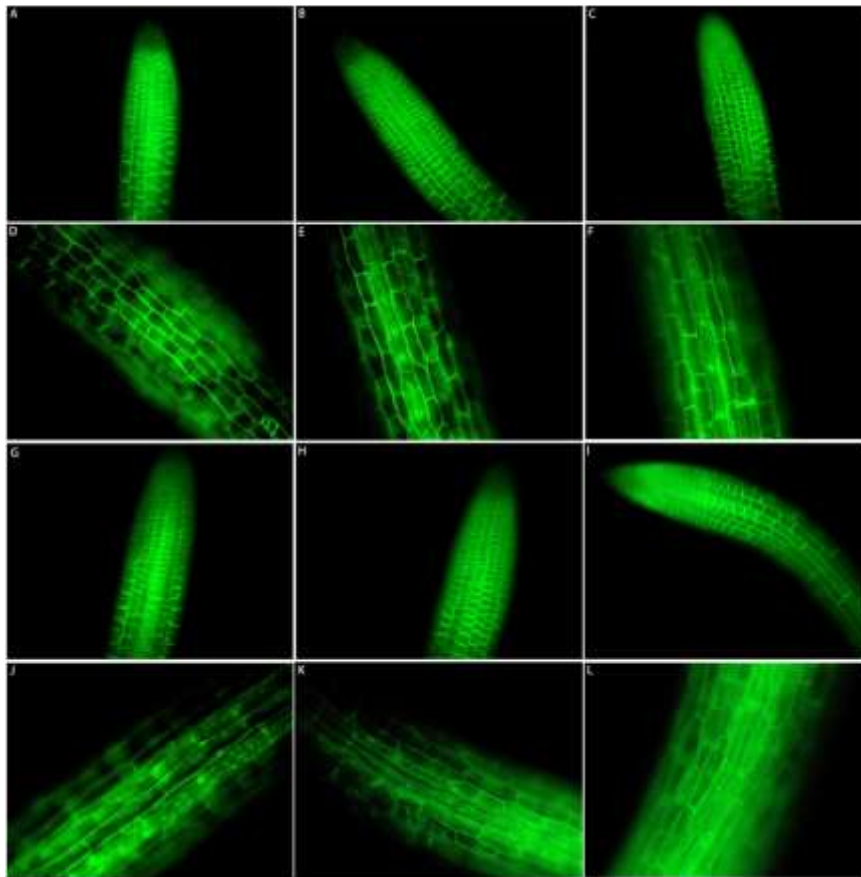
3.3 Ρόλος HSP90 στην κυτταρική τοποθέτηση της BAK1

Η πρωτεΐνη BAK1 όπως έχει αναφερθεί αποτελεί συνυποδοχέα των μπρασινοστεροειδών και τοποθετείται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη (Belkhadir and Chory, 2006). Στο εργαστήριο υπήρχε μετάλλαγμα *A. Thaliana* το οποίο εκφράζει την χειμερινή πρωτεΐνη BAK1:BAK1:GFP. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein-GFP) έχει κλωνοποιηθεί σε μεταφραστική σύντηξη με την πρωτεΐνη BAK1, γεγονός που επιτρέπει την παρατήρηση της κυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης BAK1 σε μικροσκόπιο φθορισμού.

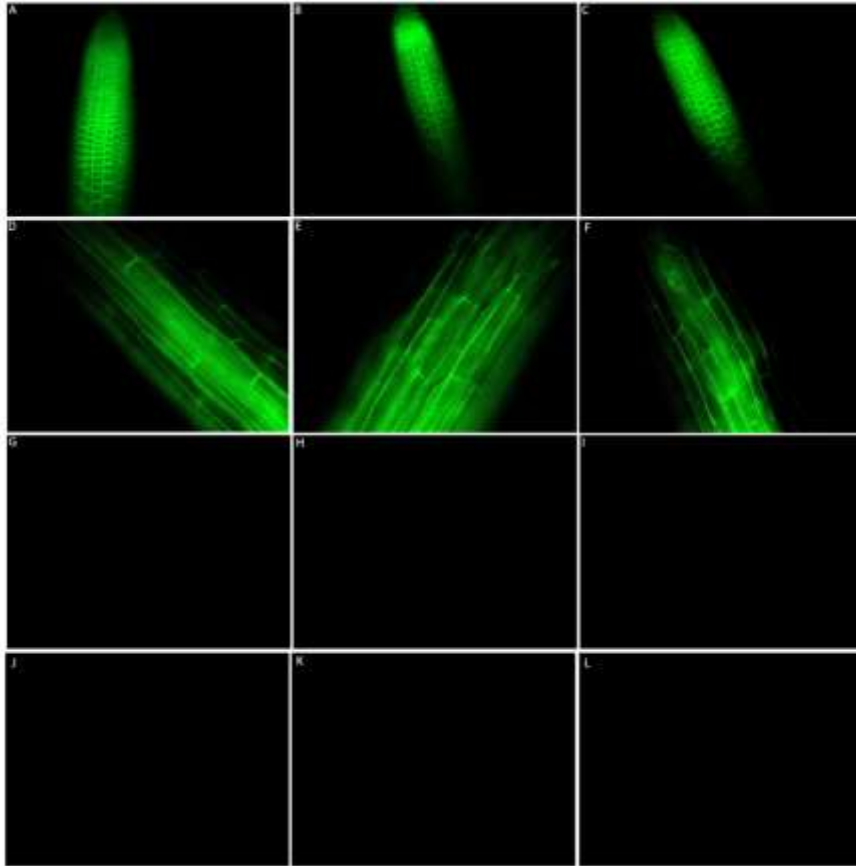
Για την μελέτη του ρόλου των πρωτεϊνών HSP90 στην κυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης BAK1, πραγματοποιήθηκε αναστολή της δράσης των HSP90 φαρμακολογικά. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το χημικό GDA (Geldanamycin), που αποτελεί αντιβιοτικό το οποίο καταστέλλει τη λειτουργία των HSP90 πρωτεϊνών μέσω πρόσδεσης με μεγάλη εξειδίκευση στο αμινο-τελικό άκρο που είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση του ATP (Schulte *et al.*, 1998; Whitesell *et al.*, 1994).

Χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθήκες ανάπτυξης, για την παρατήρηση της σειράς στο μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα τα φυτά ανατύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες φωτός (16 h φως/8 h σκοτάδι) (Εικόνα 3.19), ενώ ταυτόχρονα η ίδια σειρά

αναπτύχθηκε σε συνθήκες πλήρους σκότους (Εικόνα 3.20). Έπειτα από 3 ημέρες ακολούθησε παρατήρηση των φυτών σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 3.19 Φυτά 3 ημερών BAK1:BAK1:GFP μεγαλωμένα σε 16 h φως/8 h σκοτάδι. **A-F**: Απουσία GDA, **G-L**: Παρουσία GDA 10 μ M (12 h στο σκοτάδι). Οι ρυθμίσεις του μικροσκοπίου ήταν ίδιες για τις δύο συνθήκες (exposure time 1 sec). Οι φωτογραφίες A, B, C, G, H, I απεικονίζουν κύτταρα ρίζας του φυτού, και οι φωτογραφίες D, E, F, J, K, L, απεικονίζουν κύτταρα υποκοτυλίου.



Εικόνα 4.20 Φυτά 3 ημερών BAK1:BAK1:GFP μεγαλωμένα σε συνθήκες σκότους. **A-F**: Απουσία GDA, **G**: Παρουσία GDA10 μ M (12 h στο σκοτάδι). Οι ρυθμίσεις του μικροσκοπίου ήταν ίδιες για τις δύο συνθήκες (exposure time 1 sec). Οι φωτογραφίες A, B, C απεικονίζουν κύτταρα ρίζας του φυτού, και οι φωτογραφίες D, E, F, απεικονίζουν κύτταρα υποκοτυλίου.

Όπως φαίνεται στις εικόνες η χρήση του αναστολέα της λειτουργίας των HSP90 πρωτεϊνών έχει διαφορετική επίδραση στο πρότυπο τοποθέτησης της πρωτεΐνης BAK1 ανάμεσα στα φυτά που μεγαλώνουν στο φως και στο σκοτάδι. Πιο συγκεκριμένα για τα φυτά που μεγαλώνουν στο φως η έλλειψη των HSP90 (Εικόνα 3.19, G-L), μέσω χρήσης του χημικού GDA, δεν διαφοροποιεί τα επίπεδα της πρωτεΐνης BAK1, ούτε φαίνεται να επηρεάζει εμφανώς την τοποθέτησή της. Αντιθέτως, για τα φυτά που μεγαλώνουν στο σκοτάδι η έλλειψη των HSP90 (Εικόνα 3.20, G-L) επιδρά στα επίπεδα της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε ποσοτική μείωση της πρωτεΐνης BAK1.

4. Συζήτηση

Η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών είναι μία υψηλά συντηρημένη οικογένεια θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών που απαντάται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Απαντάται σε μεγάλη αφθονία στα κύτταρα των οργανισμών, αποτελώντας το 1-2% των πρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες (Lai *et al.*, 1984; Buchner, 1999), ποσοστό που αυξάνεται σε 4-6% σε συνθήκες καταπόνησης. Τα μέλη της οικογένειας των HSP90 αποτελούν μοριακούς συνοδούς, οι οποίοι εμπλέκονται στην ορθή αναδίπλωση πολυπεπτιδίων και στην ενεργοποίηση βασικών πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι υποδοχείς ορμονών και οι μεταγραφικοί παράγοντες στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Pearl and Prodromou, 2006). Η απουσία των HSP90 πρωτεϊνών οδηγεί σε μη λειτουργικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών, αλλά ακόμα και στο θάνατο του οργανισμού σε υψηλές θερμοκρασίες (Borkovich *et al.*, 1989; Picard, *et al.*, 1990). Μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή των HSP90 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην αποδόμηση πρωτεϊνών (Young *et al.*, 2001), καθώς και στη σταθεροποίηση ενός δικτύου πρωτεϊνών «πελατών» (client proteins) που εμπλέκονται σε ποικίλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επηρεάζουν την ανάπτυξη (Li *et al.*, 2012; Pearl and Prodromou, 2006; Echeverria and Picard, 2010).

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η οικογένεια των HSP90 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά μέλη. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει τέσσερα κυτταροπλασματικά μέλη (HSP90.1, HSP90.2, HSP90.3 και Hsp90.4) τα οποία παρουσιάζουν ποσοστό ομολογίας της τάξης του 85% σε αμινοξικό επίπεδο, ένα χλωροπλαστικό (HSP90.5), ένα μιτοχονδριακό (HSP90.6) και ένα που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (HSP90.7) (Krishna and Gloor, 2001). Η αναστολή της λειτουργίας των HSP90 με χρήση χημικών (όπως GDA), προκαλεί προβλήματα στην ανάπτυξη των φυτών. Νεαρά φυτάρια μονών T-DNA μεταλλαγμάτων των διαφορετικών κυτταροπλασματικών HSP90, παρουσίασαν πλήθος φαινοτυπικών αποκλίσεων, συμπεριλαμβανομένου του μικρότερου υποκοτυλίου. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι οι HSP90 συμμετέχουν στο μηχανισμό ενσωμάτωσης και συντονισμού εξωγενών (θερμοκρασία) και ενδογενών (αυξίνη) σημάτων, προκειμένου να ρυθμιστεί η ανάπτυξη του φυτού σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Wang *et al.*, 2016 ; Watanabe *et al.*, 2016).

Τα φυτά, προκειμένου να μπορέσουν να αναπτυχθούν σε ένα συνεχόμενα μεταβαλλόμενο περιβάλλον έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται για να επιβιώσουν, γεγονός που απαιτεί την «ενορχήστρωση» πολύπλοκων περιβαλλοντικών σιγμάτων σε κυτταρικό επίπεδο (Belkhadir and Jaillais, 2015). Τα μπρασσινοστεροειδή (Brassinosteroids, BRs) είναι μία ομάδα στεροειδών ορμονών η οποία επηρεάζει την απόκριση του φυτού στο περιβάλλον, προωθώντας ή επεμβαίνοντας σε διάφορες πτυχές της ανάπτυξής του (Belkhadir and Jaillais, 2015). Ρυθμίζουν την επιμήκυνση και τη διαίρεση του κυττάρου σε βλαστούς και ρίζες, εμπλέκονται στη φωτομορφογένεση, την αναπαραγωγική ανάπτυξη, τη γήρανση του φύλλου και την απόκριση του φυτού σε καταπονήσεις (Clouse and Sasse, 1998). Η πρωτεΐνη BRI1 (Brassinosteroid insensitive 1) είναι υποδοχέας των μπρασσινοστεροειδών (BRs), με δράση κινάσης που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη, γεγονός που την κατατάσσει ανάμεσα στις LRR-RK πρωτεΐνες (Leucine Rich Repeats, Receptor Kinase, LRR-RK) (Belkhadir and Chory, 2006). Σε μεταλλάγματα απώλειας λειτουργίας για το γονίδιο *BRI1*, παρατηρήθηκαν φαινότυποι νανισμού, μη αναστρέψιμοι έπειτα από εξωγενή χορήγηση BR ορμονών (Clouse *et al.* 1996; Li and Chory 1997; Kinoshita *et al.* 2005). Έχει δειχθεί επίσης, ότι η αύξηση

της θερμοκρασίας επιδρά στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BR ορμονών, οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης BRI1 (Martins *et al.*, 2017).

Το μπρασσινολιδίο (BL), ο πιο ενεργός εκπρόσωπος των μπρασσινοστεροειδών ορμονών, έχει προταθεί ότι δρα σαν «γέφυρα» (molecular bridge), η οποία προωθεί τη σύνδεση του υποδοχέα των BR ορμονών (BRI1) με έναν ακόμη διαμεμβρανικό υποδοχέα, την πρωτεΐνη BAK1 (Santiago *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2013). Η πρωτεΐνη BAK1, ακόμη μία LRR-RK πρωτεΐνη, γνωστή και με το όνομα SERK3 (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 3) διαθέτει μικρότερη εξωκυτταρική περιοχή με πέντε μόνο LRRs (Kim and Wang, 2010). Ο ετεροδιμερισμός BRI1/BAK1 με τη σειρά του ενεργοποιεί μια σειρά διαδοχικών διαδικασιών με σκοπό τη μεταγωγή σήματος από τη μεμβράνη στον πυρήνα.

Μελέτες στα ζωικά συστήματα, στους υποδοχείς των οιστρογόνων (Devin-Leclerc *et al.*, 1998; Elbi *et al.*, 2004) και στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών ορμονών (Echeverria *et al.*, 2009) έχουν δείξει ότι για την μετακίνηση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στον πυρήνα είναι απαραίτητη η παρουσία των HSP90.

Στα φυτικά συστήματα, προηγούμενες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε μέλη των HSP90 και μορίων που συμμετέχουν σε συμπλέγματα μεταγωγής σήματος. Οι HSP90 πρωτεΐνες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τους δύο πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες του μονοπατιού των BR ορμονών, BES1 (Lachowiec *et al.*, 2013; Shigeta *et al.*, 2014) και BZR1. Επιπλέον έχει δειχθεί η αλληλεπίδραση της BIN2 με τις HSP90.1 και HSP90.3, μέσω της οποίας υποδηλώνεται ότι η ενεργή μορφή των HSP90 είναι απαραίτητη για την πυρηνική τοποθέτηση της κινάσης BIN2 (Samakovli *et al.*, 2014). Προηγούμενες αδημοσίευτες μελέτες του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ, φανερώνουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των HSP90.1 και HSP90.3 με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα BRI1 καθώς και με την εξωκυτταρική περιοχή του μορίου (Καλτσά Διπλωματική, 2017). Ακόμη οι HSP90 φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη BAK1, στον καπνό, με τη μέθοδο BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) ή SPLIT-GFP.

Η παρούσα μελέτη προσπαθεί να επιβεβαιώσει το εύρημα αυτό. Ακολουθώντας μια διαφορετική τεχνική προσέγγιση μελετήθηκαν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κυτταροπλασματικά μέλη HSP90.1 και HSP90.3 και στον συνυποδοχέα των BR ορμονών BAK1. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη πραγματοποιήθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης στον σακχαρομύκητα μεταξύ των HSP90 και BAK1. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η αλληλεπίδραση μελετήθηκε σε ετερόλογο σύστημα, από το οποίο λείπουν πιθανοί συμπαράγοντες, οι οποίοι ίσως συμβάλλουν θετικά στην πραγματοποίηση των αλληλεπιδράσεων *in vivo*.

Η παρούσα μελέτη προσπάθησε να συμπληρώσει τα ευρήματα της εμπλοκής των HSP90 πρωτεϊνών στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BR ορμονών, με διαφορετική προσέγγιση. Όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε απόλυτο σκοτάδι παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό χλωρωτικό φαινότυπο, με κύρια χαρακτηριστικά το μεγάλο μήκος του υποκοτυλίου, τον σχηματισμό αγκίστρου στην κορυφή του βλαστού και λευκές κοτυληδόνες λόγω της έλλειψης φωτοσύνθεσης. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται σαν σκοτομορφογένεση και είναι γνωστό ότι τα μπρασσινοστεροειδή έχουν κυρίαρχο ρόλο στη σκοτομορφογενετική ανάπτυξη. Έχει δειχθεί ότι νεαρά φυτάρια *Arabidopsis* που αναπτύσσονται στο σκοτάδι παρουσία GDA έχουν κοντό υποκοτύλιο

(Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, ΓΠΑ). Χειρισμός νεαρών διαγονιδιακών *BAK1::BAK1:GFP* φυτών *Arabidopsis* με GDA (Schulte *et al.*, 1998; Whitesell *et al.*, 1994) που αποτελεί καταστολέα της δράσης του HSP90 συστήματος σαν ATPάση, οδήγησε σε ποσοτική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης BAK1 σε συνθήκες σκότους. Ο φαινότυπος της μειωμένης κυτταρικής επιμήκυνσης παρουσία GDA συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και υποδεικνύει πρόβλημα στην αντίληψη των μπρασσινοστεροειδών. Εικάζεται ότι η ελάττωση της συγκέντρωσης του BAK1 υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη εξαιτίας της μη ορθής λειτουργίας των HSP90, οδηγεί σε εξασθένιση της σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού των μπρασσινοστεροειδών επηρεάζοντας τη μορφογένεση στο σκοτάδι.

Τα μπρασσινοστεροειδή είναι ορμόνες που προάγουν την ανάπτυξη και ελέγχουν σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της βιομάζας, της απόδοσης των καλλιεργειών και της προσαρμογής σε παράγοντες καταπόνησης. Η διεξοδική έρευνα και ανάλυση του μηχανισμού με τον οποίο οι HSP90 συντονίζουν το αναπτυξιακό μονοπάτι των μπρασσινοστεροειδών με περιβαλλοντικά σήματα, και κατ' επέκταση ελέγχουν εξειδικευμένες αναπτυξιακές αποκρίσεις σε κάθε ιστό είναι σήμερα πιο επιτακτική από ποτέ για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της αγροτικής παραγωγής όσον αφορά την επισιτιστική ασφάλεια με τρόπο βιώσιμο στα χρόνια της επερχόμενης κλιματικής αλλαγής.

5. Βιβλιογραφία

Albanese, V., Yam, A.Y.W., Baughman, J., Parnot, C. and Frydman, J., 2006. Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell*, **124(1)**, pp.75-88.

Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature*, **408(6814)**, p.796.

Aranda, A. and Pascual, A., 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*, **81(3)**, pp.1269-1304.

Arya, R., Mallik, M. and Lakhotia, S.C., 2007. Heat shock genes—integrating cell survival and death. *Journal of biosciences*, **32(3)**, pp.595-610.

Auerbach, D. and Stagljar, I., 2005. Yeast Two-hybrid protein-protein interaction networks. In *Proteomics and Protein-Protein Interactions* (pp. 19-31). Springer, Boston, MA.

Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T. and Yang, Z., 2004. Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **134(4)**, pp.1624-1631.

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

Belkhadir, Y. and Chory, J., 2006. Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science*, **314(5804)**, pp.1410-1411.

Belkhadir, Y. and Jaillais, Y., 2015. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytologist*, **206(2)**, pp.522-540.

Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J. and Lindquist, S., 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and cellular biology*, **9(9)**, pp.3919-3930.

Boston, R.S., Viitanen, P.V. and Vierling, E., 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. In *Post-transcriptional control of gene expression in plants* (pp. 191-222). Springer, Dordrecht.

Buchner, J., 1999. Hsp90 & Co.—a holding for folding. *Trends in biochemical sciences*, **24(4)**, pp.136-141.

Caplan, A.J., 1999. Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends in cell biology*, **9(7)**, pp.262-268.

Centenera, M.M., Fitzpatrick, A.K., Tilley, W.D. and Butler, L.M., 2013. Hsp90: still a viable target in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1835(2)**, pp.211-218.

Choe, S., Schmitz, R.J., Fujioka, S., Takatsuto, S., Lee, M.O., Yoshida, S., Feldmann, K.A. and Tax, F.E., 2002. *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3 β -like kinase. *Plant physiology*, **130(3)**, pp.1506-1515.

Clouse, S.D. and Sasse, J.M., 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual review of plant biology*, **49(1)**, pp.427-451.

Clouse, S.D., Langford, M. and McMorris, T.C., 1996. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant physiology*, **111(3)**, pp.671-678.

- Dangl, J.L., Horvath, D.M. and Staskawicz, B.J.**, 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, **341(6147)**, pp.746-751.
- De Smet, I., Voß, U., Jürgens, G. and Beeckman, T.**, 2009. Receptor-like kinases shape the plant. *Nature cell biology*, **11(10)**, p.1166.
- Devin-Leclerc, J., Meng, X., Delahaye, F., Leclerc, P., Baulieu, E.E. and Catelli, M.G.**, 1998. Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm. *Molecular endocrinology*, **12(6)**, pp.842-854.
- Dhaubhadel, S., Browning, K.S., Gallie, D.R. and Krishna, P.**, 2002. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *The Plant Journal*, **29(6)**, pp.681-691.
- Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F. and Krishna, P.**, 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant molecular biology*, **40(2)**, pp.333-342.
- Diévert, A., Gilbert, N., Droc, G., Attard, A., Gourgues, M., Guiderdoni, E. and Périn, C.**, 2011. Leucine-rich repeat receptor kinases are sporadically distributed in eukaryotic genomes. *BMC evolutionary biology*, **11(1)**, p.367.
- Domagalska, M.A. and Leyser, O.**, 2011. Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **12(4)**, p.211.
- Echeverria, P.C. and Picard, D.**, 2010. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1803(6)**, pp.641-649.
- Echeverría, P.C., Mazaira, G., Erlejman, A., Gomez-Sanchez, C., Pilipuk, G.P. and Galigniana, M.D.**, 2009. Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin β . *Molecular and cellular biology*, **29(17)**, pp.4788-4797.
- Elbi, C., Walker, D.A., Romero, G., Sullivan, W.P., Toft, D.O., Hager, G.L. and DeFranco, D.B.**, 2004. Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101(9)**, pp.2876-2881.
- Fields, S. and Song, O.K.**, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340(6230)**, p.245.
- Fields, S. and Song, O.K.**, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340(6230)**, p.245.
- Fridman, Y. and Savaldi-Goldstein, S.**, 2013. Brassinosteroids in growth control: how, when and where. *Plant science*, **209**, pp.24-31.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T. and Chory, J.**, 2000. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant physiology*, **123(4)**, pp.1247-1256.
- Frydman, J.**, 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, **70(1)**, pp.603-647.
- Gampala, S.S., Kim, T.W., He, J.X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M.Y., Guan, S., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J.M. and Chen, H.**, 2007. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Developmental cell*, **13(2)**, pp.177-189.

- Geldner, N., Hyman, D.L., Wang, X., Schumacher, K. and Chory, J.,** 2007. Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes & development*, **21(13)**, pp.1598-1602.
- Giniger, E. and Ptashne, M.,** 1988. Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85(2)**, pp.382-386.
- Giniger, E., Varnum, S.M. and Ptashne, M.,** 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, **40(4)**, pp.767-774.
- Gou, X., Yin, H., He, K., Du, J., Yi, J., Xu, S., Lin, H., Clouse, S.D. and Li, J.,** 2012. Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling. *PLoS genetics*, **8(1)**, p.e1002452.
- Haubrick, L.L. and Assmann, S.M.,** 2006. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, cell & environment*, **29(3)**, pp.446-457.
- He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J. and Wang, Z.Y.,** 2002. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99(15)**, pp.10185-10190.
- He, W., Wu, L., Gao, Q., Du, Y. and Wang, Y.,** 2006. Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Current microbiology*, **52(3)**, pp.197-203.
- Holcik, M. and Sonenberg, N.,** 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, **6(4)**, p.318.
- Jacob, U., Meyer, I., Bugl, H., Andre, S., Bardwell, J.C.A. and Buchner, J.,** 1995. Structural organization of prokaryotic and eukaryotic hsp90. *J Biol Chem*, **270**, pp.14412-14419.
- Jaillais, Y. and Chory, J.,** 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & molecular biology*, **17(6)**, p.642.
- Jaillais, Y. and Vert, G.,** 2012. Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nature cell biology*, **14(8)**, p.788.
- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miège, C. and Gaude, T.,** 2008. Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. *The Plant Journal*, **53(2)**, pp.237-247.
- Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z.L., Meyerowitz, E.M. and Chory, J.,** 2011. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes & development*, **25(3)**, pp.232-237.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A.,** 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144(4)**, pp.1425-1436.
- Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X. and Kuriyan, J.,** 2009. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, **137(7)**, pp.1293-1307.
- Kalmar, B. and Greensmith, L.,** 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced drug delivery reviews*, **61(4)**, pp.310-318.

- Kamal, A., Boehm, M.F. and Burrows, F.J., 2004.** Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends in molecular medicine*, **10(6)**, pp.283-290.
- Katschinski, D.M., 2004.** On heat and cells and proteins. *Physiology*, **19(1)**, pp.11-15.
- Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L. and Altmann, T., 1996.** Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *The Plant Journal*, **9(5)**, pp.701-713.
- Kim, T.W. and Wang, Z.Y., 2010.** Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual review of plant biology*, **61**, pp.681-704.
- Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Sun, Y., Burlingame, A.L. and Wang, Z.Y., 2009.** Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature cell biology*, **11(10)**, p.1254.
- Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J., 2005.** Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, **433(7022)**, p.167.
- Koning, A.J., Rose, R. and Comai, L., 1992.** Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant physiology*, **100(2)**, pp.801-811.
- Krishna, P. and Gloor, G., 2001.** The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell stress & chaperones*, **6(3)**, p.238.
- Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J.F. and Hill, S., 1995.** Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in Brassica napus. *Plant Physiology*, **107(3)**, pp.915-923.
- Lachowiec, J., Lemus, T., Thomas, J.H., Murphy, P.J., Nemhauser, J.L. and Queitsch, C., 2013.** The protein chaperone HSP90 can facilitate the divergence of gene duplicates. *Genetics*, **193(4)**, pp.1269-1277.
- Lai, B.T., Chin, N.W., Stanek, A.E., Keh, W. and Lanks, K.W., 1984.** Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Molecular and cellular biology*, **4(12)**, pp.2802-2810.
- Li, B. and Fields, S., 1993.** Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal*, **7(10)**, pp.957-963.
- Li, J. and Chory, J., 1997.** A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, **90(5)**, pp.929-938.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E. and Walker, J.C., 2002.** BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, **110(2)**, pp.213-222.
- Li, P., 2017.** Heat Shock Proteins in Aquaculture Disease Immunology and Stress Response of Crustaceans. In *Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences* (pp. 275-320). Springer, Cham.
- Liang, P. and MacRae, T.H., 1997.** Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of cell science*, **110(13)**, pp.1431-1440.
- Lindquist, S. and Craig, E.A., 1988.** The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, **22(1)**, pp.631-677.

- Lindquist, S.**, 1986. The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, **55(1)**, pp.1151-1191.
- Macho, A.P. and Zipfel, C.**, 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell*, **54(2)**, pp.263-272.
- Marrs, K.A., Casey, E.S., Capitant, S.A., Bouchard, R.A., Dietrich, P.S., Mettler, L.J. and Sinibaldi, R.M.**, 1993. Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development. *Developmental genetics*, **14(1)**, pp.27-41.
- Marshall, A., Aalen, R.B., Audenaert, D., Beeckman, T., Broadley, M.R., Butenko, M.A., Caño-Delgado, A.I., de Vries, S., Dresselhaus, T., Felix, G. and Graham, N.S.**, 2012. Tackling drought stress: receptor-like kinases present new approaches. *The Plant Cell*, **24(6)**, pp.2262-2278.
- Martins, S., Montiel-Jorda, A., Cayrel, A., Huguet, S., Paysant-Le Roux, C., Ljung, K. and Vert, G.**, 2017. Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nature communications*, **8(1)**, p.309.
- Milioni, D. and Hatzopoulos, P.**, 1997. Genomic organization of hsp90 gene family in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, **35(6)**, pp.955-961.
- Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. and Yahara, I.**, 1994. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Molecular and cellular biology*, **14(2)**, pp.1459-1464.
- Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T. and Bishop, G.J.**, 2002. Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. *The Plant Cell*, **14(12)**, pp.3163-3176.
- Morimoto, R.I.**, 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & development*, **12(24)**, pp.3788-3796.
- Morimoto, R.I.**, 1998. **Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.** *Genes & development*, **12(24)**, pp.3788-3796.
- Müssig, C.**, 2005. Brassinosteroid-promoted growth. *Plant biology*, **7(02)**, pp.110-117.
- Nakaya, M., Tsukaya, H., Murakami, N. and Kato, M.**, 2002. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **43(2)**, pp.239-244.
- Nam, K.H. and Li, J.**, 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, **110(2)**, pp.203-212.
- Nathan, D.F., Vos, M.H. and Lindquist, S.**, 1997. In vivo functions of the Saccharomyces cerevisiae Hsp90 chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94(24)**, pp.12949-12956.
- Nemhauser, J.L. and Chory, J.**, 2004. BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *Journal of Experimental Botany*, **55(395)**, pp.265-270.
- Neumann, D., Nover, L., Parthier, B., Rieger, R., Scharf, K.D. and Wollgiehn, R.**, 1989. Heat shock and other stress response systems of plants. *Results and problems in cell differentiation*, **16**, pp.1-155.

- Nickens, D.G., Bardiya, N., Patterson, J.T. and Burke, D.H.,** 2010. Template-directed ligation of tethered mononucleotides by T4 DNA ligase for kinase ribozyme selection. *PloS one*, **5(8)**, p.e12368.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yuan, H., Feldmann, K.A. and Tax, F.E.,** 1999. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant physiology*, **121(3)**, pp.743-752.
- Nollen, E.A. and Morimoto, R.I.,** 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *Journal of cell science*, **115(14)**, pp.2809-2816.
- Oh, E., Zhu, J.Y. and Wang, Z.Y.,** 2012. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature cell biology*, **14(8)**, p.802.
- Pandey, P., Ramegowda, V. and Senthil-Kumar, M.,** 2015. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in plant science*, **6**, p.723.
- Pearl, L.H. and Prodromou, C.,** 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, pp.271-294.
- Peng, P., Yan, Z., Zhu, Y. and Li, J.,** 2008. Regulation of the *Arabidopsis* GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Molecular plant*, **1(2)**, pp.338-346.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S. and Yamamoto, K.R.,** 1990. Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, **348(6297)**, p.166.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. and Sistonen, L.E.A.,** 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal*, **15(7)**, pp.1118-1131.
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S.S.C., Schmitz, R.J., Urich, M.A., Briggs, S.P. and Ecker, J.R.,** 2012. Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, **338(6105)**, pp.390-393.
- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E. and Lindquist, S.,** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **12(4)**, pp.479-492.
- Rapoport, T.A.,** 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, **450(7170)**, p.663.
- Reddy, R.K., Kurek, I., Silverstein, A.M., Chinkers, M., Breiman, A. and Krishna, P.,** 1998. High-molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant physiology*, **118(4)**, pp.1395-1401.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Deisenhofer, J.,** 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*, **298(5602)**, pp.2353-2358.
- Russinova, E., Borst, J.W., Kwaaitaal, M., Caño-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J. and de Vries, S.C.,** 2004. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *The Plant Cell*, **16(12)**, pp.3216-3229.

- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S. and Hwang, I.,** 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *The Plant Cell*, **19(9)**, pp.2749-2762.
- Saini, S., Sharma, I. and Pati, P.K.,** 2015. Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks. *Frontiers in plant science*, **6**, p.950.
- Samakovli, D., Margaritopoulou, T., Prassinos, C., Milioni, D. and Hatzopoulos, P.,** 2014. Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *new phytologist*, **203(3)**, pp.743-757.
- Samakovli, D., Thanou, A., Valmas, C. and Hatzopoulos, P.,** 2007. Hsp90 canalizes developmental perturbation. *Journal of Experimental Botany*, **58(13)**, pp.3513-3524.
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A. and Lindquist, S.,** 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO journal*, **11(6)**, pp.2357-2364.
- Sangster, T.A. and Queitsch, C.,** 2005. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current opinion in plant biology*, **8(1)**, pp.86-92.
- Santiago, J., Henzler, C. and Hothorn, M.,** 2013. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science*, **341(6148)**, pp.889-892.
- Schlesinger, M.J., Ashburner, M. and Tissières, A.,** 1982. *Heat shock, from bacteria to man*. Cold spring harbor laboratory.
- Schulte, T.W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D. and Neckers, L.M.,** 1998. Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell stress & chaperones*, **3(2)**, p.100.
- Shigeta, T., Zaizen, Y., Asami, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Okamoto, S., Matsuo, T. and Sugimoto, Y.,** 2014. Molecular evidence of the involvement of heat shock protein 90 in brassinosteroid signaling in Arabidopsis T87 cultured cells. *Plant cell reports*, **33(3)**, pp.499-510.
- Shiu, S.H. and Blecker, A.B.,** 2001. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci. STKE*, **2001(113)**, pp.re22-re22.
- Stewart, G.R., Snewin, V.A., Walzl, G., Hussell, T., Tormay, P., O'Gaora, P., Goyal, M., Betts, J., Brown, I.N. and Young, D.B.,** 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of Mycobacterium tuberculosis in the chronic phase of infection. *Nature medicine*, **7(6)**, p.732
- Stewart, J.L. and Nemhauser, J.L.,** 2010. Do trees grow on money? Auxin as the currency of the cellular economy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2(2)**, p.a001420.
- Su, W., Liu, Y., Xia, Y., Hong, Z. and Li, J.,** 2011. Conserved endoplasmic reticulum-associated degradation system to eliminate mutated receptor-like kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108(2)**, pp.870-875.

- Su, W., Liu, Y., Xia, Y., Hong, Z. and Li, J.,** 2011. Conserved endoplasmic reticulum-associated degradation system to eliminate mutated receptor-like kinases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108(2)**, pp.870-875.
- Sun, Y., Han, Z., Tang, J., Hu, Z., Chai, C., Zhou, B. and Chai, J.,** 2013. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell research*, **23(11)**, p.1326.
- Sun, Y., Han, Z., Tang, J., Hu, Z., Chai, C., Zhou, B. and Chai, J.,** 2013. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell research*, **23(11)**, p.1326.
- Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G.P., Nagy, F., Schell, J. and Koncz, C.,** 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell*, **85(2)**, pp.171-182.
- Tang, W., Kim, T.W., Oses-Prieto, J.A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A.L. and Wang, Z.Y.,** 2008. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science*, **321(5888)**, pp.557-560.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S. and Gendron, J.M.,** 2011. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nature cell biology*, **13(2)**, p.124.
- Torii, K.U.,** 2004. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol*, **234(243)**, pp.1-46.
- Tsan, M.F. and Gao, B.,** 2009. Heat shock proteins and immune system. *Journal of leukocyte biology*, **85(6)**, pp.905-910.
- Vert, G. and Chory, J.,** 2006. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*, **441(7089)**, p.96.
- Vert, G. and Chory, J.,** 2011. Crosstalk in cellular signaling: background noise or the real thing?. *Developmental cell*, **21(6)**, pp.985-991.
- Vert, G. and Chory, J.,** 2011. Crosstalk in cellular signaling: background noise or the real thing?. *Developmental cell*, **21(6)**, pp.985-991.
- Vierling, E.,** 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual review of plant biology*, **42(1)**, pp.579-620.
- Voss, A.K., Thomas, T. and Gruss, P.,** 2000. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, **127(1)**, pp.1-11.
- Wallin, R.P., Lundqvist, A., Moré, S.H., von Bonin, A., Kiessling, R. and Ljunggren, H.G.,** 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends in immunology*, **23(3)**, pp.130-135.
- 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**, p.10269.
- 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)**, pp.244-252.

- Wang, X. and Chory, J.**, 2006. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science*, **313**(5790), pp.1118-1122.
- Wang, X., Goshe, M.B., Soderblom, E.J., Phinney, B.S., Kuchar, J.A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S.C. and Clouse, S.D.**, 2005. Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *The Plant Cell*, **17**(6), pp.1685-1703.
- Wang, Z.Y. and He, J.X., 2004. Brassinosteroid signal transduction—choices of signals and receptors. *Trends in plant science*, **9**(2), pp.91-96.
- Wang, Z.Y.**, 2012. Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(1), pp.7-8.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J.**, 2002. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell*, **2**(4), pp.505-513.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J.**, 2002. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell*, **2**(4), pp.505-513.
- Watanabe, E., Mano, S., Nomoto, M., Tada, Y., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. and Yamada, K.**, 2016. HSP90 stabilizes auxin-responsive phenotypes by masking a mutation in the auxin receptor TIR1. *Plant and Cell Physiology*, **57**(11), pp.2245-2254.
- Whitesell, L. and Lindquist, S.L.**, 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, **5**(10), p.761.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M.**, 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**(18), pp.8324-8328.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S.**, 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**(5446), pp.1888-1893.
- Wilens, R.W., Sacco, M., Gusta, L.V. and Krishna, P.**, 1995. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiologia Plantarum*, **95**(2), pp.195-202.
- Xu, Y. and Lindquist, S.**, 1993. Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**(15), pp.7074-7078.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J.**, 2005. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell*, **120**(2), pp.249-259.
- Zhang, Q. and Denlinger, D.L.**, 2010. Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal

stress and pupal diapause in the corn earworm. *Journal of Insect Physiology*, **56(2)**, pp.138-150.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A. and Kuriyan, J., 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, **125(6)**, pp.1137-1149.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A. and Kuriyan, J., 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, **125(6)**, pp.1137-1149.

Zhang, X., Pickin, K.A., Bose, R., Jura, N., Cole, P.A. and Kuriyan, J., 2007. Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature*, **450(7170)**, p.741.

Zhang, X., Pickin, K.A., Bose, R., Jura, N., Cole, P.A. and Kuriyan, J., 2007. Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature*, **450(7170)**, p.741.

Zhu, J.Y., Sae-Seaw, J. and Wang, Z.Y., 2013. Brassinosteroid signalling. *Development*, **140(8)**, pp.1615-1620.

Zurek, D.M., Rayle, D.L., McMorris, T.C. and Clouse, S.D., 1994. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiology*, **104(2)**, pp.505-513.