ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΑΠΑΕΥΘΥΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΙΓΗΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (PTGS) ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΜΕ ΤΟ ΙΟΕΙΔΕΣ PSTVd

επιβλεπούΣα καθηγητρία : τΣαγρή ευθυμία

> ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2001

"Imagination is more important than knowledge, for knowledge is limited while imagination embraces the entire world" (Albert Einstein) Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του τμήματος Βιολογίας και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας κατά το διάστημα Οκτώβριος 1999 – Ιανουάριος 2001, με επιβλέποντες την Επικ. Καθ. Τσαγρή Ευθυμία και τον Prof. Tabler Martin. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Αισθάνομαι την ανάγκη και την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους οι οποίοι με βοήθησαν σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου και εργασίας μου στο Ηράκλειο.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τη Θεολογία Σαραφίδου για την υπομονή της και την προθυμία της και για το γεγονός ότι ήταν η πρώτη που με εισήγαγε στις μοριακές τεχνικές (για τις οποίες μέχρι τότε είχα πλήρη μεσάνυχτα), καθώς και όλους τους ανθρώπους του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου.

Ευχαριστώ επίσης την Δρ. (πλέον) Μανιατάκη Έλσα η οποία μου έμαθε τι πρέπει και τι δεν πρέπει να κάνω σε ένα εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης τις τεχνικούς του εργαστηρίου Σεργία Τζωρτζακάκη και Μαίρη Προβιδάκη γιατί ήταν πάντα πρόθυμες να με βοηθήσουν. Θα ήταν ευχής έργον να είχαν όλα τα εργαστήρια τεχνικούς τέτοιας αξίας.

Ένα μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Κρίτωνα Καλαντίδη που ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει όταν «κολλούσα». Η άριστη τεχνική και επιστημονική του κατάρτιση και οι συζητήσεις που κάναμε ήταν πολύτιμες για την περάτωση της εργασίας αυτής. Είναι ένα πολύτιμο στέλεχος για κάθε εργαστήριο και αισθάνομαι πραγματικά τυχερός για τη συνεργασία μας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αλεξάνδρα Μπούτλα για τις υποδείξεις της πάνω σε τεχνικά θέματα, για την προσφορά υλικών και γνώσης πάνω στο silencing. Της εύχομαι από καρδιάς καλή σταδιοδρομία (αν και είμαι σίγουρος γι αυτό).

Στον Dr. (at last) A. Emilio Martinez de Alba και στην υποψήφια διδάκτορα Ηρώ Κοντοδήμου θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για τις επιστημονικές συζητήσεις, για τις υποδείξεις και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν αλλά πάνω απ'όλα για τη φιλία τους.

Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Δημήτρη Κότση και Ελένη Μαρίνου ευχαριστώ γιατί σε στιγμές κούρασης «έκλεψα» κάτι από τη ζωντάνια τους (αν και από το Δημήτρη έκλεψα εκτός αυτού και αρκετά υλικά). Παιδιά, καλή σταδιοδρομία.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα παιδιά από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών για την προθυμία τους να μου δανείσουν συσκευές και υλικά.

Αν θα πρέπει λεπτομερώς να αναφερθώ στη βοήθεια που τόσο απλόχερα μου πρόσφερε η Dr. Michela Denti θα έπρεπε να γεμίσω τουλάχιστον τέσσερις κόλλες A4. Η υπομονή της, αλλά κυρίως η εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν για μένα ανεκτίμητος βοηθός. Οι πολύωρες επιστημονικές συζητήσεις, η ειλικρίνειά της αλλά και η υποστήριξή της σε στιγμές σκληρής αυτοκριτικής αποτέλεσαν σανίδα σωτηρίας σε έναν ωκεανό επιστημονικής και προσωπικής αμφιβολίας. Το ελάχιστο που μπορώ να κάνω εκτός από το να της πω ένα από καρδίας ευχαριστώ είναι να της ευχηθώ ότι καλύτερο στη ζωή της.

Ευχαριστώ τον Αν. Καθ. Δελιδάκη Χρήστο για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις πάνω στο κείμενο και το θεωρητικό υπόβαθρο της εργασίας και στην Αν. Καθ. Αθανασάκη-Βασιλειάδου Ειρήνη για το ενδιαφέρον της γύρω από την πρόοδό μου.

Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου, τον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Γιαζτζόγλου και τον τεχνικό έρευνας Γιώργο Σιανίδη για την πολύμηνη φιλοξενία τους, για την προθυμία τους και την καλοσύνη τους αλλά πιο πολύ απ'όλα για το γεγονός ότι με ανέχτηκαν τόσο καιρό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στον Dr. Martin Tabler για την άρτια επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις, την εμπιστοσύνη του και την υπομονή του καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Τσαγρή Ευθυμία. Είναι ο άνθρωπος που μου κέντρισε το ενδιαφέρον για την έρευνα γύρω από τα φυτά μέσα από τις πολύωρες συζητήσεις και εμπιστεύτηκε σε μένα ένα θέμα επίκαιρο και ευαίσθητο. Την ευχαριστώ επίσης για τις υποδείξεις της και την επιστημονική της καθοδήγηση και της ζητώ συγνώμη αν πολλές φορές την απογοήτευσα. Ελπίζω ωστόσο η τελική εικόνα να είναι καλή.

Για τα λάθη είμαι μόνο εγώ υπεύθυνος.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας Περιεχομένων	i
Πίνακας Συντμήσεων	iii
Περίληψη	vi
Abstract	vii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Το ιοειδές PSTVd	1
1.1.1. Δομή του ιοειδούς	2
1.1.2. Αντιγραφή και παθογονικότητα του PSTVd	3
1.2. Η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων (PTGS)	4
1.2.1. Κυτταρικοί μηχανισμοί και μοντέλα λειτουργίας	5
1.2.2. Μεθυλίωση DNA αλληλουχιών και ο ρόλος της	
στην PTGS	9
1.2.3. Σήματα διασυστηματικής μετα-μεταγραφικής σίγησης	10
1.2.4. Σίγηση γονιδίων επαγόμενη από ιούς (VIGS)	10
1.2.4.1. Ιικοι καταστολεις της PTGS	11
	14
2.1.1. Αντιδραστηρία και υλικά	14
2.1.2. Πλασμισιακοί φορείς και στελεχή βακτηρίων	14
2.1.3. Maptupes μ everous	10
2.1.4. Φυτικό υλικό 2.1.5. Κυριότερα διαλύματα και Αρεπτικά μέσα	17
2.1.6. Όργανα και συσκεμές	18
$2.2.$ M $\doteq 0.0501$	20
2.2.1. Μέθοδοι απομόνωσης, παραγωνής, τροποποίησης	
και σήμανσης νουκλεϊκών οξέων	20
2.2.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα Ε. coli	20
2.2.1.2. Μετασχηματισμός βακτηρίων Ε. coli	
με πλασμιδιακό DNA	20
2.2.1.3. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες	21
2.2.1.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση, απομόνωση και	
καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	22
2.2.1.5. Διαδικασίες υποκλωνοποίησης επιλεγμένων	~~~
ενθεμάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	22
2.2.1.6. Απομουωση ολικου ΚΝΑ απο φυτικο υλικο 0.0.1.7. Εκινήλατη ποιοιοτική ΒΝΑ πολή ματορή μοτήθους	23
2.2.1.7. Εκχυλίοη κομματίων κιλά πολύ μικρού μεγεθούς 2.2.1.8. Βαδιοσήματας και τροποποίηση πομκλοϊκών οδόχη	24
2.2.1.8. Fabioon μ and μ in μ it is avoid with μ	24 94
<u>2.2.1.0.1. τη υπο μεταγραφη</u> 2.2.1.8.2. Καθαρισμός και απομόνωση ραδιευερνά σημασμένων	47
<u>2.2.1.0.2. Παθαρισμός και απομονωση ρασιενεργα σημασμενών</u> μετανοάφων	26
2.2.1.8.3. Σήμανση RNA ολιγονουκλεοτιδίων στο 5' άκρο	$\frac{10}{27}$
2.2.1.8.4. Σήμανση RNA ολιγονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο	28
2.2.1.8.5. Απομάκρυνση της 5' φωσφορικής ομάδας από	
RNA νουκλεοτίδια	29

<u>2.2.1.8.6. Επίδραση HCl σε RNA ολιγονουκλεοτίδια</u>	30
2.2.2. Μολύνσεις φυτών με συνθετικά μετάγραφα PSTVd	
και με εκχυλίσματα μολυσμένων με PSTVd φυτών	30
2.2.3. Ανάλυση κατά northern	31
2.2.3.1. Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή	
πολυακρυλαμίδης	31
2.2.3.2. Υβριδοποίηση	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1. Μολυσματικότητα του ιοειδούς σε φυτά τομάτας	
και καπνού	33
3.2. Εμπλουτισμός των χαμηλού μοριακού βάρους RNA	
μορίων από δείγματα ολικού RNA	37
3.3. Ανάλυση κατά northern των μολυσμένων με PSTVd	
ωπόν τουάτας	38
3.3.1. Επιβεβαίωση της ύπαοξης υικοών RNA μορίων και	
καθορισμός του μενέθους τους.	39
3.3.2. Διερεύνηση της πολικότητας των μικοών RNA μορίων	40
3.3.3. Ποσοτικοποίηση μικοών RNA μορίων	41
3.3.3.1. Συσχετισμός της παθονονικότητας των στελεχών	
του ιοειδούς και της ποσότητας των PTGS-τυπικών RNA	
μορίων στα φυτά	42
3.3.3.2. Συσχετισμός μεταξύ της χρονικής διάρκειας της	
μόλυνσης και της ποσότητας των μικρών RNA μορίων	43
3.3.4. Εκπροσώπηση των περιοχών του ιοειδούς στο	
κλάσμα των μικρών RNA μορίων	44
3.4. Διερεύνηση των 5' και 3' άκρων των,	
χαρακτηριστικών κατά τη μετα-μεταγραφική σίγηση	
νονιδίων, μικρών RNA μορίων	46
3.4.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός του 5' άκρου των	
μικρών RNA μορίων	47
3.4.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός του 3' άκρου των	
μικρών RNA μορίων	50
3.5. Προπαρασκευαστικά στάδια για τη μελέτη της	
πιθανής εμπλοκής του HC-Pro στη μετα-μετανοαφική	
σίνηση νονιδίων που ποοκαλείται από το ιοειδέςPSTVd	51
	54
	04
	E 4
μετα-μεταγραφική σιγήση γονισίων	54
4.2. Τα 5' και 5' ακρά των ΡΤGS-τυπικών κΝΑ μορίων	56
4.3. Ο ρολος των μικρων RNA μορίων στη	
μετα-μεταγραφική σιγήση γονιδίων	57
4.4. Προοπτικές και μελλοντική εργασία	59
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ ΑΓΓΛΙΚΟΣ ΟΡΟΣ (ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ)

APS	Ammonium persulfate						
aRNA	aberrant RNA (ἑκτροπο RNA)						
asRNA	antisense RNA (αντικωδικό RNA)						
bp	base pairs (Ζεύγη βάσεων)						
BSA	Bovine Serum Albumin (Βόεια αλβουμίνη ορού)						
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus						
cpm	counts per minute (κτύποι ανά λεπτό)						
d.p.i.	days post inoculation (Ημέρες μετά τη μόλυνση)						
dsRNA	double-stranded RNA (δίκλωνο RNA)						
g	gram (γραμμάριο)						
h	hour (ώρα)						
HC-Pro	Helper Component-Proteinase						
kD	KiloDalton						
1	litre (λίτρο)						
mg	milligram (χιλιοστόγραμμο)						
min	minute (λεπτό)						
ml	milliliter (χιλιοστόλιτρο)						
mRNA	messenger RNA (αγγελιαφόρο RNA)						
Nt(s)	mucleotide(s) [νουκλεοτίδιο(α)]						
PPV	Plum pox Virus (ιός της ευλογιάς της δαμασκηνιάς)						
PSTVd	Potato Spindle Tuber Viroid						
PTGS	Post Transcriptional Gene Silencing						
PVX	Potato Virus X						
RdRP	RNA-dependent-RNA-Polymerase (RNA πολυμεράση						
	εξαρτώμενη από RNA)						
RISC	RNA-induced silencing complex (σύμπλοκο σίγησης						
	επαγόμενο από RNA)						
RNAi	RNA interference (RNA παρεμβολή)						
rpm	Rounds per minute (Στροφές ανά λεπτό)						

rRNA	ribosomal RNA (ριβοσωμικό RNA)							
sec	Second (δευτερόλεπτο)							
sRNA	sense RNA (κωδικό RNA)							
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylen-diamine							
TGS	transcriptional gene silencing (μεταγραφική σίγηση)							
tRNA	transfer RNA (μεταφορικό RNA)							
VIGS	Virus Induced Gene Silencing (Γονιδιακή σίγηση							
	επαγώμενη από ιούς							
κ.β	Κατά βάρος							
K.0	Κατ'όγκο							
μg	microgram (μικρογραμμάριο)							
μl	microlitre (μικρόλιτρο)							

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων (PTGS) είναι ένας θεμελιώδης ρυθμιστικός μηχανισμός σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, φυτά και ζώαστα ζώα είναι γνωστός ως RNAi (RNA interference). Παρ'όλα αυτά, τα κυτταρικά συστατικά του μηχανισμού καθώς και η ρύθμισή του δεν είναι ακόμη εξακριβωμένα. Το PTGS έχει διαφορετικούς ρόλους σε διάφορους οργανισμούς (αντίσταση ενάντια σε ιούς στα φυτά, αναπτυξιακή ρύθμιση, καταστολή μετακίνησης μεταθετών στοιχείων στη *Drosophila* και στο *C. elegans*). Σε όλες τις περιπτώσεις, το PTGS αποικοδομεί ειδικά mRNAστόχους με την ταυτόχρονη παραγωγή δίκλωνων RNA μορίων μεγέθους 21-23 νουκλεοτιδίων. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι το PTGS μπορεί να αναπτυχθεί διασυστηματικά μέσω ενός παραγώγου του που μπορεί να μεταφέρεται εξω- και/ή ενδο-κυτταρικά.

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η ικανότητα του ιοειδούς PSTVd – ενός παθογόνου RNA μορίου που δεν παράγει καμία πρωτεΐνη – να προκαλεί PTGS σε μολυσμένα με αυτό φυτά τομάτας.

Πράγματι, ανάλυση κατά northern των μολυσμένων φυτών έδειξε ότι τα μικρού μεγέθους RNA μόρια είναι παρόντα υποδηλώνοντας ότι το ιοειδές προκαλεί ενεργοποίηση ενός μηχανισμού ανάλογου αυτού της σίγησης γονιδίων. Παράλληλα ξεκίνησε και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των 5' και 3' άκρων των μικρών RNA μορίων σε μία προσπάθεια να βρεθούν πιθανά ένζυμα που εμπλέκονται στο μηχανισμό και να εξακριβωθεί κατά πόσο είναι πιθανό να υπάρχει μεταξύ των μορίων αυτών κάποιο που να αποτελεί το σήμα για τη διασυστηματική ανάπτυξη του PTGS. Επίσης, με δεδομένο το γεγονός ότι ορισμένοι RNA ιοί έχουν αναπτύξει πρωτεΐνες που δρουν ως καταστολείς του PTGS, έγιναν προπαρασκευαστικές διαδικασίες για να διερευνηθεί η συμμετοχή του καταστολέα στην ενεργοποιούμενη από PSTVd γονιδιακή σίγηση.

ABSTRACT

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) – also known in animals as RNAi - is a fundamental regulatory mechanism operating in diverse types of organisms, however the cellular components of the gene silencing machinery and the regulation of the process are not understood. PTGS has diverse roles in different organisms, from resistance against viruses in plants to developmental regulation in *Drosophila* and *C elegans*. In all cases, PTGS is manifestated by specific targeted degradation of mRNA and production of 21-23 nt long double-stranded and single-stranded RNAs. There is also evidence of systemic acquired PTGS in different organisms. This systemic acquired PTGS is possibly triggered by a PTGS product, which can be transported intracellularly or extracellularly.

In the present work, the ability of Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) - a non-coding pathogenic RNA molecule – to trigger PTGS after infection of tomato plants was investigated.

Indeed, northern analysis of PSTVd-infected tomato plants showed that 21-23 nt long RNAs are present, indicating that the replicating viroid is subjected to a mechanism which resembles PTGS. Biochemical characterization of the 5' and 3' end groups of these small RNA molecules was initiated in order to speculate on possible known enzymes that are involved in the PTGS mechanism and to indicate a tagged systemic silencing signal among the small RNA species. Given the fact that plant viruses have developed a mechanism that suppresses PTGS, preliminary cloning of the cDNA of a known viral suppressor of PTGS into a binary plant expression vector was carried out in an effort to illuminate a possible role of this suppressor in the PSTVd-triggered-post transcriptional gene silencing.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά υπόκεινται σε διάφορα ενδογενή και περιβαλλοντικά ερεθίσματα που μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στη δομή ή/και στην έκφραση του γενωματός τους. Επειδή τα φυτά δεν είναι ικανά να μετακινηθούν και να ξεφύγουν από το περιβάλλον τους, έχουν αναπτύξει άμυνες έτσι ώστε να ελαττώσουν τις πιθανές τοξικές επιδράσεις που προκύπτουν από αυτά τα ερεθίσματα.

Πολλά παθογόνα χρησιμοποιούν τους κυτταρικούς μηχανισμούς των φυτών για να εξυπηρετήσουν τις δικές τους ανάγκες για πολλαπλασιασμό και έκφραση του γενωματός τους. Τα φυτά από την άλλη έχουν αναπτύξει άμυνες ενάντια σε αυτά τα παθογόνα. Στην περίπτωση των RNA ιών, τα φυτά αμύνονται πυροδοτώντας μία διαδικασία σίγησης ιικών γονιδίων εξαρτώμενη από την ομολογία του ιικού γενώματος (HDGS, Homology Dependent Gene Silencing).

Η έρευνα γύρω από τη λειτουργία αυτή έχει φέρει στο φως κάποια πολύ ενδιαφέροντα και χρήσιμα στοιχεία σχετικά με τη συμπεριφορά των φυτών ενάντια σε ιούς αλλά και κατά το γενετικό μετασχηματισμό τους.

Παρ'όλα αυτά, μέχρι τώρα καμία μελέτη δεν έχει γίνει σχετικά με την άμυνα που αναπτύσσουν τα φυτά κατά την προσβολή τους με το ιοειδές PSTVd.

1.1. Το ιοειδές PSTVd

Τα ιοειδή είναι οι απλούστερες παθογονικές μονάδες που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα. Πρόκειται για μονόκλωνα κυκλικά μόρια RNA αποτελούμενα από 250-450 nt ανάλογα με το είδος. Το ιοειδές PSTVd (Potato Spindle Tuber Viroid) είναι το πρώτο ιοειδές που ανακαλύφθηκε και η αλληλουχία του έγινε γνωστή, καθώς επίσης και το πρώτο του οποίου η δομή χαρακτηρίστηκε με λεπτομέρεια. Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον δώδεκα φυσικά στελέχη του PSTVd έχουν ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί όσον αφορά στην αλληλουχία τους (Schnölzer *et al.*, 1985[•] Pelchat *et al.*, 2000).

1.1.1. Δομή του ιοειδούς

Τα περισσότερα φυσικά στελέχη του ιοειδούς PSTVd που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα αποτελούνται από 359 nt. Το RNA μόριο του ιοειδούς είναι κλειστό κυκλικό και ραβδόμορφο στη συνήθη μορφή του (Sänger *et al.*, 1976). Αποτελείται από 5 διακριτές περιοχές (Εικ. 1.1.α):

<u>Η κεντρική συντηρημένη περιοχή</u> Βρίσκεται στο κέντρο του μορίου και αποτελείται από 95 nt περίπου. Είναι από πλευράς αλληλουχίας η περισσότερο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των ιοειδών. Λειτουργικά εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιοειδούς και συγκεκριμένα στην επεξεργασία των ενδιάμεσων μορφών αντιγραφής (βλ. 1.1.2).

<u>Η περιοχή παθογονικότητας</u> σχετίζεται με την παθογονικότητα του ιοειδούς. Έχει βρεθεί ότι φυσικά στελέχη που προκαλούν ήπια συμπτώματα στους ξενιστές διαφέρουν από στελέχη που προκαλούν έντονα συμπτώματα κατά 3 μόνο νουκλεοτίδια που βρίσκονται στην περιοχή αυτή (Gross *et al.*, 1981[°] Schnölzer *et al.* 1985).



Εικόνα 1.1.α Οι δομικές και λειτουργικές περιοχές του PSTVd. TL η ακραία αριστερή περιοχή, P η περιοχή παθογονικότητας, C η κεντρική συντηρημένη περιοχή, V η μεταβλητή περιοχή, TR η ακραία δεξιά περιοχή.

<u>Η μεταβλητή περιοχή</u> είναι η πλέον μεταβλητή από πλευράς αλληλουχίας περιοχή του ιοειδούς. Βρίσκεται «δεξιά» από την κεντρική συντηρημένη περιοχή. Μεταλλάξεις της περιοχής αυτής επηρεάζουν την αντιγραφή του ιοειδούς αφού έχουν βρεθεί μεταλλάγματα που έχουν μειωμένο ρυθμό αντιγραφής σε σχέση με τα ιοειδή άγριου τύπου (Hu *et al.*, 1996). Μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή αυτή ίσως να εμπλέκεται και στην παθογονικότητα του ιοειδούς (Schmitz and Riesner, 1998).

<u>Η ακραία αριστερή περιοχή</u> φαίνεται ότι παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην εμφάνιση των συμπτωμάτων απ' ότι η περιοχή παθογονικότητας.

<u>Η ακραία δεξιά περιοχή</u> ίσως παίζει ρόλο στη διασπορά του ιοειδούς στον ξενιστή αφού έχει παρατηρηθεί ότι μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή επηρεάζουν ή καταστέλλουν την διακυτταρική μεταφορά του ιοειδούς (Hammond *et al.*, 1994).

1.1.2 Αντιγραφή και παθογονικότητα του PSTVd

Το ιοειδές αντιγράφεται στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου και τα ώριμα (+) μόρια εντοπίζονται στον πυρηνίσκο (Harders *et al.*, 1989). Το ιοειδές αντιγράφεται χρησιμοποιώντας την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ΙΙ του ξενιστή του (Mülbach and Sänger, 1979[•] Schindler and Mülbach, 1992). Παρ'όλα αυτά δεν είναι ακόμη γνωστό το σημείο έναρξης της αντιγραφής του ιοειδούς *in vivo* (Gast *et al.*, 1998).

Είναι γνωστό ότι κατά την αντιγραφή του ιοειδούς παράγονται ενδιάμεσα μόρια θετικής και αρνητικής πολικότητας και ότι η κυκλοποίηση του μορίου μπορεί να επιτυγχάνεται και μέσω της δράσης μίας RNAσης (Tsagris *et al.* 1991).

Η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή του ιοειδούς το καθιστά πολύ ικανό παράσιτο αφού η κυκλική του μορφή εμποδίζει την αποδόμηση του από εξωνουκλεάσες ενώ το γεγονός ότι είναι ραβδόμορφο και σχηματίζει ζεύγη βάσεων του προσδίδει σταθερότητα ενάντια σε ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν μονόκλωνο RNA (ssRNA). Από την άλλη η ατελής συμπληρωματικότητα του και το γεγονός ότι είναι ραβδόμορφο, το καθιστούν υπόστρωμα για τη δράση RNAσων που αναγνωρίζουν δίκλωνο RNA (dsRNA) (Gast *et al.*, 1998). Επομένως, η διατήρηση της συγκεκριμένης, ώριμης, δευτεροταγούς δομής του PSTVd είναι ένα ζωτικής σημασίας προαπαιτούμενο για την αντιγραφή και την επιβίωση του (Wassenegger *et al.* 1994). Παρά το γεγονός ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ παθογονικότητας και ικανότητας αντιγραφής του ιοειδούς, φαίνεται ότι διαφορετικά στελέχη συσσωρεύονται με παρόμοιες τελικές συγκεντρώσεις (Schnölzer *et al.* 1985). Επίσης ο ρυθμός της ολικής αντιγραφής του ιοειδούς δεν οριοθετείται από κάποια ιδιότητα του ιοειδούς αλλά από την μειωμένη ικανότητα του ξενιστή. Από την άλλη το ιοειδές είναι υπεύθυνο για την κατανομή του ποσοστού ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων των ενδιάμεσων μορίων αντιγραφής (Gruner *et al.*, 1995).

1.2. Η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων (PTGS)

Με τον όρο αυτό περιγράφεται η αποδόμηση RNA μορίων που εξαρτάται από ομολογία. Ο μηχανισμός αυτός ανήκει σε μία κατηγορία μηχανισμών σίγησης γονιδίων που γενικά αναφέρονται ως μηχανισμοί γονιδιακής σίγησης μέσω ομολογίας (HDGS, <u>H</u>omology <u>D</u>ependent <u>G</u>ene <u>S</u>ilencing). Εκτός της PTGS, στην κατηγορία αυτή ανήκει και η μεταγραφική σίγηση γονιδίων (TGS, <u>T</u>ranscriptional <u>G</u>ene <u>S</u>ilencing) (Depicker and van Montagu, 1997).

Το φαινόμενο της PTGS παρατηρήθηκε για πρώτη φορά πριν από δέκα χρόνια σε διαγονιδιακά φυτά. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη επιπλέον αντιγράφων ενός γονιδίου υπεύθυνου για το χρώμα των ανθέων της πετούνιας οδηγούσε σε καταστολή της έκφρασης τόσο των επιπλέον γονιδίων όσο και το πυρηνικού γονιδίου. Η καταστολή αυτή συνέβαινε μέσω της αποδόμησης των ώριμων mRNA των γονιδίων αυτών, ενώ η μεταγραφή γινόταν κανονικά Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε συνκαταστολή (co-suppression) (van der Krol *et al.*, 1990[°] ανασκόπηση από Jorgensen, 1990).

Από τη αρχή έγινε αντιληπτό ότι για να υπάρξει αποδόμηση συγκεκριμένων μορίων mRNA θα πρέπει να υπάρχει ένας παράγοντας ειδικός για την αναγνώριση των μεταγράφων που επρόκειτο να αποδομηθούν. Έτσι, θεωρήθηκε ότι τα μετάγραφα αρνητικής πολικότητας (antisense) των mRNAs μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στο φαινόμενο της συνκαταστολής (Grierson *et al.*, 1991).

Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα ήρθε μερικά χρόνια αργότερα όχι από έρευνες πάνω σε διαγονιδιακά φυτά αλλά στο *C. elegans.* Συγκεκριμένα ο Fire και οι συνεργάτες του (1998) παρατήρησαν ότι ένεση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) συγκεκριμένης αλληλουχίας προκαλούσε καταστολή του ομόλογου γονιδίου στο ζώο. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε RNAi (RNA interference) και όπως αποδείχθηκε αργότερα, παρουσιάζει εκπληκτική ομολογία με το αντίστοιχο της συνκαταστολής στα φυτά (Ketting and Plasterk, 2000). Την ίδια περίοδο, βρέθηκε ότι το dsRNA επάγει την PTGS και στα φυτά (Waterhouse *et al.*, 1998)

1.2.1. Κυτταρικοί μηχανισμοί και μοντέλα λειτουργίας

Πριν αναφέρουμε τις επικρατέστερες θεωρίες γύρω από το μηχανισμό της PTGS θα ήταν σκόπιμο να αναφέρουμε τις διαφορές μεταξύ μεταμεταγραφικής και μεταγραφικής σίγησης γονιδίων (TGS).

Οι δύο αυτές λειτουργίες έχουν το ίδιο αποτέλεσμα, την καταστολή της έκφρασης γονιδίων. Όμως, ενώ ο μηχανισμός της PTGS εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, τα φαινόμενα που σχετίζονται με την TGS συμβαίνουν κυρίως στον πυρήνα. Επίσης, τα βιολογικά στοιχεία που πυροδοτούν τους δύο μηχανισμούς είναι διαφορετικά. Σε γενικές γραμμές η PTGS πυροδοτείται από την ύπαρξη RNA μορίων που προέρχονται από RNA ή DNA ιούς ή διαγονίδια που παράγουν θετικά ή αρνητικά μετάγραφα ή και τα δύο. Από την άλλη, η TGS επάγεται από επαναλαμβανόμενων ύπαρξη ενδογενών αλληλουχιών, την επαναλαμβανόμενων (δια)γονιδίων, DNA ιών και εκτρόπων (aberrant) μεταγράφων (Fagard and Vaucheret, 2000a). Στη μεταγραφική σίγηση παρατηρείται απουσία μεταγραφικής δραστηριότητας στον πυρήνα ενώ στη μετα-μεταγραφική η μεταγραφή γίνεται κανονικά αλλά το RNA δε συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε κάποιες περιπτώσεις η TGS σχετίζεται με μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου

ενώ η PTGS με τη μεθυλίωση της κωδικής αλληλουχίας. Τέλος, η TGS είναι μειωτικά και μιτωτικά κληρονομήσιμη ενώ η PTGS είναι μειωτικά αντιστρεπτή (Fagard and Vaucheret, 2000a).

Εκτός από την ανακάλυψη του RNAi στο *C. elegans*, παρόμοια φαινόμενα ανακαλύφθηκαν στη *Drosophila* (Kennerdell and Carthew, 1998) και στο μύκητα *Neurospora crassa* (Cogoni and Macino, 1997). Στους οργανισμούς αυτούς η PTGS ενεργοποιείται με τον ίδιο τρόπο που ενεργοποιείται και στα φυτά και το *C. elegans* και εξελίσσεται στο κυτταρόπλασμα.

Θεωρείται ότι η PTGS έχει διαφορετικούς ρόλους στους οργανισμούς που παρατηρείται. Στο *C. elegans* αποτελεί μηχανισμό ενάντια σε μεταθετά στοιχεία αλλά παράλληλα παίζει ρόλο σε αναπτυξιακές ρυθμίσεις (ανασκόπηση από Adoute, 2000), στα φυτά έχει αμυντικό ρόλο ενάντια σε ιούς, διαγονίδια και μεταθετά στοιχεία ενώ ίσως να παίζει ρόλο και σε αναπτυξιακές διαδικασίες. Στη *Drosophila* ο ρόλος του RNAi δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.

Για τη λειτουργία της PTGS (ή RNAi) έχουν προταθεί μοντέλα που περιλαμβάνουν με κάποιο τρόπο το dsRNA (Εικ.1.2.α και 1.2.β). Τα μοντέλα αυτά αναπτύχθηκαν από μελέτες στη Drosophila και το C. elegans (Sharp, 1999). Ένα από τα μοντέλα προϋποθέτει την ύπαρξη δύο σταδίων κατά την PTGS. Στο πρώτο στάδιο το dsRNA σπάει σε μικρά κομμάτια από τη δράση μιας RNA νουκλεάσης τύπου ΙΙΙ που αναγνωρίζει δίκλωνο RNA (Hammond et al., 2000). Τα κομμάτια έχουν μήκος 21-23 nt και ο antisense κλώνος αλληλεπιδρά με το ομόλογο RNA (Εικ. 2.1.α). Στο δεύτερο στάδιο υπάρχει αλληλεπίδραση του antisense κλώνου με το προς αποδόμηση μόριο στην οποία φαίνεται να λαμβάνει μέρος ένα σύμπλοκο που επάγεται από RNA (RISC, RNA induced silencing complex) (Berstein et al., 2001' аvаоко́плол апо́ Hammond et al., 2001 Baulcombe, 2001). Πράγματι, ο antisense κλώνος του dsRNA είναι ένας πολύ πιθανός υποψήφιος γιατί μετά από αλλαγές της χημικής του δομής παρατηρήθηκαν αντιδράσεις RNAi μειωμένης απόδοσης (Parrish et al., 2000). Στο μοντέλο αυτό φαίνεται ότι το κομμάτιασμα του dsRNA σε μικρά κομμάτια και η αποδόμηση του RNA-στόχου έρχονται

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

σε πέρας από δύο διαφορετικές νουκλεάσες τύπου ΙΙΙ εκ των οποίων η πρώτη, που αναγνωρίστηκε στη *Drosophila* και ονομάστηκε *dicer*, φαίνεται να έχει νουκλεοτιδική ομολογία με γονίδια στο *Arabidopsis* και στο *C. elegans* (Berstein *et al.*, 2001).



Εικόνα 2.1.α. Πιθανό μοντέλο λειτουργίας της PTGS (ή RNAi). 1. Το dsRNA αναγνωρίζεται από μία νουκλεάση τύπου ΙΙΙ (πιθανώς dicer). 2. Το dsRNA κομματιάζεται σε δίκλωνα ή μονόκλωνα μόρια μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων. 3. 4. Δημιουργία του συμπλόκου RISC (RNA induced silencing complex) και σύνδεση του antisense κλώνου του dsRNAπάνω σ'αυτό. 5. Σύνδεση του RNA-στόχου με το δεσμευμένο στο RISC antisense RNA. 6. Αποδόμηση του RNA-στόχου. (Αναπαραγωγή από Hammond et al., 2001)

Στην εικόνα 2.1.α βλέπουμε επίσης ότι υπάρχει ένα στάδιο αντιγραφής των μικρών RNA μορίων. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι μία RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRP) είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή είτε μικρών antisense RNA μορίων από τα αντίστοιχα θετικά ή τα δίκλωνα μόρια, είτε και μικρών dsRNA μορίων (Sänger *et al.*, 1996[•] Waterhouse *et al*, 1998[•] Kooter *et al.*,1999). Την ιδέα αυτή στηρίζουν μελέτες κατά τις οποίες έχουν χαρακτηριστεί RdRP στο Arabidopsis (Dalmay *et al.*, 2000[•] Mourrain *et al.*, 2000) και στη *Neurospora crassa* (Cogoni and Macino, 1999). Παρ'όλα αυτά, παρόμοιο ένζυμο δεν έχει βρεθεί ακόμη στη Drosophila.

Όλα τα δεδομένα δείχνουν ότι το dsRNA παίζει ένα κυρίαρχο ρόλο στο μηχανισμό της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων. Είναι γεγονός ότι ο μηχανισμός είναι συντηρημένος σε φυτά, μύκητες, σκώληκες και έντομα και το dsRNA σε όλους αυτούς τους οργανισμούς πυροδοτεί την PTGS έμμεσα (με αντιγραφή διαγονιδίων ή ιών) ή άμεσα (με ένεση ή τροφή) (Hammond et al., 2001). Η συμμετοχή μίας RNA νουκλεάσης τύπου ΙΙΙ στο μοντέλο είναι όχι μόνο αποδεδειγμένη αλλά και αφού RNAσες τύπου III δικαιολογημένη 01 είναι 01 υόνες χαρακτηρισμένες νουκλεάσες που είναι γνωστό ότι πέπτουν dsRNA σε συγκεκριμένα σημεία για να παράγουν δίκλωνα κομμάτια συγκεκριμένου μήκους. Για να μπορέσει μια RNAση να προσδεθεί σταθερά με δίκλωνο RNA θα πρέπει το τελευταίο να έχει ελάχιστο μήκος δύο πλήρων ελίκων, όσο ακριβώς ένα δίκλωνο κομμάτι RNA μήκους 22 nt (Bass, 2000).



Εικόνα 1.2.β. Γενικό μοντέλο επαγωγής και ρύθμισης της PTGS. Στο σχήμα φαίνεται η σχέση μεταξύ RdRP και RNA νουκλεάσης καθώς και ο πιθανός συσχετισμός PTGS και TGS (RNA feedback και methylation). Αναλύσεις για το σήμα της διασυστηματικής σίγησης και για την PTGS επαγόμενη από ιούς (VIGS) δίνονται στις ομώνυμες παραγράφους. Αναπαραγωγή από Lakshminarayan *et al.*, (2000) *Plant Mol. Biol.*, **43**, 323-346.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όλες οι παραπάνω μελέτες ρίχνουν αρκετό φως στα στάδια έναρξης και διατήρησης της PTGS. Ένα ερώτημα που παραμένει όμως είναι η φυσική προέλευση του dsRNA που προκαλεί την PTGS. Για τα φυτά η απάντηση δεν είναι δύσκολη γιατί δίκλωνο RNA μπορεί να βρεθεί μέσα στο κύτταρο αρχικά με τη μορφή έκτροπου RNA (abRNA, aberrant RNA) (Meins, 2000[•] Fagard and Vaucheret, 2000b) λόγω της αντιγραφής κάποιου ιού (Ratcliff *et al.*, 1997) ή της πρόωρης λήξης της μεταγραφής κάποιου διαγονιδίου. Εξάλλου μελέτες σε διαγονιδιακά φυτά που παράγουν dsRNA έχουν δείξει ότι το dsRNA μπορεί να πυροδοτήσει κληρονομήσιμη PTGS στα φυτά (Chuang and Meyerowitz, 2000). Από την άλλη δε γνωρίζουμε ακόμη πως προκύπτει φυσικά το dsRNA στους μη φυτικούς οργανισμούς.

Ένα άλλο ερώτημα που έχει τεθεί είναι το κατά πόσο είναι απαραίτητο το αρχικό σήμα έναρξης της PTGS (π.χ. ένα διαγονίδιο) μετά την εγκαθίδρυσή της. Φαίνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις το σήμα αυτό δεν είναι απαραίτητο (Palauqui and Vaucheret, 1998).

1.2.2. Μεθυλίωση DNA αλληλουχιών και ο ρόλος της στην PTGS

Η μεθυλίωση ορισμένων αλληλουχιών DNA είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο οι οργανισμοί ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους. Εκτεταμένες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη μεθυλίωση γονιδίων κατά τη διάρκεια HDGS δείχνουν ότι όσον αφορά στην TGS, μεθυλίωση συμβαίνει συνήθως στον υποκινητή του γονιδίου που υπόκειται σε σίγηση. Από την άλλη πλευρά κατά τη διάρκεια της PTGS η μεθυλίωση εντοπίζεται κυρίως στην κωδική αλληλουχία του γονιδίου και συμβαίνει μέσω RNA-DNA αλληλεπιδράσεων (Fagard and Vaucheret, 2000a). Επίσης η μεθυλίωση έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διασυστηματικής PTGS (Jones *et al.*, 1999) (1.2.3). Από την άλλη, η καταστολή της PTGS από τικές πρωτεΐνες δε φαίνεται να αντιστρέφει τη μεθυλίωση της ομόλογης περιοχής του DNA (Marathe *et al.*, 2000). Τα δεδομένα γύρω από τη μεθυλίωση του DNA κατά την PTGS έχουν οδηγήσει τους ερευνητές στην υπόθεση ότι ίσως (και σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα αντιλήψεις) ένα κομμάτι της μετα-μεταγραφικής σίγησης να λαμβάνει χώρα στον πυρήνα (Jones *et al.*, 1999) ή έστω η PTGS και η TGS να έχουν κάποιο κοινό σημείο (Fagart and Vaucheret' 2000' Wassenegger 2000). Πάντως, μελέτες που έχουν γίνει με ιικούς καταστολείς της PTGS δείχνουν ότι η μεθυλίωση του DNA δεν είναι συνέπεια της PTGS (Jones *et al.*, 1999). Από την άλλη, οι Pelissier και Wassenegger (2000) έδειξαν χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά φυτά ότι η μεθυλίωση και η PTGS συνδέονται.

1.2.3. Σήματα διασυστηματικής μετα-μεταγραφικής σίγησης

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά της PTGS είναι ότι μπορεί από την αρχική εστία πυροδότησης να διασκορπίζεται με κάποιο τρόπο σε όλο τον οργανισμό (Voinnet *et al.*, 1998, 2000[•] Palauqui and Vaucheret, 1998[•] ανασκόπηση από Fagard and Vaucheret, 2000).

Η PTGS είναι διαδικασία αποδόμησης RNA μορίων με βάση την ομολογία τους προς το dsRNA που την πυροδοτεί. Με αυτό το σκεπτικό, και το σήμα για τη διασυστηματική διασπορά της PTGS (SSS, <u>Systemic</u> <u>Silencing Signal</u>) θα πρέπει να είναι ένα μόριο που να φέρει την ομολογία αυτή. Για το σκοπό αυτό προτάθηκαν πολλά υποψήφια μόρια που θεωρείται ότι παίρνουν μέρος στην αντίδραση της PTGS όπως: το dsRNA, τα μεγέθους 21-23 nt RNA μόρια, τα έκτρωπα RNA. Δεν είναι ακόμη γνωστό αν το νουκλεοτιδικό σήμα για τη διασυστηματική PTGS συνδέεται με κάποια πρωτεΐνη μεταφοράς. Πάντως έχει προταθεί ότι το σήμα ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή των ιών και των ιοειδών μέσα στον φυτικό οργανισμό. (Voinnet *et al.*, 1998[°] Jones *et al.*, 1999[°] Zhu *et al* 2001).

1.2.4. Σίγηση γονιδίων επαγόμενη από ιούς (VIGS)

Με τον όρο VIGS (Virus Induced Gene Silencing) αναφέρεται η μετα-μεταγραφική σίγηση που προκαλείται από ιούς. Κατά βάση η αρχή

λειτουργίας της VIGS είναι ίδια με αυτή της PTGS. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν υπάρχει ομολογία ιικού και φυτικού γονιδίου για να ξεκινήσει τη διαδικασία αλλά μόνο το dsRNA που παράγεται κατά τη μεταγραφή και τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η περίπτωση επαγωγής της PTGS από ιούς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για δύο λόγους. Πρώτον, διαγονιδιακά φυτά που έφεραν κάποιο ιικό γονίδιο -ή μέρος αυτού- στο γένωμά τους, ήταν ανθεκτικά σε επικείμενη μόλυνση με τον ιό αυτό. Το φαινόμενο αυτό είναι αναμενόμενο από τη στιγμή που το φυτό έχει ήδη ξεκινήσει τη διαδικασία της PTGS εξαιτίας του διαγονιδίου. Η PTGS στην περίπτωση αυτή βρίσκει βιοτεχνολογική εφαρμογή. Επίσης υπάρχουν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι ιοί για τη μελέτη της PTGS γονιδίων που εντέθηκαν με γενετική μηχανική σε φυτά (π.χ. GFP) (Voinnet et al., 1998' Dalmay et al., 2000) Από την άλλη, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν ορισμένες ομάδες ιών που εκφράζουν καταστολείς της PTGS που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της PTGS.

1.2.4.1. Ιικοί Καταστολείς της PTGS

Εάν η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων είναι ένας αντι-ιικός μηχανισμός στα φυτά, τότε θα ήταν αναμενόμενο ότι μερικοί ιοί θα είχαν αναπτύξει κάποια στρατηγική για την αντιμετώπιση της PTGS. Πράγματι υπάρχουν στοιχεία για κάποιους ιούς που εκφράζουν τέτοιους καταστολείς της PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 1998' Kasshau and Carrington, 1998' Brigneti *et al.* 1998). Επιπρόσθετα με την ιδέα ότι η PTGS συνδέεται με μονοπάτια φυσικών μηχανισμών άμυνας των φυτών ενάντια σε ιούς, η ανακάλυψη των καταστολέων της PTGS ανοίγει το δρόμο σε μία καινούρια προσέγγιση στην κατανόηση της γονιδιακής σίγησης στα φυτά.

Ο πρώτος καταστολέας της PTGS που χαρακτηρίστηκε ήταν ο HC-Pro (<u>Helper Component-Proteinase</u>) που υπάρχει στο γένωμα ιών της οικογένειας *Potyviridae* (Riechmann *et al.*, 1992). Από τότε μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί και άλλοι καταστολείς της PTGS όπως η

1.2. Η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων (PTGS)

πρωτεΐνη 2b του ιού της μωσαϊκής του αγγουριού (CMV, <u>C</u>ucumber <u>M</u>osaic <u>V</u>irus) (Brigneti *et al.*, 1998), η πρωτεΐνη P19 του ιού TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus (Voinnet *et al.*, 1999) και η πρωτεΐνη 25k του ιού X της πατάτας (PVX, <u>P</u>otato <u>V</u>irus <u>X</u>) (Voinnet *et al.*, 2000).

Όλες αυτές οι πρωτεΐνες σχετίζονται και με άλλες λειτουργίες στον κύκλο ζωής του ιού όπως η μετακίνηση του ιού μέσω του φλοιώματος και των πλασμοδεσμάτων (στη περίπτωση της HC-Pro, της 2b και της 25k) και η πέψη της πολυπρωτεΐνης- που παράγουν διάφοροι ιοί- σε μικρότερες, λειτουργικές πρωτεΐνες (στην περίπτωση της HC-Pro).

Οι καταστολείς της PTGS αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην έρευνα γύρω από το μηχανισμό αυτό. Η χρήση τους σε συνδυασμό με διαγονιδιακά φυτά μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τα στάδια της PTGS και για τη διασυστηματική διασπορά της καθώς και για τις πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στο μηχανισμό ως λειτουργικά ή και ρυθμιστικά συστατικά.

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ένας φυτικός παράγοντας που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HC-Pro και τα δεδομένα δείχνουν ότι ο παράγοντας αυτός είναι καταστολέας της μετα-μεταγραφικής σίγησης (Anandalakshmi *et al.*, 2000).

Η χρήση των καταστολέων μπορεί να διευρυνθεί και προς το πεδίο της βιοτεχνολογίας. Η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που φέρουν και γονίδια καταστολέων εκτός από τα επιθυμητά γονίδια μπορεί να λύσει το πρόβλημα της συνκαταστολής (1.2) που παρουσιάζεται πολλές φορές κατά τη γενετική τροποποίηση φυτών. Από την άλλη αυτά τα φυτά θα είναι περισσότερο ευαίσθητα και επιδεκτικά σε πιθανή μόλυνση με κάποιον ιό.

Η μελέτη της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων είναι ένα από τα πλέον εξελισσόμενα πεδία έρευνας που απασχολεί πολλά εργαστήρια και εταιρίες βιοτεχνολογίας σε όλο τον κόσμο. Η εξακρίβωση του όλου μηχανισμού θα δώσει πολλές πληροφορίες γύρω από την όλη φυσιολογία των φυτικών οργανισμών και τις σχέσεις με τα παράσιτα τους και η

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

χρήση της ως εργαλείο θα δώσει νέα πνοή στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των φυτών (και όχι μόνο). Προς την κατεύθυνση αυτή, στα πλαίσια της εργασίας αυτής, μελετήθηκε η ικανότητα του ιοειδούς PSTVd να ενεργοποιεί το μηχανισμό της PTGS σε φυτά τομάτας. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις κατά northern για τον εντοπισμό μορίων RNA μήκους 21-23 nt που έχουν ομολογία με το ιοειδές και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της PTGS. Παράλληλα διενεργήθηκαν και βιοχημικές αναλύσεις των μορίων αυτών για την εξακρίβωση των χημικών ομάδων των άκρων τους σε μία προσπάθεια θεώρησης πιθανών ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία παραγωγής και επεξεργασίας των μικρών RNA μορίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Αντιδραστήρια και υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας προήλθαν από τις εξής εταιρίες: BOERINGER MANNHEIM, SIGMA ALDRICH CHEMIE Gmbh, BIORAD LABORATORIES, MERCK KGaA, FERAK LABORAT, BIO 101, QIAGEN.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης νουκλεϊκών οξέων προήλθαν από τις εταιρίες: MINOTECH, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES, STRATAGENE, PROMEGA, HT BIOTECHNOLOGY LTD, NEW ENGLAND BIOLABS (NEB).

Τα ολιγονουκλεοτίδια παραγγέλθηκαν και συντέθηκαν στην εταιρία MWG-Biotech GmbH (Γερμανία).

Ta [α-³²P]UTP και [γ-³²P]ATP αγοράσθηκαν από την Amersham Life Science Ltd.

Οι nylon μεμβράνες αγοράστηκαν από την εταιρία SCHLEICHER & SCHUELL.

Τα φιλμ αυτοραδιογραφίας είναι της Kodak.

2.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς και στελέχη βακτηρίων

Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις το DH5α [*SupE*44 Δ*lac*U169 (*φ*80 *lacZ*ΔM15) *hsd*R17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1]. Το στέλεχος αυτό είναι ανίκανο ανασυνδυασμού και χρησιμοποιείται για επίστρωση σε τριβλία Petri και ανάπτυξη πλασμιδίων και κοσμιδίων. Το φ80 *lacZ*ΔM15 επιτρέπει *α*συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης των pUC φορέων. (Hanahan 1983, Bethesda Research Laboratories 1986). Για τις μολύνσεις φυτών τομάτας με το PSTVd, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη του ιοειδούς:

Το στέλεχος KF440-2 του ιοειδούς PSTVd που κλωνοποιήθηκε στο φορέα pHa106 (Κωδικός πρόσβασης στη βάση δεδομένων Genbank X58388, Schnölzer *et al.* 1985, Tsagris *et al.* 1991), ενώ το «αριστερό» και «δεξιό» μέρος του PSTVd – που διαχωρίζονται από μία περιοριστική θέση αναγνώρισης *Ava* I - κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pBluescript KS (+) [A. E. Martinez de Alba. (2001) PhD. Thesis, Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spain] και στη περιοριστική θέση αναγνώρισης *Sma* I (pBKS190 και pBKS170).

Το στέλεχος RG1 του ιοειδούς PSTVd (Κωδικός πρόσβασης στη βάση



Εικόνα 2.1. α. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pART 7. το λευκό κουτί υποδεικνύει το κομμάτι του φορέα που εντίθεται στο φορέα pART 27. β. Η θέση πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης. Υπογραμμισμένα φαίνονται τα στοιχεία CAAT και TATA του υποκινητή 35S του CaMV

δεδομένων Genbank U23058, Gruner et al. 1995).

Το στέλεχος KF5 (Κωδικός πρόσβασης στη βάση δεδομένων Genbank S54933, Lakshman and Tavantzis, 1993).

Ο πλασμιδιακός φορέας ΡΤ3Τ7 (παλαιότερα διαθέσιμος από την Boehringer Mannheim) χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την κατασκευή του μεταγραφικού μάρτυρα μεγέθους (βλ. 2.1.3).

Ο πλασμιδιακός φορέας pART7 (Εικ. 2.1.α) έχει μέγεθος 4.9 Kb και περιέχει μεταξύ δύο περιοριστικών θέσεων NotI, τον υποκινητή 35S του ιού της μωσαϊκής του κουνουπιδιού (CaMV) και μια περιοχή πολλαπλών περιοριστικών θέσεων (multiple cloning site). Χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση του Helper Component (HP) του ιού PPV (βλ. Αποτελέσματα § 3.6)

2.1.3. Μάρτυρες μεγέθους

Κατά την ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μεγέθους DNA και RNA ολιγονουκλεοτίδια ραδιοσημασμένα με [γ-³²P]ATP (βλ. και 2.2.1.8.3):

Πίνακας 2.1.α. Κωδική ονομασία, μέγεθος, τύπος και αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μεγέθους σε ηλεκτροφορήσεις πηκτής πολυακρυλαμίδης. Οι αλληλουχίες που φαίνονται στον πίνακα δεν έχουν καμία ομολογία με το ιοειδές.

Κωδικός	Μέγεθος	Τύπος	Αλληλουχία (5-3)		
	(nt)				
RNA-REC	18	RNA	UGAGCGAACUCUCCCGAU		
SEL-REC	18	DNA	TGAGCGAACTCTCCCGAT		
LOW33	20	DNA	TATTATAATGATCTAAGT		
K331A	23	DNA	GGGGTAGGTGCGGGTTTCTTCAC		
K328A	25	DNA	AGGTTTGGGTTTCGCCACTCTCTCG		
W318Abis	27	DNA	AGGTATGTGATTCGCAGAACTCCCCTG		
SEL-SP2	33	DNA	TAATACGACTCAGTATAGGGAGAATTCGCTCAC		
2S-RNA-	36	RNA	GACAAAUACUGGGACAGCUACAACCAUCCCUUCAG		
REC			A		

Επίσης ως μάρτυρας μεγέθους χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων που προήλθε από *in vitro* μεταγραφή του πλασμιδίου

pT3T7lac μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού Aval και Sal I (βλ. και 2.2.1.8.1). Μεταγραφή του ευθύγραμμου πλασμιδίου με T₇ RNA πολυμεράση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταγράφων μεγέθους 25 και 39 νουκλεοτιδίων αντίστοιχα.

2.1.4. Φυτικό υλικό

Για τη μόλυνση με τα στελέχη του ιοειδούς PSTVd χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας (Lycopersicum esculentum cv. Rentita) και φυτά καπνού (Nicotiana benthamiana). Τα φυτά αυτά αναπτύχθηκαν στο χώρο του θερμοκηπίου.

2.1.5. Κυριότερα διαλύματα και θρεπτικά μέσα

Στην παράγραφο αυτή παρατίθενται οι συστάσεις διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Διαλύματα και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε ειδικές διαδικασίες παρατίθενται στην αντίστοιχη παράγραφο που τις περιγράφει.

Θρεπτικό μέσο Luria-Bertany (LB broth) 1% κ.β Tryptone 0.5% κ.β Yeast extract 1% κ.β NaCl (Ρύθμιση του pH στο 7.5 με τη χρήση NaOH) <u>Ρυθμιστικό διάλυμ</u>α ΤΒΕ (5X) 0.45 M Tris 0.45 M Βορικό οξύ 10 mM EDTA (pH 8.0) Ρυθμιστικό διάλυμα ΤΕ (100Χ) 1 M Tris-Cl (pH 8.0) 100 mM EDTA (pH 8.0) Ρυθμιστικό διάλυμα STET (1X) 0.1 M NaCl 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0) 5% Triton X-100

<u>Ρυθμιστικό διάλυμα TEMS</u> 100 mM Tris-Cl (pH 7.5) 100 mM NaCl 10 mM EDTA <u>Ρυθμιστικό διάλυμα SSC (20X)</u> 3 M NaCl 0.3 M Sodium citrate (ρύθμιση του pH στο 7.0 με χρήση NaOH) <u>Διάλυμα φαινόλης</u> 1 Kg φαινόλης 250 ml CHCl₃ 1 g 8-Hydroxychinolin 300 ml TEMS. (Το διάλυμα αναδεύεται ολονυκτίως και φυλάσσεται στους 4^oC).

2.1.6. Όργανα και συσκευές

Καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

Φυγόκεντροι

5417R, Eppendorf 5410 , Eppendorf 5415C, Eppendorf Biofuge 15R, Heraeus Sepatech 5800, Kubota 3K2, Sigma Επωαστήρες B15, Heraeus Orbital Shaker, Forma Scientific Υδατόλουτρα MS, Lauda RMS, Lauda Θάλαμοι Υβριδοποίησης Maxi 14, Hybaid Maxi Hybridization Oven, Hybaid Model 1004, Shel lab Μετρητής Σπινθηρισμού LS1701, Beckman Μετρητής Ραδιενέργειας Τύπου Geiger-Müller Series 900 Minimonitor, Mini-Instruments Ltd. Δονητικός Αναδευτήρας (Vortex Stirrer) VF2, Janke & Kunkel Ξηραντήρας κενού πηκτών Model 583 Gel Dryer, Biorad Μετασχηματιστές ρεύματος για ηλεκτροφορήσεις 2002, LKB Broma E734, Consort E752, Consort E702, Consort Αντλία κενού και θάλαμος κενού (αντίστοιχα) Unijet II refrigerated aspirator, UniEquip Univapo 100H, UniEquip Σαρωτήρας εικόνων (Scanner) GT-9000, Epson Απεικονιστήρας φωσφορισμού Phosphorimager[™], Molecular Dynamics Inc. Οθόνη Διαπέρασης Υπεριώδους Φωτός (UV-Transilluminator) UVT-28MP, Herolab Μηχανή εμφάνισης φιλμ αυτοραδιογραφίας Curix 60, Agfa-Gevaert Φασματοφωτόμετρο GeneQuant RNA/DNA calculator, Pharmacia

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Μέθοδοι απομόνωσης, παραγωγής, τροποποίησης και σήμανσης νουκλεϊκών οξέων.

2.2.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια Ε. Coli

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μπορεί να είναι μικρής ή μεγάλης κλίμακας. Στην απομόνωση μικρής κλίμακας (mini preparation) χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο βρασμού. Κατά τη μέθοδο αυτή, 1.5 ml καλλιέργειας βακτηρίων που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο φυγοκεντρούνται στις 3000 στροφές/min (rpm) για ένα λεπτό και στη συνέχεια ίζημα (που είναι τα ανέπαφα βακτήρια) το επαναδιαλυτοποιείται σε 0.7 ml STET και προστίθενται 50 μl λυσοζύμης (αρχικής συγκέντρωσης 10mg/ml). Ακολουθεί βρασμός για 1 min και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 min. Το ίζημα που αποτελείται από υπολείμματα κυττάρων απομακρύνεται, ενώ στο υπερκείμενο, που περιέχει το πλασμιδιακό DNA, προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το DNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρηση στους 4°C στις 14000 rpm για 30 min.

Για τη μεγάλης κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ιοντικής ανταλλαγής με στήλες διαχωρισμού Qiagen. Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρίας (Qiagen plasmid purification handbook 11/98).

2.2.1.2. Μετασχηματισμός βακτηρίων Ε. coli με πλασμιδιακό DNA.

Για την επιλογή των κατάλληλων πλασμιδίων αλλά και για τη παραγωγή τους σε ικανοποιητικές ποσότητες χρησιμοποιούμε την τεχνική του μετασχηματισμού βακτηρίων. Για να μπορέσουν τα βακτήρια να αφομοιώσουν το πλασμίδιο θα πρέπει πρώτα να καθιστούν «ικανά» (competent) προς μετασχηματισμό. Για τη μετατροπή τους σε ικανά, τα βακτήρια καλλιεργούνται στους 37°C σε καλλιέργεια των 200ml σε κωνική των 2000ml, με επαρκή αερισμό, μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.4 (600nm). Ακολουθεί κατανομή της καλλιέργειας σε σωληνάρια των 50 ml (τύπου Falcon) φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 15 min. στους 4°C, επαναιώρηση και επώαση για 45 min. στους 4°C, σε 16,6 ml διαλύματος RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM CH₃COOK, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 15% κ.β γλυκερόλη, pH 5.8) για κάθε σωληνάριο. Στη συνέχεια τα βακτήρια επαναφυγοκεντρούνται όπως παραπάνω και επαναιωρούνται σε 4ml διαλύματος RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη κ.β, pH 7.0). Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται αμέσως ή αποθηκεύονται στους -80°C σε κλάσματα των 100 και 200μl.

Για το μετασχηματισμό των βακτηρίων με το πλασμίδιο εφαρμόζεται η τεχνική του θερμικού shock (heat shock). Σε καλλιέργεια ικανών βακτηρίων 100 μl προστίθενται 1-2 ng του πλασμιδίου και το μείγμα επωάζεται στους 4°C (πάγος) για 20 min. Κατόπιν το μείγμα μεταφέρεται στους 42°C για 90 sec και στη συνέχεια πάλι στον πάγο για 2 min. Στη συνέχεια στο μείγμα προστίθενται 400 μl θρεπτικού μέσου LB και ακολουθεί επώαση για 1 h περίπου στους 37°C. Κατόπιν το μείγμα απλώνεται σε τριβλία petri που περιέχουν στερεό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που υπάρχει στο πλασμίδιο. Τα επιστρωμένα τριβλία επωάζονται στους 37°C για 16 h περίπου και στη συνέχεια επιλέγονται αποικίες από το τριβλίο και ενοφθαλμίζονται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB στο οποίο έχουμε προσθέσει το αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επωάζεται για 16 h περίπου (ολονυκτίως) και στη συνέχεια ακολουθείται κάποιο από τα πρωτόκολλα απομόνωσης DNA όπως αυτά περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.1.1.

2.2.1.3. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες πλασμιδιακές κατασκευές αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο «Αποτελέσματα». Οι περιοστικές πέψεις έγιναν σύμφωνα με τις συστάσεις και τα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρίας και βάση τις βέλτιστες συνθήκες στις οποίες το κάθε ένζυμο λειτουργεί (μοριακότητα και σύσταση αλάτων στο ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωση ενζύμου, θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση υποστρώματος).

2.2.1.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση, απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Η ανάλυση τμημάτων DNA έγινε με βάση τις ηλεκτροφορητικές τους ιδιότητες σε πήκτωμα αγαρόζης, κατάλληλης για την κάθε περίπτωση πυκνότητας (0.5-1.5%). Για την απομόνωση και τον καθαρισμό μορίων DNA που είχαν διαχωριστεί σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος δέσμευσης του DNA σε σφαιρίδια σιλικόνης μέσω χαοτροπικής συγκέντρωσης αλάτων όπως αυτή περιγράφεται στο εγχειρίδιο GENECLEAN III της εταιρίας BIO 101.

2.2.1.5. Διαδικασίες υποκλωνοποίησης επιλεγμένων ενθεμάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Τα κομμάτια που απομονώνονται από την πηκτή αγαρόζης ενσωματώνονται κατόπιν στο πλασμίδιο μέσω μιας αντίδρασης σύνδεσης. Για να γίνει εφικτή η σύνδεση θα πρέπει τα κομμάτια DNA να έχουν συμβατά άκρα που παράγονται από κατάλληλα επιλεγμένα ένζυμα περιορισμού (άκρα «τυφλά» ή με προεξέχον το 5' ή 3' άκρο). Στην περίπτωση που τέτοια επιλογή δεν είναι εφικτή χρησιμοποιούμε τη μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης Ι της E. coli (Klenow fragment). Κατά την αντίδραση αυτή, το κλάσμα Klenow της πολυμεράσης, παρουσία δεοξυριβονουκλεοτιδίων, με την $5' \rightarrow 3'$ πολυμεριστική του δράση γεμίζει τα 3'-υπολειπόμενα κομμάτια DNA, ενώ απουσία δεοξυριβονουκλεοτιδίων, με την 3'→5' εξωνουκλεοτιδική του δράση αφαιρεί νουκλεοτίδια από τα 3'-προεξέχοντα κομμάτια DNA δημιουργώντας έτσι «τυφλά» άκρα τα οποία μπορούν να συνδεθούν με «τυφλά» άκρα άλλων κομματιών DNA. Η συνήθης αντίδραση

περιλαμβάνει ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.0 και περιεκτικότητα σε MgCl₂ 10mM, 5μg DNA, 0.1mM δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και 150 u/ml ενζύμου. Το μείγμα επωάζεται στους 25°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70°C για 25 λεπτά.

Αυτίδραση σύνδεσης (Ligation)

Στις αντιδράσεις σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T₄ λιγάση (T₄ ligase). Στις συνήθεις αντιδράσεις σύνδεσης ο φορέας και το ένθεμα βρίσκονται σε μοριακή αναλογία 1:1 ή 1:2 ανάλογα με το σχετικό μέγεθος του ενθέματος/φορέα και τη φύση των άκρων του ενθέματος και του φορέα. Η αντίδραση σύνδεσης γίνεται συνήθως σε τελικό όγκο 10 μl με κατάλληλη μοριακότητα, 1 mM ATP και ποσό συνολικού DNA που δεν ξεπερνά τα 100 ng. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 16°C για 16 h περίπου και η ποσότητα της λιγάσης που χρησιμοποιείται είναι 50 μονάδες Weiss . Στην περίπτωση που τα άκρα είναι τυφλά η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 4°C για 16 h περίπου.

2.2.1.6. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικό υλικό

Για την απομόνωση ολικού RNA από φυτικούς ιστούς, 1-2 g φυτικού υλικού κονιορτοποιούνται σε γουδί με υγρό άζωτο και στη συνέχεια η σκόνη εναιωρείται σε 7 ml διαλύματος TEMS στα οποία προστέθηκαν 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλης ακριβώς πριν τη χρήση. Αμέσως μετά προστίθενται 10 ml φαινόλης και το μείγμα αναδεύεται ισχυρά και φυγοκεντρήται στις 3500 rpm για 30 min. Κατόπιν η υδατική φάση εκχυλίζεται δύο φαινόλη άλλες φορές μία με και με χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24/1 κ.ο) και σε κάθε περίπτωση φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια ακολουθεί ακολουθεί ένα στάδιο κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 2.5 όγκων αιθανόλης και οξικού νατρίου (pH 5.6) ως τελική συγκέντρωση 200 mM και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 45 min στους 4°C. Κατόπιν το ίζημα πλένεται με 70% και ξεραίνεται στον αέρα.

2.2.1.7. Εκχύλιση κομματιών RNA πολύ μικρού μεγέθους

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από φυτικό ιστό, ακολουθεί εκχύλισή του με διάλυμα LiCl υψηλής συγκέντρωσης έτσι ώστε να εμπλουτιστεί το δείγμα RNA σε κομμάτια πολύ μικρού μεγέθους (βλ. *Αποτελέσματα* § 3.3).

2.2.1.8. Ραδιοσήμανση και τροποποίηση νουκλεϊνικών οξέων

Κάποιες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν και ως διαγνωστικά εργαλεία. Αυτή η χρήση των μεθόδων θα παρατεθεί στο κεφάλαιο Αποτελέσματα (3.4).

<u>2.2.1.8.1. in vitro μεταγραφή</u>

Είναι η μέθοδος με την οποία παράγουμε RNA από μία DNA μήτρα κλωνοποιημένη σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που έχει υποκινητές μεταγραφής. Μέχρι στιγμής υπάρχουν σε φορείς του εμπορίου τρεις διαφορετικοί υποκινητές που αναγνωρίζονται από τρεις διαφορετικές DNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες. Αυτές είναι οι T₃, T₇ και SP6 που αναγνωρίζουν τους αντίστοιχα ομώνυμους υποκινητές.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις: α) Στη δημιουργία ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή για ανάλυση κατά northern (βλ. Πιν.2.2.α) και β) στη δημιουργία μεταγράφων ιοειδούς για μόλυνση σε φυτά (βλ. Πιν. 2.2.β).

Στην πρώτη περίπτωση ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 μl και χρησιμοποιούμε 1-2 μg ευθύγραμμου DNA (μήτρα), ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής (transcription buffer) [40 mM Tris-Cl (pH 8.0), 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mg/ml BSA], μείγμα μη ραδιενεργών ριβονουκλεοτιδίων (1 mM για καθένα από τα ATP, CTP, GTP και 10 μm UTP), 10 units αναστολέα RNAσών, [α-³²P]UTP (40 mCi/ml) 0.02 mCi/αντίδραση και 50 units κατάλληλης πολυμεράσης. Η αντίδραση εξελίσσεται για 2 h στους 37°C και στη συνέχεια σταματούμε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl H₂O και εκχυλίζοντας με φαινόλη. Στη

συνέχεια τα ραδιοσημασμένα μετάγραφα απομονώνονται με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας διήθησης (βλ. 2.2.1.8.2).

Για την παραγωγή μεταγράφων που θα χρησιμοποιηθούν σε μολύνσεις φυτών, η *in vitro* μεταγραφή πραγματοποιείται ως εξής: Σε 100 μl τελικού όγκου αντίδρασης περιέχονται περίπου 10 μg DNA μήτρας, ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής (transcription buffer) ίδιας συγκέντρωσης με την πρώτη περίπτωση μείγμα ριβονουκλεοτιδίων [500 μΜ για καθένα από τα ATP, CTP, GTP και 150μΜ για το UTP (το μείγμα των ριβονουκλεοτιδίων θα μπορούσε να έχει και τα 4 νουκλεοτίδια με την ίδια συγκέντρωση)], 30 units αναστολέα RNAσων και 150 units κατάλληλης πολυμεράσης (T7, T3 ή SP6 ανάλογα με την περίπτωση. Αφήνουμε την αντίδραση για 2 h στους 37°C. Στη συνέχεια σταματούμε την αντίδραση εκχυλίζοντας το μείγμα της αντίδρασης δύο φορές με φαινόλη και μία με χλωροφόρμιο. Κατόπιν 1-2 μl του μείγματος της αντίδρασης αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης 1.5 % κ.β για την ποσοτικοποίηση του προϊόντος.

Πίνακας 2.2.α. Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες για την παρασκευή ραδιενεργών RNA ανιχνευτών σε αναλύσεις κατά Northern. Επίσης φαίνεται το είδος υποκινητή, το μέγεθος του μεταγράφου, η πολικότητα του μεταγράφου και οι περιοριστικές θέσεις ευθυγράμμισης των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την *in vitro* μεταγραφή * A. E. Martinez de Alba (2001) PhD. thesis, Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spain. ** Tsagris *et al.* 1991

Κατασκευή	Υποκινητής	Μέγεθος μεταγράφου	Πολικότητα	Περιοριστικές θέσεις	Θέση στο ιοειδές
pBKS190 *	T_7	196 nt	(-)	EcoR I	δεξί
pBKS190 *	T_3	190 nt	(+)	Xba I	δεξί
pBKS170 *	T ₇	171 nt	(-)	EcoR I	Αριστερό
pBKS170 *	T ₃	170 nt	(+)	Xba I	Αριστερό
pHa106 **	T_7	~ 380 nt	(-)	Hind III	Πλήρες μόριο

2.2.1.8.2. Καθαρισμός και απομόνωση ραδιενεργά σημασμένων μεταγράφων)

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, ο καθαρισμός και η απομόνωση των ραδιενεργών μεταγράφων γίνεται με χρωματογραφία διήθησης. Η κατασκευή της κολώνας γίνεται με πακετάρισμα πορωδών σφαιριδίων αγαρόζης (Bio-gel® A-0.5 Gel, BIO-RAD) σε μία πιπέτα Pasteur της οποίας το στενό άκρο είναι φραγμένο με υαλόνημα. Στην άκρη του φραγμένου άκρου έχουμε προσαρμόσει ένα σωληνάριο 1.5 ml τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια η κολώνα εξισορροπείται με 500-600 μl 1Χ ΤΕ και το δείγμα φορτώνεται στην κολώνα και περνάει μέσα σ'αυτή. Κατόπιν στην κολώνα προστίθενται άλλα 500 μl 1Χ ΤΕ σε δόσεις των 100 μί και στη συνέχεια μεταφέρουμε την κολώνα σε άλλο σωληνάριο και εκλούουμε το δείγμα με 100 μl 1Χ ΤΕ κάθε φορά. Με τον τρόπο αυτό συλλέγουμε 10 κλάσματα των 100 μl. Το ραδιενεργό μετάγραφο εντοπίζεται κυρίως στα κλάσματα 3-8 όπως μπορεί να διαπιστωθεί με ένα μετρητή Geiger ενώ στα κλάσματα 9 και 10 βρίσκονται μικρότερα ατελή μετάγραφα και ελεύθερα νουκλεοτίδια. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται γιατί τα μόρια περνούν από το υπόστρωμα της κολώνας με τη βοήθεια της βαρύτητας και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια και τα μικρά σε μέγεθος μετάγραφα περνούν μέσα από τους πόρους των σφαιριδίων του υποστρώματος ενώ τα μεγάλα μόρια από έξω. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια την καθυστέρηση των μικρών μορίων και των ελεύθερων νουκλεοτιδίων τα οποία βγαίνουν από την κολώνα αργότερα σε σχέση με τα μεγάλα μετάγραφα.
Πίνακας 2.2.β. Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες για την παρασκευή μεταγράφων που χρησιμοποιήθηκαν σε μολύνσεις φυτών. Επίσης φαίνεται το είδος του υποκινητή, το μέγεθος του μεταγράφου, το στέλεχος του ιοειδούς και οι περιοριστικές θέσεις ευθυγράμμισης των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την *in vitro* μεταγραφή. Όλα τα μετάγραφα έχουν θετική πολικότητα .* Tsagris *et al.* 1991. ** Dr. Gerhard Steger, University of Düsseldorf, (προσωπική επικοινωνία).

Κατασκευή	Υποκινητής	Μέγεθος	Στέλεχος	Περιοριστικές	
		μεταγράφου	ιοειδούς	θέσεις	
pHa106 *	SP6	~ 380 nt	KF440-2	EcoR I	
pBE789 **	T ₇	~ 760 nt (διμερές)	KF5M5	EcoRI	
pBE787 **	T ₇	~ 760 nt (διμερές)	RG1	EcoRI	

<u>2.2.1.8.3. Σήμανση RNA ολιγονουκλεοτιδίων στο 5' άκρο</u>

Το ένζυμο Τ₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση (Τ₄ PNK) έχει την ιδιότητα να μεταφέρει τη γ-φωσφορική ομάδα του ΑΤΡ στο 5' άκρο μονοφωσφορικών μονονουκλεοτιδίων, .μονόκλωνων και δίκλωνων DNA και RNA μορίων.

Ανάλογα με την ομάδα που βρίσκεται στο 5' άκρο του μορίου που πρόκειται να σημανθεί, διακρίνουμε την αντίδραση μεταφοράς σε ευθεία (forward) - όταν στο 5' άκρο υπάρχει υδροξυλική ομάδα - και σε αντίδραση αυταλλαγής (exchange) όταν στο 5' άκρο βρίσκεται φωσφορική ομάδα.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση εφαρμόστηκε η ευθεία αντίδραση για τη σήμανση συνθετικών, μονόκλωνων RNA και DNA ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες μεγέθους σε αναλύσεις κατά northern (βλ. και 2.1.3).

Κατά την αντίδραση αυτή 10 nmole RNA ή DNA υποστρώματος αντιδρούν με 100 nmole [γ-³²P]ATP στους 37°C για 1 h παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος PNK [70 mM Tris-Cl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5mM DDT] και 10 μονάδων ενζύμου.

2.2.1.8.4. Σήμανση RNA ολιγονουκλεοτιδίων στο 3'άκρο

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν αυτή της σύνδεσης ενός ραδιενεργά σημασμένου νουκλεοτιδίου στο 3' υδροξυλικό άκρο των RNA ολιγονουκλεοτιδίων με τη βοήθεια του ενζύμου T4 RNA ligase (Kinoshita et al., 1997' Romaniuk and Ulenbeck 1983' Wang and Ruffner, 1998' Zhang and Chiang, 1996).

Για το σκοπό αυτό, το 5' άκρο των 3' μονοφωσφονουκλεοτιδίων 3-Ρ-AMP 3-P-CTP σημάνθηκε με ραδιενεργό οσοόρο και (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.8.3) μετατρέποντάς τα σε 5',3', διφωσφονουκλεοτίδια (pAp και pCp αντίστοιχα) και στη συνέχεια, με τη βοήθεια του ενζύμου T₄ RNA λιγάση, ένα από τα παραπάνω σημασμένα 5'-[³²P]pCp ή 5'-[³²P]pAp συνδέθηκε στο 3' υδροξυλικό άκρο RNA ολιγονουκλεοτιδίων. Η χρήση 5',3', διφωσφορικών μονονουκλεοτιδίων προτιμάται σε σχέση τη χρήση 5', μονοφωσφορικών με μονονουκλεοτιδίων γιατί στην πρώτη περίπτωση, η RNA λιγάση συνδέει μόνο ένα μονονουκλεοτίδιο στη αλυσίδα ενώ στη δεύτερη περίπτωση, το υδροξύλιο που βρίσκεται στο 3' άκρο του μονονουκλεοτιδίου επιτρέπει τη σύνδεση και άλλων νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα τη συνεχή προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο της αλυσίδας. Η αντίδραση αυτή γίνεται αρχικά στους 37°C για 2 h και στη συνέχεια στους 16°C για 16 h περίπου (ολονυκτίως). Το μείγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει 5-10 μg RNA, 100 nmole pAp ή pCp, ρυθμιστικό διάλυμα T₄ RNA λιγάσης [Τελική συγκέντρωση κατά την αντίδραση: 50 mM Tris-Cl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoethanol, 1 mM ATP) 10 % κ.ο DMSO και 10 Units T₄ RNA λιγάσης. Η απόδοση της αντίδρασης εκτιμάται με ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Μία ανεπιθύμητη ενέργεια της αντίδρασης αυτής είναι ότι η RNA λιγάση επιτρέπει τη σύνδεση RNA ολιγονουκλεοτιδίων μεταξύ τους. Τέτοια σύνδεση όντως συμβαίνει αλλά λόγω της κινητικής των μορίων (τα μονονουκλεοτίδια συνδέονται ευκολότερα με το ενεργό κέντρο της λιγάσης) και της σαφώς υψηλότερης συγκέντρωσης pNp στο μείγμα της αντίδρασης, η RNA λιγάση φαίνεται να προτιμάει τη σύνδεση RNA ολιγονουκλεοτιδίων με μονονουκλεοτίδια.

2.2.1.8.5. Απομάκρυνση της 5'φωσφορικής ομάδας από RNA νουκλεοτίδια

Η αντίδραση που περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.1.8.3 προϋποθέτει την ύπαρξη υδροξυλικής ομάδας στο 5' άκρο των RNA και DNA ολιγονουκλεοτιδίων. Στην περίπτωση που στο άκρο αυτό υπάρχει φωσφορική ομάδα αυτή απομακρύνεται με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης [Calf Intestinal Phosphatase (CIP)].

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ένζυμο που απομακρύνει φωσφορικές ομάδες από το 5' και 3' άκρο RNA και DNA μορίων (μονόκλωνων και δίκλωνων) καθώς κι από τριφωσφορικά δεοξυ- και ριβο- νουκλεοτίδια.

Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στους 37°C για 30 min και το μείγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει 5-10 μg RNA, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφατάσης [100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT).

Η φωσφατάση είναι ένα σχετικά ανθεκτικό ένζυμο και ίχνη της που παραμένουν στο μείγμα μετά την αντίδραση μπορεί να επηρεάσουν περαιτέρω αντιδράσεις όπως αντίδραση κινάσης ή σύνδεσης μορίων. Για το λόγο αυτό, η φωσφατάση πρέπει να απομακρυνθεί εντελώς από το μείγμα με τον ακόλουθο τρόπο: Αρχικά η φωσφατάση απενεργοποιείται με θέρμανση του μείγματος στους 75°C για 20 min και στη συνέχεια (και αφού κρυώσει το μείγμα) προσθέτουμε SDS και EDTA σε τελικές συγκεντρώσεις 0.5 % κ.ο και 5 mM αντίστοιχα αναμειγνύουμε καλά και προσθέτουμε πρωτεϊνάση K (proteinase K) μέχρι τελικής συγκέντρωσης 100 μg/ml και το μείγμα επωάζεται στους 56°C για 30 min. (Sambrook *et al.* 1989, p. 1.61). Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εκχύλιση του RNA με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

2.2.1.8.6. Επίδραση HCl σε RNA ολιγουουκλεοτίδια

Το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου αυτής περιγράφεται στο κεφάλαιο Αποτελέσματα (3.4.2). Εδώ αναφέρεται μόνο η μέθοδος.

Σε τελικό όγκο 100 μl που περιέχει 5-10 μl RNA προστίθενται 10 μl διαλύματος HCl 1 N και το μείγμα επωάζεται για 5 min. στους 37°C. Κατόπιν το μείγμα εξουδετερώνεται με την προσθήκη 10 μl οξικού νατρίου 3 M (pH 5.0) και 9 μl NaOH 1 N (Tsagris *et al.*, 1991).

2.2.2. Μολύνσεις φυτών με συνθετικά μετάγραφα PSTVd και με εκχυλίσματα μολυσμένων με PSTVd φυτών.

Τα μετάγραφα που προέκυψαν από την *in vitro* μεταγραφή του PSTVd (βλ. 2.2.1.8.1-2 και Πιν. 2.2.β) χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση φυτών τοματιάς και *Nicotiana benthamiana*.

Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν φυτά και των δύο ειδών που βρισκόντουσαν στο στάδιο του τέταρτου φύλλου. Στην πάνω επιφάνεια του φύλλου τοποθετήθηκε carborundum (σκόνη άνθρακα-πυριτίου) για να υποβοηθήσει τη δημιουργία πληγών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 50 μl μείγματος που περιείχε μετάγραφα PSTVd σε ρυθμιστικό διάλυμα 1% K₂HPO₄. Ακολούθησε ελαφρά τριβή του φύλλου με τα δάχτυλα για 30 sec. περίπου και μετά από 5-10 min. πλύσιμο του φύλλου με νερό για να ξεπλυθεί το carborundum.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στις μολύνσεις με εκχυλίσματα μολυσμένων φυτών με τη διαφορά ότι τα μολυσμένα φύλλα λειοτριβούνται σε γουδί που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και στη συνέχεια το μείγμα χρησιμοποιείται για τις μολύνσεις όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.2.3. Ανάλυση κατά northern

2.2.3.1. Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης

Τα δείγματα RNA από τα μολυσμένα φυτά αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης. Το μείγμα της πηκτής περιείχε (σε τελικό όγκο 60 ml): 12 % κ.β ακρυλαμίδη (11.4 % acrylamide και 0.6 % bis-acrylamide), 8 M Urea, 0.5 X TBE, 250 μl APS (από αρχικό διάλυμα 10 % κ.β) και 50 μl TEMED.

Τα δείγματα RNA προετοιμάστηκαν για την ανάλυση με τον εξής τρόπο: Διάλυμα RNA αναμείχθηκε με ίσο όγκο αποδιατακτικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (loading buffer) [95 % κ.ο φορμαμίδη, 1mM EDTA (pH 7.0), 0.1 % κ.ο κυανού της βρωμοφαινόλης και 0.1 % κ.ο κυανού του ξυλένιου]. Κατόπιν το μείγμα θερμάνθηκε σε θερμοκρασία βρασμού για 5 min. και στη συνέχεια φορτώθηκε στην πηκτή η οποία είχε προθερμανθεί μέσω ηλεκτρικού πεδίου για 45 min. περίπου. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο τάσης 800 Volt και έντασης 45 mA ενώ η θερμοκρασία της πηκτής ήταν καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης 56-58 °C.

Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν από την πηκτή σε ουδέτερη nylon μεμβράνη (Nytran[®]N, Schleicher & Schuell). Η μεταφορά έλαβε χώρα στους 4°C σε ηλεκτρικό πεδίο τάσης 10 Volt και έντασης 40 mA για 16 h περίπου (ολονυκτίως).

Στη συνέχεια το RNA δεσμεύτηκε στη μεμβράνη με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός έντασης 120 mJoules.

2.2.3.2. Υβριδοποίηση

Για την υβριδοποίηση με ανιχνευτές τα μετάγραφα του ιοειδούς (Πιν. 2.2.α), η μεμβράνη προϋβριδοποιήθηκε για 2 h σε θερμοκρασία 58°C σε διάλυμα που περιείχε 5 X SSC, 1 % SDS, 1 X διάλυμα Denhardt's [από αρχικό διάλυμα 50 X που περιέχει: 10 % κ.β φικόλη, 10 % κ.β BSA (Fraction V) και 10 % κ.β polyvilynpyrrolidone] και 0.25 mg/ml tRNA.

Κατόπιν η υβριδοποίηση έλαβε χώρα στο ίδιο διάλυμα για 16 h με την προσθήκη συνολικά 5x10⁵ cpm/ml ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή (βλ. 2.2.1.8.1, Πιν. 2.2.α).

Για την υβριδοποίηση με ανιχνευτή τη U 1, η μεμβράνη προϋβριδοποιήθηκε για 2 h σε θερμοκρασία 65°C στο ίδιο διάλυμα και στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε για 16 h (ολονυκτίως) παρουσία 50% φορμαμίδης στους 65°C.

Μετά την υβριδοποίηση η μεμβράνη πλύθηκε δύο φορές με διάλυμα 2 X SSC για 5 min. σε θερμοκρασία δωματίου και δύο φορές για 30 min. με διάλυμα 2 X SSC, 0.5 % SDS στη θερμοκρασία υβριδοποίησης. Τα σήματα έγιναν ορατά με αυτοραδιογραφία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μολυσματικότητα του ιοειδούς σε φυτά τομάτας και καπνού

Τα διάφορα στελέχη του ιοειδούς PSTVd προκαλούν διαφορετικής έντασης συμπτώματα ανάλογα με τη μολυσματικότητά τους. Τα συνήθη συμπτώματα που εμφανίζονται στα μολυσμένα φυτά είναι κυρίως αναπτυξιακές διαταραχές όπως νανισμός και βραχυγονάτωση, παραμόρφωση του καρπού και του κονδύλου, καρούλιασμα των φύλλων ενώ συχνά παρατηρούνται νέκρωση των αγγείων και τραχύτητα των πρέπει να αναφερθεί ότι τα φύλλων. Θα συμπτώματα που παρουσιάζονται ποικίλουν ανάλογα με το στέλεχος του ιοειδούς και με το είδος του ξενιστή.

Στην παρούσα εργασία, για τη μελέτη του φαινομένου της μεταμεταγραφικής σίγησης γονίδιων, νεαρά φυτά τομάτας και καπνού μολύνθηκαν με μετάγραφα τριών στελεχών του ιοειδούς PSTVd και παρέμειναν στο θερμοκήπιο σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (με υψηλότερη θερμοκρασία 25°C) (βλ. 2.2.1.8.1. και 2.2.2. και Πιν. 2.2.β).

Η μόλυνση έγινε σε φυτά τομάτας (Lycopersicon esculentum cv. Rentita) ηλικίας 45 ημερών περίπου από την ημέρα της σποράς, τα οποία ελεγχόντουσαν σε τακτά χρονικά διαστήματα για την εμφάνιση συμπτωμάτων. Τα πρώτα συμπτώματα άρχισαν να γίνονται εμφανή στα φυτά που είχαν μολυνθεί με μετάγραφα του στελέχους KF440-2 του ιοειδούς PSTVd, 21 ημέρες περίπου μετά τη μόλυνση. Κύριο χαρακτηριστικό των φυτών αυτών ήταν το καρούλιασμα των φύλλων και η καθυστερημένη σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά ανάπτυξη του βλαστού. Μετά από τέσσερις περίπου ημέρες – 25-26 ημέρες από τη μόλυνση άρχισαν να εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά που είχαν μολυνθεί με το στέλεχος RG1 ενώ στα φυτά που μολύνθηκαν με το στέλεχος KF5M5 τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν 30 ημέρες περίπου μετά τη μόλυνση.

3.1.	Μολυσ	ματικότ	ητα του	ιοειδού	υφ 30 20	τά	
			-				

Στέλεχος		KF440-2			RG1			KF5M5		
1301	δούς									
Φυτό		1	2	3	1	2	3	1	2	3
	14									
	18									
	22	K (1)	K (1)				K (1)			
		N (1)	N (1)							
	26	K (1)	K (1)	K (1)	K (1)	K (1)	K (1)			K (1)
		N (1)	N (1)			N (1)	N (1)			
Ημέρες μετά τη μόλυνση	30 1n	K (1)	K (1)	K (1)	K (1)	K (1)	K (2)	K (1)	K (1)	K (1)
	T_{1}	οειγματ <mark>Ν (1)</mark>	N(1)	N (1)	N (1)	N (2)	N (2)			
	36	K (1)	K (2)	K (1)	K (2)	K (2)	K (2)	K (1)	K (1)	K (1)
		N (1)	N (1)	N (1)	N (2)	N (2)	N (2)			
		E (1)	E (1)			E (1)	E (1)			E (1)
	42	K (2)	K (2)	K (2)	K (2)	K (2)	K (2)	K (2)	K (1)	K (2)
		N (2)	N (2)	N (2)	N (2)	N (2)	N (2)			
		E (1)	E (1)	E (1)	E (1)	E (1)	E (1)	E (1)	E (1)	E (1)
	48	K (2)	K (3)	K (2)	K (2)	K (2)	K (3)	K (2)	K (2)	K (2)
		N (2)	N (2)	N (2)	N (2)	N (3)	N (3)			
		E (2)	E (2)	E (2)	E (2)	E (2)	E (2)	E (1)	E (1)	E (1)
	54	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (2)	K (2)	K (3)
		N (3)	N (3)	N (3)	N (3)	N (3)	N (3)			
		E (3)	E (2)	E (2)	E (2)	E (3)	E (3)	E (2)	E (2)	E (2)
	62	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (3)	K (2)	K (3)
	2 ^r	ON CONTRACT	oNNaja	N (3)	N (3)	N (3)	N (3)			
		E (3)	E (3)	E (3)	E (3)	E (3)	E (3)	E (2)	E (2)	E (2)

Πίνακας 3.1.α. Χρονοδιάγραμμα εμφάνισης διαφόρων συμπτωμάτων στα φυτά που μολύνθηκαν με 3 διαφορετικά στελέχη του ιοειδούς PSTVd. Τα γράμματα στον πίνακα υποδεικνύουν διαφορετικό σύμπτωμα και ο αριθμός στην παρένθεση την ένταση των συμπτωμάτων. 1 = ελαφρά συμπτώματα, 2 =ενδιάμεσα συμπτώματα, 3 = βαριά συμπτώματα.

Κ = καρούλιασμα των φύλλων.

N = νανισμός.

Ε = επιναστία.



Εικ. 3.1.α Σύγκριση φυτών μολυσμένων με διαφορετικά στελέχη PSTVd. Το στέλεχος RG1 θεωρείται θανατηφόρο ενώ το στέλεχος KF440-2 θεωρείται ότι δίνει ισχυρά συμπτώματα. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 30 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το ιοειδές

Ένα μήνα μετά τη μόλυνση τα συμπτώματα ήταν σαφώς περισσότερο εκδηλωμένα στα φυτά που μολύνθηκαν με το στέλεχος RG1 (Εικ. 3.1.α, 3.1.β και 3.1.δ) Τα μολυσμένα με KF440-2 φυτά είχαν αρκετά εκδηλωμένα συμπτώματα (Εικ. 3.1.α και 3.1.γ), ενώ τα φυτά που μολύνθηκαν με KF5M5 δύσκολα διακρίνονταν από το υγιές φυτόμάρτυρα (Εικ. 3.1.β, γ και δ).



Εικ. 3.1.β Σύγκριση υγιούς και μολυσμένου φυτού. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 30 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το ιοειδές.

30 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών, συλλέχθηκαν φύλλα από τα οποία έγινε απομόνωση ολικού RNA (βλ. 2.2.1.6) και η παρουσία της ευθύγραμμης και κυκλικής μορφής του ιοειδούς στα φυτά επαληθεύτηκε με ανάλυση κατά northern.

62 ημέρες μετά τη μόλυνση πραγματοποιήθηκε και δεύτερη συλλογή δείγματος από τα φυτά. Στο στάδιο αυτό τα συμπτώματα ήταν ακόμη πιο έντονα.



Εικ. 3.1.γ Σύγκριση φυτών μολυσμένων με διαφορετικά στελέχη PSTVd. Το στέλεχος KF5M5 θεωρείται ήπιο ενώ το στέλεχος KF440-2 θεωρείται ότι δίνει ισχυρά συμπτώματα. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 30 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το ιοειδές

Τα μολυσμένα με RG1 φυτά εμφάνιζαν ισχυρό νανισμό, καρούλιασμα των φύλλων, βραχυγονατισμό, επιναστία και νέκρωση των κάτω φύλλων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι στις συνθήκες του θερμοκηπίου, το στέλεχος RG1 του ιοειδούς δεν επέφερε σε καμία περίπτωση το θάνατο των φυτών. Ίδια συμπτώματα παρατηρήθηκαν και στα φυτά που είχαν μολυνθεί με KF440-2, όμως η ένταση τους ήταν σαφώς μικρότερη σε σύγκριση με τα RG1-μολυσμένα φυτά. Ενδιαφέρον παρουσίασαν τα συμπτώματα που εμφανίστηκαν στα φυτά που είχαν μολυνθεί με KF5M5. Σε αυτά παρατηρήθηκε αύξηση του συνολικού ύψους του φυτού σε σχέση με το υγιές, ενώ η διάμετρος του βλαστού ήταν σαφώς μικρότερη συγκρινόμενη με εκείνη του υγιούς φυτού.



3.1.δ Εικ. Σύγκριση μολυσμένων φυτών με διαφορετικά στελέχη PSTVd. στέλεχος KF5M5 То θεωρείται ήπιο ενώ το στέλεχος RG1 θεωρείται θανατηφόρο. Τα φυτά φωτογραφήθηκαν 30 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το ιοειδές

Τα φυτά καπνού (Nicotiana benthamiana) μολύνθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε και στις μολύνσεις των φυτών τομάτας. Ακολούθησε ανάλυση κατά northern από δείγματα που συλλέχθηκαν 30 ημέρες από την ημέρα της μόλυνσης και από την οποία διαπιστώθηκε ότι τα φυτά δεν ήταν μολυσμένα με το ιοειδές. Ακολούθησε κι άλλη συλλογή δειγμάτων 60 ημέρες μετά τη μόλυνση και ανάλυση κατά northern η οποία επαλήθευσε το αποτέλεσμα της πρώτης.

3.2. Εμπλουτισμός των χαμηλού μοριακού βάρους RNA μορίων από δείγματα ολικού RNA.

Το εκχύλισμα RNA που προέκυψε από τη μέθοδο απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε, περιλαμβάνει μόνο ένα μικρό ποσοστό των χαμηλού μοριακού βάρους RNA μορίων. Για τον εμπλουτισμό του εκχυλίσματος σε RNA μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Tabler *et al* (1989) κατά την οποία το RNA του ιοειδούς PSTVd (μήκους 359 nt) εκχειλίζονταν από ξηρό ίζημα ολικού RNA ύστερα από διάλυση του ιζήματος σε 2 M LiCl και φυγοκέντρηση.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση και προκειμένου να εκχυλιστούν μόρια πολύ μικρότερου μήκους (~21-23 nt), η συγκέντρωση του διαλύματος LiCl αυξήθηκε σε 8 Μ. Το αναλυτικό πρωτόκολλο εκχύλισης είναι το εξής: Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων που προκύπτει από την απομόνωση τους από φυτικούς ιστούς επαναδιαλυτοποιείται με ήπια ανάδευση σε 1 ml LiCl στους 4°C ολονυκτίως. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 30 min. και κατόπιν απομάκρυνση και φύλαξη του υπερκειμένου στους -20°C. То ίζημα που παραμένει επαναδιαλυτοποιείται σε 1 ml LiCl με ήπια ανάδευση στους 4°C για 5-6 h και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως, απομάκρυνση του υπερκείμενου, ανάμειξή του με το πρώτο υπερκείμενο και κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη. Το ίζημα αυτό, καθώς και η αδιάλυτη φάση που παραμένει μετά τα δύο στάδια επαναδιάλυσης σε LiCl, επαναδιαλύεται σε H2O και ένα μέρος του αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης 1.5 % κ.β. για να διαπιστωθεί το ποσοστό του εμπλουτισμού. Με την τεχνική αυτή και κάτω από αυτές τις συνθήκες, στο διάλυμα LiCl εκχειλίζονται tRNAs, 5S rRNA και χρωμοσωμικό DNA μαζί με τα μικρού μήκους RNA μόρια ενώ στην αδιάλυτη φάση παραμένουν μεγάλου μοριακού βάρους RNA μόρια όπως mRNAs και ολόκληρα μόρια του ιοειδούς (Εικ. 3.2.α).



Εικ. 3.2.α. Ανάλυση των κλασμάτων RNA, σε πηκτή αγαρόζης 1.5 % κ.β, πριν και μετά τη διαδικασία εμπλουτισμού με LiCl. 1. Δείγμα RNA μετά την εκχύλιση με LiCl, 2. Δείγμα RNA που παρέμεινε στο ίζημα κατά την εκχύλιση με LiCl, 3. Δείγμα ολικού RNA πριν την εκχύλιση με LiCl.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2.α, ουσιαστικά όλο το κλάσμα των μικρών RNAs εκχυλίζεται στο διάλυμα LiCl ενώ τα μεγάλα μόρια παραμένουν στο αδιάλυτο κλάσμα. Με την τεχνική αυτή το δείγμα εμπλουτίζεται σε μικρά RNAs και το σήμα μετά τον υβριδισμό είναι πιο δυνατό γιατί ο ανταγωνισμός του ιοειδούς και των μικρών RNAs για τον ανιχνευτή μειώνεται λόγω της μείωσης της ποσότητας του ιοειδούς στο δείγμα.

3.3 Ανάλυση κατά northern των μολυσμένων με PSTVd φυτών τομάτας.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο πρωταρχικός σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της ικανότητας του ιοειδούς PSTVd να επάγει μεταμεταγραφική σίγηση γονιδίων (PTGS) σε μολυσμένα φυτά τομάτας, όπως αυτή πιστοποιείται από την ύπαρξη μικρού μήκους RNA μορίων σύμφωνα με τους Hamilton και Baulcombe (1999) και Dalmay *et al.*, 2000.

3.3.1. Επιβεβαίωση της ὑπαρξης μικρών RNA μορίων και καθορισμός του μεγέθους τους.

Για τον εντοπισμό των PTGS-ειδικών μικρού μήκους RNA μορίων και τον καθορισμό του μεγέθους τους, εμπλουτισμένα (βλ. 3.2.) RNA εκχυλίσματα μολυσμένων φυτών αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης υψηλής συγκέντρωσης (βλ. 2.2.3.1.). Ως μάρτυρες μεγέθους χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά σημασμένα συνθετικά μονόκλωνα RNA και DNA ολιγονουκλεοτίδια (βλ. 2.1.3 και Πιν. 2.1.α).

Στην υβριδοποίηση που επακολούθησε, χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το αρνητικό (-) μετάγραφο του στελέχους KF440-2 (βλ. Πιν.2.2.α). Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής υβριδίζεται με το θετικό κλώνο του στελέχους.

Η ανάλυση κατά northern έδειξε ότι τα χαρακτηριστικά, μικρού μεγέθους, RNA μόρια είναι εμφανή στα μολυσμένα φυτά ενώ απουσιάζουν από το υγιές (Εικ. 3.3.α). Παράλληλα, εξακριβώθηκε ότι τα μόρια αυτά έχουν μήκος μεταξύ 21 και 23 νουκλεοτιδίων[.] αποτέλεσμα που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Hammond *et al.* (2000), Hutvágner *et al.* (2000) και Zamore *et. al* (2000) (Εικ. 3.3.β).



Εικ. 3.3.α. Ανάλυση κατά northern φυτών μολυσμένων με το στέλεχος KF440-2 του ιοειδούς PSTVd. 1. Υγιές φυτό, 2, 3,6,7, 10 και 11. DNA ολιγονουκλεοτίδια μήκους 23, 25, 20, 27, 33 και 18 nt αντίστοιχα. 4 και 5. Εκχύλισμα ολικού RNA και εκχύλισμα RNA μετά από εκχύλιση με LiCl αντίστοιχα. 8, και 12. RNA ολιγονουκλεοτίδια μήκους 36 και 18 nt αντίστοιχα. 9. Μεταγραφικός μάρτυρας μεγέθους με δύο κύριες ζώνες μήκους 27 και 39 nt (βέλη). Χρόνος έκθεσης 36 h.



Εικ. 3.3.β. Μεγέθυνση του πλαισίου της εικόνας 3.3.α. 2. DNA ολιγονουκλεοτίδιο μήκους 23 nt., 3. DNA ολιγονουκλεοτίδιο μήκους 25 nt., 4. Εκχύλισμα ολικού RNA από μολυσμένο με το στέλεχος KF440-2 φυτό τομάτας, 5. Κλάσμα RNA από μολυσμένο με το στέλεχος KF440-2 φυτό τομάτας που προέκυψε από την εκχύλιση με LiCl.

Ο όγκος του δείγματος **4** είναι διπλάσιος από αυτόν του δείγματος **5**.

Στην εικόνα 3.3.β. φαίνονται οι δύο χαρακτηριστικές ζώνες των χαρακτηριστικών μικρών RNA μορίων που εμφανίζονται κατά την μεταμεταγραφική σίγηση γονιδίων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα DNA και RNA ολιγονουκλεοτίδια έχουν διαφορετική ηλεκτροφορητική συμπεριφορά λόγω του διαφορετικού λόγου φορτίου προς μάζα. Για το λόγο αυτό, στην εικόνα 3.3.β. φαίνεται ότι η ζώνη που αντιστοιχεί σε μήκος 23 nt. (2) βρίσκεται ανάμεσα στις δύο ζώνες των PTGS-χαρακτηριστικών RNA μορίων.

3.3.2 Διερεύνηση της πολικότητας των μικρών RNA μορίων.

Για τη διερεύνηση της πολικότητας (sense και antisense) των μικρών μορίων RNA, διεξήχθησαν αναλύσεις κατά northern με ανιχνευτές (+) και (-) μετάγραφα του στελέχους KF440-2 (Πιν. 2.2.α).

Όπως φαίνεται στις Εικ.3.3.γ και 3.3.δ, τα PTGS-ειδικά RNA μόρια βρίσκονται μέσα στα μολυσμένα φυτά και με τις δύο πολικότητες, γεγονός που έχει δειχθεί και από άλλους ερευνητές στον καπνό (Hamilton and Baulcombe, 1999, Hutvágner *et al.*, 2000) στη Drosophila (Hammond *et al.*, 2000, Tuschl *et al.*, 2000, Zamore *et. al.*, 2000), και στο *Caenorhabditis elegans* (Parrish *et al.*, 2000).



Εικ. 3.3. Ανάλυση κατά northern φυτών τομάτας μολυσμένων με 3 διαφορετικά στελέχη PSTVd.

γ. <u>Υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή 190(+)R</u> (βλ. Πιν. 2.2.α). **Μ.** Μεταγραφικός μάρτυρας μεγέθους, **1.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με KF440-2, **2.** Δείγμα 30 d.p.i. φυτού μολυσμένον με KF440-2, **3.** Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με KF5M5, **4.** Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένον με RG1, **5.** Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Υγιές φυτό. Χρόνος έκθεσης 5 ημέρες.

δ. <u>Υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή 190(-)</u>R (βλ. Πιν. 2.2.α.). **1.** Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με KF440-2, **2.** Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένου με KF440-2, **3.** Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με KF5M5, **4.** Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένου με KF5M5, **M.** Μεταγραφικός μάρτυρας μεγέθους, **5.** Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **6.** Δείγμα 62 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με RG1. **7.** Υγιές φυτό. Χρόνος έκθεσης 5 ημέρες.

* d.p.i. days post inoculation (Ημέρες μετά τη μόλυνση).

3.3.3. Ποσοτικοποίηση μικρών RNA μορίων.

Παράλληλα με τον καθορισμό της πολικότητας των μικρών RNA μορίων, έγινε και προσπάθεια συσχετισμού της παθογονικότητας των στελεχών του ιοειδούς PSTVd και της ποσότητας των PTGS-τυπικών RNA

μορίων. Επίσης έγινε προσπάθεια συσχετισμού της ποσότητας των μικρών RNA μορίων και της διάρκειας μόλυνσης των φυτών.

3.3.3.1. Συσχετισμός της παθογονικότητας του στελεχών του ιοειδούς και της ποσότητας των PTGS-τυπικών RNA μορίων στα φυτά.

Για τη μελέτη αυτή έγιναν αναλύσεις κατά northern σε φυτά μολυσμένα με τα τρία διαφορετικά στελέχη του ιοειδούς (Πιν. 2.2.β) και έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης των μικρών RNA μορίων έχοντας ως μάρτυρες ποσότητας την 5S υπομονάδα του χλωροπλαστικού rRNA και το U1 RNA. Το U1, είναι ένα μικρό πυρηνικό μόριο RNA (snRNA) μήκους 181 nt, που εντοπίζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποτελεί μέρος του συμπλόκου ωρίμανσης του RNA.



U 1 (χρόνος ἑκθεσης 16 h).

EIK. 3.3.2. northern ανάλυση φυτών μολυσμένων με 3 διαφορετικά στελέχη του ιοειδούς PSTVd. Το βέλος δείχνει το σήμα που προκύπτει από υβριδισμό του ανιχνευτή με την υπομονάδα 5S του χλωροπλαστικού rRNA. Ο ανιχνευτής είναι το μετάγραφο 190(+)R. **1.** Δείγμα 30 d.p.i φυτού μολυσμένου με το στέλεχος KF440-2, 2. Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένου με το στέλεχος KF440-2, 3. Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με το στέλεχος KF5M5, 4. Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένου με το στέλεχος KF5M5, 5. Δείγμα 30 d.p.i. από φυτό μολυσμένο με το στέλεχος RG1, 6. Δείγμα 62 d.p.i. φυτού μολυσμένου με το στέλεχος RG1. Χρόνος έκθεσης 2 ημέρες.

2 3 4 M 5 Εικόνα 3.3.ε

Στις εικόνες 3.3.γ και 3.3.ε φαίνεται ένα επιπρόσθετο σήμα το οποίο είναι εμφανές και στο δείγμα από το υγιές φυτό και μόνο σε υβριδοποιήσεις με τον ανιχνευτή 190(+)R. Ο Herold (1990) περιέγραψε ότι η 5S υπομονάδα του χλωροπλαστικού rRNA υβριδίζεται με το PSTVd (+) RNA μέσω 15 νουκλεοτιδίων στην περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 215-230 της αλληλουχίας του ιοειδούς. Η 5S χλωροπλαστική ριβοσωμική υπομονάδα της τομάτας αποτελείται από 121 νουκλεοτίδια και έχει 100 % ομολογία με την αντίστοιχη του καπνού (Κωδικός πρόσβασης σε βάσεις δεδομένων M10360, Takaiwa F. and Sugiura M., 1981). Η ζώνη που εμφανίζεται μετά από υβριδισμό με ανιχνευτή το U1 snRNA μετάγραφο φαίνεται στις εικόνες 3.3.γ, 3.3.δ και 3.3.ε.

Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος ImageQuant[®] (Molecular Dynamics). Κανένας συσχετισμός μεταξύ παθογονικότητας των στελεχών του ιοειδούς και της ποσότητας των μικρών RNA μορίων στο δείγμα δε μπόρεσε να γίνει. Φαίνεται, ότι η ποσότητα των PTGS-τυπικών RNA μορίων στα φυτά είναι ανεξάρτητη της παθογονικότητας του στελέχους του ιοειδούς με το οποίο μολύνθηκε και ίσως εξαρτάται μόνο από την αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιασμού (Bλ. Συζήτηση 4.1). Εν τούτοις, στην εικόνα 3.3.δ φαίνεται ότι η ποσότητα των μικρών RNA μορίων για το στέλεχος KF5 είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες ποσότητες για τα άλλα δύο στελέχη.

3.3.3.2. Συσχετισμός μεταξύ της χρονικής διάρκειας της μόλυνσης και της ποσότητας των μικρών RNA μορίων στα φυτά.

Για τη διερεύνηση αυτού του ερωτήματος χρησιμοποιήθηκαν τα ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για το συσχετισμό της ποσότητας των μικρών RNA μορίων με την παθογονικότητα των στελεχών του ιοειδούς (βλ. 3.3.3.1). Από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ποσοτικοποίησης με βάση τις εικόνες 3.3.γ και 3.3.ε, εξήχθη το συμπέρασμα ότι είναι δύσκολο να γίνει συσχετισμός μεταξύ της διάρκειας της μόλυνσης και της ποσότητας των μικρών RNA μορίων. Όπως φαίνεται και στις εικόνες, υπάρχει μία τάση τα επίπεδα των μικρών RNA μορίων να είναι αυξημένα στις 30 ημέρες από την έναρξη της μόλυνσης (τουλάχιστον στις συνθήκες του συγκεκριμένου θερμοκηπίου), ενώ ένα μήνα αργότερα, στις 62 ημέρες από την έναρξη της μόλυνσης, τα επίπεδα των μικρών RNAs μειώνονται, γεγονός που παρατηρήθηκε και στα τρία στελέχη του ιοειδούς.

Στη βιβλιογραφία μέχρι στιγμής δεν υπάρχει παρόμοια μελέτη παρακολούθησης των επιπέδων των μικρών RNA μορίων κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης. Το φαινόμενο αυτό είναι δύσκολο να ερμηνευτεί λαμβάνοντας υπ'όψη τα μέχρι τώρα μοντέλα λειτουργίας της μετα-μεταγραφικής σίγησης. Με βάση το μοντέλο που θέλει τα μικρά RNAs να παράγονται ως αποτέλεσμα της δράσης RNAσων και να ξαναμπαίνουν στο μονοπάτι της αποικοδόμησης του RNA-στόχου, η διαφορά που παρατηρήθηκε στα μικρά RNAs που προέρχονται από το ιοειδές μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι σε αρχικά στάδια της μόλυνσης – όπου η συγκέντρωση του ιοειδούς στα κύτταρα είναι υψηλή – ο μηχανισμός της μετα-μεταγραφικής σίγησης αποικοδομεί πολλά αντίγραφα του ιοειδούς δίνοντας PTGS-τυπικά RNA μόρια. Στη συνέχεια και καθώς η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ιοειδούς πέφτει, παράγονται λιγότερα μόρια μικρών RNA. Η θεώρηση αυτή είναι λογική αν σκεφτεί κανείς ότι στα πρώτα στάδια μιας μόλυνσης, τα φυτά θα πρέπει να κινητοποιήσουν γρήγορα και πολύ αποτελεσματικά τους μηχανισμούς άμυνάς τους. Πειράματα με την παρακολούθηση της ποσότητας του ιοειδούς και των ενδιάμεσων μορίων αντιγραφής του (-) που παράγονται με το χρόνο σε σχέση με τα μικρά RNA μόρια, ίσως δώσουν μία απάντηση.

3.3.4. Εκπροσώπηση των περιοχών του ιοειδούς στο κλάσμα των μικρών RNA μορίων.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (βλ. 1.1.2), το ιοειδές PSTVd αποτελείται από πέντε διακριτές περιοχές που καθορίζουν τα χαρακτηριστικά του. Το επόμενο λοιπόν ζήτημα που διερευνήθηκε ήταν η ύπαρξη όλων των περιοχών του ιοειδούς στο κλάσμα των PTGSτυπικών RNA μορίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα από τις αναλύσεις κατά northern, ενώ κρίθηκε σκόπιμο να γίνουν και περαιτέρω αναλύσεις με δύο καινούριους ανιχνευτές (βλ. Εικ. 3.3.ς, 3.3.ζ και Πίν. 2.2.α).

Με βάση τα δεδομένα των εικόνων 3.3.α έως 3.3.ς, αποδεικνύεται ότι στα χαρακτηριστικά για μετα-μεταγραφική σίγηση μικρά RNA μόρια εκπροσωπούνται όλες οι περιοχές του ισειδούς καθώς και οι δύο του πολικότητες. Αυτό σημαίνει ότι το RNA του ιοειδούς κομματιάζεται σε κομμάτια μήκους 21-23 nt χωρίς να αναγνωρίζεται κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία του ή πολικότητα του η οποία προτιμάται για αποικοδόμηση σε σχέση με τις άλλες. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με δεδομένα άλλων ερευνητών (Montgomery et al., 1998' Hamilton and Baulcombe' 1999, Clemens et al., 2000' Hammond et al, 2000' Hutvágner et al., 2000' Voinnet et al., 2000' Yang et al., 2000' Zamore et al., 2000' Parrish et al., 2000).



Εικ. 3.3.ς. και 3.3.ζ. Ανάλυση κατά northern. Η υβριδοποίηση έγινε με τον ανιχνευτές 170(-)L και 170(+)L (αντίστοιχα) που ανιχνεύουν το «αριστερό» μέρος του ιοειδούς.

Μ. Μεταγραφικός μάρτυρας μεγέθους, **1. 2.** Φυτό μολυσμένο με KF440-2, Δείγμα 30 και 62 d.p.i. αντίστοιχα, **3. 4.** Φυτό μολυσμένο με KF5M5, δείγμα 30 και 62 d.p.i. αντίστοιχα **5. 6.** Δείγματα βλαστού από φυτά μολυσμένα με τα στελέχη KF440-2 και KF5M5 αντίστοιχα. **7. 8.** Φυτό μολυσμένο με RG1, δείγμα 30 και 62 d.p.i. αντίστοιχα. **9.** Υγιές φυτό.

Χρόνος έκθεσης 5 ημέρες και 2 ημέρες αντίστοιχα.

3.4. Διερεύνηση των 5' και 3' ἀκρων των χαρακτηριστικών κατἁ τη μετα-μεταγραφική σἰγηση γονιδίων μικρών RNA μορίων.

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των άκρων των μικρών RNA μορίων είναι πολύ σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας για τη μετέπειτα πορεία της μελέτης αυτής αλλά είναι και από μόνος του πολύ ενδιαφέρων και σημαντικός. Ο καθορισμός των άκρων μπορεί να οδηγήσει σε απαντήσεις σε μερικά αναπάντητα μέχρι στιγμής ερωτήματα στην έρευνα της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων, όπως ποιά ένζυμα λαμβάνουν μέρος στη λειτουργία αυτή, αφού είναι γνωστό ότι υπάρχουν νουκλεάσες που αφήνουν συγκεκριμένες ομάδες στα άκρα των νουκλεοτιδικών αλυσίδων που πέπτουν΄ ποίο είναι το σήμα στο οποίο οφείλεται η διασυστηματική μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων, και τέλος, αν και με ποιο τρόπο σημαίνονται τα μικρά RNA που θα λάβουν μέρος στη λειτουργία της μετα-μεταγραφικής σίγησης για να διακριθούν από αυτά που απλά θα αποικοδομηθούν.

Επίσης η γνώση των 5' και 3' άκρων είναι σημαντική και για τη μετέπειτα πορεία της συγκεκριμένης εργασίας διότι με την πληροφορία αυτή καθίσταται ευκολότερη η κλωνοποίηση των μικρών RNAs σε κατάλληλους φορείς έτσι ώστε να γίνει δυνατή η αλληλουχισή τους.

Η ιδέα για τον χαρακτηρισμό των άκρων των μικρών aRNA μορίων ήρθε από την παρατήρηση ότι μάρτυρες μεγέθους με διαφορετικά 5' άκρα έχουν διαφορετική ταχύτητα μετανάστευσης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης υψηλής συγκέντρωσης (12)% κ.β). Συγκεκριμένα, θέλοντας να δοκιμάσουμε την απόδοση μιας αντίδρασης σύνδεσης pCp στο 3' άκρο σημασμένου και μη σημασμένου μάρτυρα μεγέθους (βλ. 2.2.1.8.4), παρατηρήσαμε ότι ο, σημασμένος με ³²P στο 5' 2.2.1.8.3) μετακινούνταν με διαφορετικό άκρο μάρτυρας (βλ. ηλεκτροφορητικό πρότυπο απ'ότι ο μη σημασμένος (ο οποίος είχε υδροξυλική ομάδα στο 5' άκρο) (βλ. Εικ. 3.4.α).

Οι στρατηγικές που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους έχουν ένα κοινό σημείο. Προϋποθέτουν διαφοροποίηση στην κινητικότητα των μικρών RNA μορίων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης ανάλογα με τη χημική ομάδα που βρίσκεται στο 5' και 3' άκρο.

Έτσι, RNA μόρια που έχουν στο 5' άκρο τους φωσφορική ομάδα (δηλαδή δύο αρνητικά φορτία), θα μετακινούνται διαφορετικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου απ'ότι RNA μόρια του ίδιου μεγέθους που έχουν στο 5' άκρο τους υδροξυλική ομάδα. Ύστερα λοιπόν από τις επιδράσεις των διαφόρων τροποποιητικών ενζύμων πάνω στα μικρά RNA μόρια, τα τελευταία αναλύονταν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12 % (κ.β) και γινόντουσαν ορατά ύστερα από υβριδοποίηση με ραδιενεργό ανιχνευτή το αρνητικό (-) μετάγραφο του στελέχους KF440-2 του ιοειδούς.

3.4.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός του 5' άκρου των μικρών RNA μορίων

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (2.2.1.8), πολλές από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση των μαρτύρων μεγέθους, χρησιμοποιήθηκαν και ως διαγνωστικά εργαλεία για το βιοχημικό χαρακτηρισμό των άκρων των μικρών RNA μορίων.



Εικ. 3.4.α Απόδοση αντίδρασης σύνδεσης και διαφοροποίηση στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο μεταξύ σημασμένου με ραδιενεργό Ρ και μη σημασμένου μάρτυρα μεγέθους. 1. Ολιγονουκλεοτίδιο 18 nt σημασμένο με ραδιενεργό φωσφόρο στο 5' άκρο, 2. Αντίδραση σύνδεσης μη ραδιενεργού pCp σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο (βέλος), 3. Αντίδραση σύνδεσης ραδιενεργού pCp σε μη σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο (βέλος), 4. 5. 6. Δείγματα όπως στα 1, 2, 3, αλλά με διπλάσια ποσότητα. Χρόνος έκθεσης 1 h.

Ουσιαστικά, ο χαρακτηρισμός του 5' και 3' άκρου δεν ήταν δύο ξεχωριστές διαδικασίες. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε περιελάμβανε διαφορετικούς συνδυασμούς ενζυμικών αντιδράσεων που ήταν οι εξής:

Πέντε δείγματα RNA εμπλουτισμένα σε μικρά RNAs υπόκειντο σε επίδραση φωσφατάσης για την απομάκρυνση πιθανής φωσφορικής ομάδας από το 5' ή 3' άκρο τους (βλ. 2.2.1.8.5).

Στη συνέχεια, σε ένα από αυτά τα κλάσματα επιδρούσε Τ4 πολυνουκλεοτιδική κινάση για την αποκατάσταση της φωσφορικής ομάδας στο 5' άκρο (βλ. 2.2.1.8.3).

Σε τρία από αυτά τα δείγματα γινόταν επίδραση με HCl (βλ. 2.2.1.8.6 και 3.4.2) και στη συνέχεια σε δύο από αυτά γινόταν επίδραση με φωσφατάση και σε ένα από τα τελευταία έγινε σύνδεση pCp με τη βοήθεια του ενζύμου T4 RNA ligase (βλ. 2.2.1.8.4).

Σε ένα αποφωσφορυλιωμένο, με τη βοήθεια της φωσφατάσης, δείγμα έγινε σύνδεση pCp με τη δράση του ενζύμου T4 RNA ligase.

Σε ένα αρχικό δείγμα (χωρίς καμία επίδραση ενζύμου) έγινε σύνδεση pCp.

Σε ένα αρχικό δείγμα (χωρίς καμία επίδραση ενζύμου) έγινε επίδραση HCl.

Κατόπιν, όλα τα δείγματα (και ένα αρχικό, ως μάρτυρας) αναλύονταν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12 % (Εικ. 3.4.β). Συνοπτικά τα δείγματα στην ανάλυση ήταν τα εξής:

- 1. αρχικό (μη τροποποιημένο) δείγμα
- 2. φωσφ.*
- 3. φωσφ + κιν.**
- 4. $\phi\omega\sigma\phi + \kappa i\nu + \phi\omega\sigma\phi$.
- 5. φωσφ + HCl***
- 6. $\phi\omega\sigma\phi$ + HCl + $\phi\omega\sigma\phi$
- 7. $\phi\omega\sigma\phi$ + HCl + $\phi\omega\sigma\phi$ + lig.****
- 8. lig
- 9. φωσφ. + Lig.
- 10. ĸıv.

* Επίδραση φωσφατάσης
** Επίδραση Τ4 ΡΝΚ
*** Επίδραση HCI
**** Σύνδεση pCp με τη βοήθεια
του ενζύμου T4 RNA ligase.
Οι αντιδράσεις έγιναν
διαδοχικά όπως αναφέρονται.

Από τα παραπάνω δείγματα, τα 2, 3 και 9 σχετίζονται με τον καθορισμό του 5' άκρου ενώ τα υπόλοιπα με το χαρακτηρισμό του 3' άκρου.

Η πολυπλοκότητα των συγκεκριμένων αντιδράσεων, η μικρή τους απόδοση και το γεγονός ότι η τεχνική σα σύνολο δεν είχε ποτέ άλλοτε σχεδιαστεί και χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. δημιούργησε προβλήματα στο χαρακτηρισμό των άκρων των μικρών RNA μορίων (Εικ. 3.4.α, 3.4.β και 3.4.γ). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της εύκολης παρερμηνείας των αποτελεσμάτων φαίνεται στην εικόνα 3.4.ß. Συγκεκριμένα στη σειρά 2 της εικόνας αυτής φαίνεται μία αλλαγή στην ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του δείγματος αυτού. Η αλλαγή αυτή προέρχεται στον αυξημένο όγκο του συγκεκριμένου δείγματος σε σχέση με τον όγκο των άλλων δειγμάτων.



Εικ. 3.4.β Ανάλυση ηλεκτροφορητικού προτύπου διαφόρων επιδράσεων τροποποιητικών ενζύμων σε PTGS-χαρακτηριστικά RNA μόρια. Μ. Μάρτυρας μεγέθους, 1. Μάρτυρας αντιδράσεων (ατροποποίητο δείγμα), 2. Επίδραση με φωσφατάση (αυξημένος όγκος δείγματος), 3. Επίδραση με φωσφατάση και κινάση, 4. Επίδραση με φωσφατάση , κινάση, φωσφατάση, 5. Επίδραση με φωσφατάση και HCl, 6. Επίδραση με φωσφατάση, HCl, φωσφατάση, 7. Επίδραση με φωσφατάση και σύνδεση pCp, 8. Σύνδεση pCp, 9. Επίδραση με φωσφατάση και σύνδεση με ρCp, 10. Επίδραση κινάσης.

Ο ραδιενεργά σημασμένος ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο KF440-2 (-).

Ο χρόνος έκθεσης ήταν 2 ημέρες.

Τελικά, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών, μία άλλη ερευνητική ομάδα κατάφερε να καθορίσει την ομάδα που βρίσκεται στο 5' άκρο των μικρών RNA μορίων. Πρόκειται για τη υδροξυλική ομάδα και διαπιστώθηκε ύστερα από απομόνωση και σήμανση των μορίων αυτών στο 5'ἀκρο με τη χρήση του ενζύμου Τ4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (Hutvágner *et al.*, 2000).

3.4.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός του 3' άκρου των μικρών RNA μορίων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το 3' άκρο των μικρών (χαρακτηριστικών στο PTGS) RNA μορίων. Ίσως το σήμα για τη διασυστηματική μεταφορά του PTGS (1.2.3) να είναι κάποιο μόριο RNA ειδικά σημασμένο για το συγκεκριμένο σκοπό Ένας ελκυστικός υποψήφιος για τη σήμανση αυτή είναι η κυκλική φωσφορική ομάδα (cyclic phosphate) μεταξύ της 2' και 3' θέσης.

Για το χαρακτηρισμό του 3' άκρου και για την πιθανότητα να υπάρχει κυκλική φωσφορική ομάδα σ'αυτό, χρησιμοποιήθηκε από τη μία η T4 RNA ligase και από την άλλη επίδραση HCl.

Το HCl έχει την ιδιότητα, κάτω από ορισμένες συνθήκες (βλ. 2.2.1.8.6) να σπάει το φωσφοδιεστερικό δεσμό που αναπτύσσεται μεταξύ της 2' και 3' θέσης στο δακτύλιο της ριβόζης. Έτσι αρχική επίδραση με HCl στο δείγμα των μικρών RNA μορίων θα προκαλέσει ρήξη του δεσμού αυτού αφήνοντας μία ανοιχτή φωσφορική ομάδα στη θέση 3' και σε μικρότερο ποσοστό στη θέση 2').



Εικόνα 3.4.γ

Εικ. 3.4.γ. Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων μικρών RNA μορίων μετά από επίδραση HCI και σύνδεση με pCp. C. Δείγμα μικρών RNA χωρίς καμία τροποποίηση, M. Μάρτυρας μεγέθους 23 nt (βέλος),1. Δείγμα μικρών RNA μετά από αντίδραση λιγάσης, 2. Επίδραση HCI και σύνδεση με pCp, 3. Επίδραση με HCI, φωσφατάση και σύνδεση με pCp, 4. Επίδραση με φωσφατάση και σύνδεση με pCp. Η υβριδοποίηση έγινε με τη χρήση του ανιχνευτή KF440-2 (-). Ο χρόνος

έκθεσης ήταν 2 ημέρες.

Στη συνέχεια το δείγμα επωάζεται με φωσφατάση έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι φωσφορικές ομάδες. Επακόλουθη αντίδραση με T4 RNA ligase θα προκαλέσει την προσθήκη ενός 5',3', διφωσφονουκλεοτιδίου (π.χ. pCp) στο 3' άκρο των μικρών RNA μορίων η οποία γίνεται αντιληπτή από την καθυστέρηση των μορίων σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης υψηλής συγκέντρωσης (Εικ. 3.4.α).

Κανένα συμπέρασμα δεν μπόρεσε να εξαχθεί λόγω του γεγονότος ότι οι αντιδράσεις αυτού του τύπου έχουν πολύ μικρή απόδοση με αποτέλεσμα την εμφάνιση εξασθενημένου σήματος μετά από αυτοραδιογραφία (Εικ.3.4.γ). Εξάλλου ο συνδυασμός αυτών των δύο ή και περισσότερων αντιδράσεων προϋποθέτει ενδιάμεσα στάδια καθαρισμού με εκχύλιση φαινόλης και κατακρήμνιση με αιθανόλη πριν από κάθε βήμα γεγονός που μειώνει κατά πολύ τη συγκέντρωση των μικρών RNA μορίων στο δείγμα. Επίσης η ιοντική ισχύς και το pH της πηκτής παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση των δειγμάτων με συνέπεια τη διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων.

3.5. Προπαρασκευαστικά στάδια για τη μελέτη της πιθανής εμπλοκής του HC-Pro στη μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων που προκαλείται από το ιοειδές PSTVd.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μία τεχνική με την οποία μπορούν να γίνουν μελέτες της λειτουργίας μίας πρωτεΐνης *in vivo*. Η τεχνική της παροδικής έκφρασης (transient expression) μίας πρωτεΐνης στα φυτά μετά από αγροδιήθηση (agroinfiltration) στηρίζεται στην ικανότητα που έχει το αγροβακτήριο (*Agrobacterium tumefaciens*) να μολύνει φυτά και να εκφράζει μέρος του πλασμιδίου του (Τϊ) μέσα στα φυτικά κύτταρα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η πρωτεΐνη HC-Pro είναι ένας γνωστός καταστολέας της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων και στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές εργασίες – κυρίως με διαγονιδιακά φυτά – σχετικά με αυτή του την ιδιότητα (βλ. 1.2.4.1).

Οι εργασίες αυτές εξετάζουν τη λειτουργία του HC-Pro είτε σε διαγονιδιακά φυτά προκαλώντας αρχικά PTGS του διαγονιδίου και στη συνέχεια καταστέλλοντας την PTGS με την παροδική έκφραση του HC-Pro, είτε μολύνοντας διαγονιδιακά φυτά με ιούς. Μέχρι στιγμής καμία ομάδα δεν έχει δείξει αν υπάρχει εμπλοκή της HC-Pro σε διαδικασίες PTGS που προκαλούνται σε κανονικά φυτά μετά από μόλυνση με PSTVd.

Η τεχνική της παροδικής έκφρασης περιλαμβάνει τέσσερα στάδια. Στο πρώτο, το cDNA της πρωτεΐνης τοποθετείται στον πλασμιδιακό φορέα pART 7 (βλ. 2.1.2 και Εικ. 2.1.α) και στη συνέχεια στον πλασμιδιακό φορέα pART 27. Κατόπιν ο φορέας αυτός μεταφέρεται σε αγροβακτήρια και τα τελευταία μέσα στο φυτό όπου γίνεται και η έκφραση της πρωτεΐνης. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, ολοκληρώθηκε το πρώτο στάδιο της προετοιμασίας, η κλωνοποίηση του cDNA της HC-Pro στο φορέα pART 7.



Εικόνα 3.5.α Η κατασκευή pART 7 :HC-Pro. Ο cDNA κλώνος της HC-Pro είναι συνδεδεμένος στον υποκινητή 35S του ιού της μωσαϊκής του κουνουπιδιού (CaMV) στην περιοριστική θέση Kpn I. Η κλωνοποίηση έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε στο 3' άκρο του κλώνου δεν υπάρχει αναγεννημένη θέση περιορισμού. Η θέση Not I που υπάρχει στα άκρα είναι η θέση ένθεσης της κατασκευής στο φορέα έκφρασης pART 27. Οι θέσεις EcoR I χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση της επιτυχίας της κατασκευής.

Αρχικά το cDNA της HC-Pro ήταν κλωνοποιημένο στο φορέα pT3T7 (βλ. 2.1.2) απ'όπου και αποκόπηκε με την εξής διαδικασία: Αρχικά έγινε πέψη της κατασκευής με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Sal* I και στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία με το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης Ι της E. coli (βλ. 2.2.1.5). Στη συνέχεια ακολούθησε δεύτερη πέψη με την ενδονουκλεάση Kpn I. Κατόπιν το μείγμα της πέψης ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης και το ένθεμα απομονώθηκε (βλ.2.2.1.3 και 2.2.1.4). Ο πλασμιδιακός φορέας προετοιμάστηκε για σύνδεση με το ένθεμα με τον εξής τρόπο: Πέψη με το ένζυμο περιορισμού Xba I και στη συνέχεια επεξεργασία με Klenow πολυμεράση. Σε δεύτερο στάδιο έγινε πέψη με το ένζυμο Kpn I. Η σύνδεση του φορέα pART 7 με το ένθεμα HC-Pro έγινε όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.1.5. Η επιτυχία της κατασκευής ελέγχθηκε με περιοριστική ανάλυση με το ένζυμο EcoR I ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Για το ένζυμο αυτό υπάρχουν δύο θέσεις περιορισμού στην κατασκευή. Μία στον πλασμιδιακό φορέα και μία κοντά στο 3' άκρο του cDNA του HC-Pro. Πέψη με το ένζυμο EcoR I και ηλεκτροφορητική ανάλυση δίνει πληροφορίες για την επιτυχή ένθεση και για τον σωστό προσανατολισμό του ενθέματος (Εικ. 3.5.α και 3.5.β).



Εικόνα 3.5.β. Περιοριστική και ηλεκτροφορητική ανάλυση της κατασκευής HC:pART7. Η περιοριστική ανάλυση έγινε τη χρήση του ενζύμου *Eco* R I (Εικ. 3.5.α). Από τους 12 κλώνους που ελέγχθηκαν, οι υπ'αριθμ. 1,2 και 8 ήταν σαφώς θετικοί, οι υπ'αριθμ. 5, 10 και 12 σαφώς αρνητικοί ενώ οι υπ'αριθμ. 3, 4, 6, 7, 9 και 11 φέρουν μία ζώνη που βρίσκεται στο επιθυμητό μήκος αλλά για το χαρακτηρισμό τους είναι αναγκαία περαιτέρω περιοριστική ανάλυση. Μ, μάρτυρας μεγέθους λ *Bst* E II. Η πηκτή αγαρόζης είναι 1 % κ.β.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Το ιοειδές PSTVd υπόκειται σε μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων.

Στα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μόλυνση φυτών τομάτας με το ιοειδές PSTVd έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των μικρών RNA μορίων που είναι χαρακτηριστικά κατά τη μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων. Τα μικρά, χαρακτηριστικά RNA μόρια αποτελούνται από δύο διακριτές ομάδες με μήκος 22 και 23 nt αντίστοιχα (βλ. 3.3.1 και Εικ. 3.3.α και 3.3.β).

Στις δύο αυτές ομάδες αντιπροσωπεύονται και οι δύο πολικότητες (+ και -) καθώς και η αριστερή και δεξιά περιοχή του RNA μορίου του ιοειδούς (βλ. 3.3.2 και 3.3.4 καθώς και Εικ. 3.3.γ, 3.3.δ, 3.3.ς και 3.3.ζ).

Η ύπαρξη αυτής της ομάδας των PTGS-χαρακτηριστικών RNA μορίων έχει παρατηρηθεί ανεξάρτητα με τον τρόπο με τον οποίο προκλήθηκε η αντίδραση PTGS (μόλυνση με ανασυνδυασμένο RNA ιό ή με εισαγωγή διαγονιδίου στα φυτά) (Hamilton and Baulcombe, 1999' Hutvagner et al., 2000'). Παρόμοια RNA μόρια έχουν εντοπιστεί και στη Drosophila κατά τη μετα-μεταγραφική σίγηση (RNAi) που προκλήθηκε από dsRNA (Hammond et al., 2000 Zamore et al., 2000) και στο C. elegans με την ίδια διαδικασία (Parrish et al., 2000). Παρ'όλα αυτά, δεν έχει διαπιστωθεί ακόμη αν τα μικρά RNA μόρια είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της λειτουργίας αυτής. Σε προηγούμενες εργασίες παρατηρήθηκε ότι η επαγωγή της μετα-μεταγραφικής σίγησης γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των μικρών RNA μορίων (Hamilton and Baulcombe, 1999' Hammond et al., 2000' Zamore et al., 2000). Στην παρούσα εργασία, η ανίχνευση των μορίων αυτών μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο πολλαπλασιασμός του ισειδούς PSTVd στο φυτό προκαλεί την επαγωγή του φαινομένου στον ξενιστή.

Στα φυτά, τα ομόλογα RNA μόρια είναι ευαίσθητα στην PTGS ανεξάρτητα με το αν το RNA που την προκαλεί προήλθε από πυρηνικά γονίδια, διαγονίδια ή επισωματικά από ιούς (Sijen and Kooter, 2000). Η παρατήρηση ότι η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων μπορεί να επαχθεί από ιικά RNA μόρια ή από γονίδια που εκφράζονται από ιικούς φορείς οδήγησε αρχικά στο συμπέρασμα ότι η όλη διαδικασία μπορεί να εξελίσσεται στο κυτταρόπλασμα. Από την άλλη-κι ενώ τα mRNA μόρια έχουν κυτταροπλασματική φάση-το RNA του ιοειδούς αντιγράφεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα. Το γεγονός ότι το ιοειδές PSTVd υπόκειται σε μετα-μεταγραφική σίγηση μπορεί να οδηγήσει στη θεώρηση ότι η έναρξη αυτής της διαδικασίας συμβαίνει στον πυρήνα. Την ιδέα αυτή στηρίζουν πρόσφατες εργασίες που δείχνουν ότι ο μηχανισμός της PTGS ενδέχεται να έχει και μία πυρηνική φάση (Jones, 1998,1999' Mishra, and Handa, 1998). Όμως, το ενδεχόμενο να υπάρχει μία μικρή ποσότητα μορίων ιοειδούς στο κυτταρόπλασμα δεν μπορεί να αποκλειστεί αφού, όπως είναι γνωστό, το ιοειδές μπορεί να μεταφέρεται και διακυτταρικά και μέσω του φλοιώματος και να εξαπλώνεται σε όλο το φυτό (Zhu *et al.*, 2001).

Επίσης, στα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετα-μεταγραφική σίγηση είναι εμφανής τριάντα ημέρες μετά τη μόλυνση του φυτού με το ιοειδές (Εικ. 3.3.α). Αυτό είναι αναμενόμενο από τη στιγμή που τα συμπτώματα της μόλυνσης εμφανίζονται από την τρίτη εβδομάδα και ο ρυθμός αντιγραφής του ιοειδούς τη χρονική αυτή στιγμή είναι αρκετά γρήγορος. Η εμφάνιση των μικρών RNA μορίων και των συμπτωμάτων στα φυτά την ίδια χρονική περίοδο μπορεί να οδηγήσει στη θεώρηση ότι τα συμπτώματα δεν προκαλούνται από τη δράση αυτού καθ'αυτού του ιοειδούς, αλλά από την έναρξη και την εγκαθίδρυση του αμυντικού μηχανισμού της PTGS όπως συμβαίνει και στις περιπτώσεις αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR, Hypersensitive response) μετά από μόλυνση του φυτού από ιό ή βακτήριο.

Επίσης φαίνεται ότι η ποσότητα των μικρών RNA μορίων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, κατά πάσα πιθανότητα εξαιτίας της σταθεροποίησης ή της μείωσης του ρυθμού αντιγραφής του RNA του ιοειδούς (βλ. 3.3.3.2 και Εικ. 3.3.γ και 3.3.ε).

Η μετα-μεταγραφική σίγηση γονίδιων προκαλεί καταστολή στη συσσώρευση του RNA με ένα τρόπο που εξαρτάται από την

νουκλεοτιδική ομολογία και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι ο ξενιστής (εν προκειμένω η τομάτα) ελέγχει τη μόλυνση με το PSTVd μέσω αυτής της αντίδρασης. Συγκρίνοντας στελέχη PSTVd διαφορετικής παθογονικότητας δεν ήταν εφικτό να γίνει συσχετισμός της παθογονικότητας στελέχους με την ποσότητα των μικρών PTGS-τυπικών RNA μορίων που εντοπίζονται (βλ. 1.1.2, Schnölzer et al. 1985). Ο καθορισμός της ποσότητας των μικρών RNAs έγινε χρησιμοποιώντας δύο μάρτυρες, την 5S υπομονάδα του χλωροπλαστικού rRNA, που υβριδοποιείται με τον ανιχνευτή 190R(+) του ιοειδούς (βλ. Εικ. 3.3. γ και 3.3.ε) και το U1 snRNA μετά από υβριδοποίηση με ανιχνευτή το U1 RNA. Παρ'όλα αυτά δεν αποκλείστηκε το γεγονός ότι ο συσχετισμός παθογονικότητας και ποσότητας μικρών RNA μορίων δεν μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα την 58 υπομονάδα του χλωροπλαστικού RNA εξαιτίας της παρουσίας του ιοειδούς που προκαλεί γενικότερη μείωση των ποσοτήτων RNA στο φυτό επομένως και μείωση στην ποσότητα του 5S χλωροπλαστικού rRNA. Από την άλλη, το U1 snRNA πιθανόν να αποτελεί καταλληλότερο μάρτυρα αφού φαίνεται ότι η ποσότητα του δεν επηρεάζεται από την παρουσία του ιοειδούς. Τέλος, δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ένα συμπέρασμα σχετικά με την ικανότητα του φυτού να μειώνει τα επίπεδα του PSTVd μέσω της διαδικασίας της μετα-μεταγραφικής σίγησης.

4.2. Τα 5' και 3' άκρα των PTGS-τυπικών RNA μορίων

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των μικρών RNA μορίων βασίστηκε σε τροποποιήσεις των πιθανών άκρων των μορίων αυτών με τροποποιητικά ένζυμα και ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για τον εντοπισμό διαφορών στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Εξαιτίας της μικρής ποσότητας του κλάσματος των μικρών RNAs αλλά και του γεγονότος ότι στο παρασκεύασμα των RNAs υπήρχαν και μεγαλύτεραάσχετα με το PTGS-μόρια RNA, δεν κατέστη ικανός ο χαρακτηρισμός. Παρ'όλα αυτά υπάρχουν ενδεικτικά στοιχεία για τον καθορισμό του 5' άκρου. Πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι η σήμανση των μικρών RNA 2.2.1.8.3) είναι εφικτή, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο 5' άκρο των μικρών RNA μορίων (ή τουλάχιστον κάποιων από αυτά) υπάρχει υδροξυλική ομάδα (Hutvagner *et al.*, 2000).

Τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν κατά την προσπάθεια χαρακτηρισμού ίσως να οφείλονται επίσης στο γεγονός ότι το κλάσμα των PTGS-τυπικών RNA μορίων μπορεί να περιέχει μία ποικιλία μορίων με διαφορετικές ομάδες στα 5' και 3' άκρα τους.

Η υπόθεση αυτή είναι αρκετά ελκυστική γιατί με αυτή ίσως να εξηγείται και η μορφή που έχουν τα μικρά RNA μόρια στην ανάλυση κατά northern (εμφανίζουν δύο διακριτές ζώνες) (Εικ.3.3.α., 3.3.δ και 3.3.ς). Είναι δηλαδή πιθανό, τα RNA μόρια να είναι ομοιόμορφα ως προς το μέγεθος αλλά να διαφέρουν ως προς τη χημική σύνθεση με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο.

Η διαφορική χημική σύσταση των μικρών RNA μορίων μπορεί εν μέρει να στηρίξει και τη θεωρία περί σήμανσης του μορίου που είναι υπεύθυνο για τη διασυστηματική ανάπτυξη της μετα-μεταγραφικής σίγησης. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας (Μπούτλα Α. Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Κρήτης), το σήμα για τη διασυστηματική διασπορά της PTGS μπορεί να είναι ένα RNA μόριο που να έχει σημανθεί κατάλληλα (ίσως με κυκλική 2',3', φωσφορική ομάδα) για αυτή ακριβώς τη λειτουργία.

Όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα (βλ. 3.4), ο χαρακτηρισμός των μικρών RNA μορίων, που ανιχνεύονται κατά την επαγωγή μεταμεταγραφικής σίγησης γονιδίων, ίσως να ρίξει φως και στην έρευνα των κυτταρικών συστατικών που λαμβάνουν μέρος στη λειτουργία αυτή, τουλάχιστον όσον αφορά στα ένζυμα που διασπούν τα μεγάλα RNA μόρια στα αντίστοιχα μικρά, PTGS-χαρακτηριστικά RNAs.

4.3. Ο ρόλος των μικρών RNA μορίων στη μεταμεταγραφική σίγηση γονιδίων.

Παρά την εντατική έρευνα γύρω από την PTGS τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν ακόμη πολλά σκοτεινά σημεία. Δεν είναι ακόμη γνωστό το αρχικό ερέθισμα που προκαλεί τελικά την PTGS. Άγνωστο είναι επίσης και το σήμα που μεταφέρεται σε όλο τον οργανισμό και προκαλεί τη διασυστηματική διασπορά της PTGS.

Μελέτες που έχουν γίνει σε φυτά (Dalmay et al., 2000' Mourain et al., 2000') στη Drosophila (Hammond et al., 2000' Berstein et al., 2001) στο C. elegans (Ketting et al., 1999) και στη Neurospora crassa (Cogoni et al., 1997) έχουν ρίξει φως στις πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση και τη λειτουργία της μετα-μεταγραφικής σίγησης αλλά δεν έγινε ακόμη δυνατή η ακριβής τοποθέτηση τους σε κάποιο στάδιο του μονοπατιού.

Το γεγονός ότι η μετα-μεταγραφική σίγηση είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε διάφορους οργανισμούς που είναι φυλογενετικά μακρινοί μεταξύ τους σημαίνει ότι και η ίδια η λειτουργία πρέπει να είναι αρκετά συντηρημένη (ανασκοπήσεις από: Ketting and Plasterk, 2000[°] Cogoni and Macino, 2000[°] Hammond *et al.*, 2001). Πράγματι μερικές από τις πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στην PTGS παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους (Fagard *et al.*, 2000).

Μία από τις πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στην PTGS είναι μία RNA νουκλεάση τύπου ΙΙΙ (βλ. 1.2.1) που πέπτει τα mRNAs σε κομμάτια μήκους 21-23 nt έχοντας ως οδηγό ένα antisense ομόλογο του mRNA που πρόκειται να αποδομηθεί (Berstein *et al.*, 2000). Αυτό το ένζυμο ίσως να είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των μικρών RNA μορίων ή να χρησιμοποιεί τα μικρά antisense RNAs ως οδηγούς (Bass, 2000).

Λαμβάνοντας υπ'όψη τα παραπάνω, ένα πιθανό μοντέλο της επαγωγής της PTGS μετά από μόλυνση φυτών τομάτας με το ιοειδές PSTVd είναι το εξής: Το ιοειδές εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου αρχίζει και αντιγράφεται με τη βοήθεια της πολυμεράσης τύπου ΙΙ (βλ. 1.1.2.). Στην συνέχεια, λόγω της αντιγραφής σχηματίζονται παροδικά δίκλωνα μόρια του ιοειδούς (ενδιάμεσα προϊόντα αντιγραφής)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

που αναγνωρίζονται από μία πρωτεΐνη (πιθανώς RNAαση τύπου III) που πέπτει το δίκλωνο μόριο σε κομμάτια μήκους 21-23 nt. Ο αρνητικός (antisense) κλώνος αναγνωρίζεται από ένα σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA (RISC) που τον χρησιμοποιεί ως οδηγό για την πέψη ώριμων RNA μορίων του ιοειδούς ενώ ο θετικός κλώνος (sense) αναγνωρίζεται από μία RNA πολυμεράση εξαρτώμενη από RNA (RdRP) που τον αντιγράφει δίνοντας νέα antisense μόρια που χρησιμοποιούνται στον προηγούμενο κύκλο (βλ. 1.2.1). Το μοντέλο αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορετική ικανότητα πυροδότησης που έχουν τα sense και antisense RNA μόρια και το γεγονός ότι το dsRNA έχει μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής PTGS απ'ότι τα μονόκλωνα μόρια. Θεωρώντας ότι η RNA νουκλεάση τύπου ΙΙΙ επιλέγει ως οδηγούς τα antisense RNA (βλ.1.2.1), η περίσσεια των sense μορίων θα καταλήξει στην RdRP που με τη σειρά της θα δώσει περισσότερα μόρια antisense για να συνεχίσουν τον κύκλο.

Τα μικρά RNA μόρια, θα μπορούσαν επίσης να αποτελούν και το σήμα για τη διασυστηματική διασπορά της PTGS. Δεδομένα που προέκυψαν από αυτή την εργασία (Εικ. 3.3.ς) δείχνουν ότι τα μικρά RNA μόρια εντοπίζονται και στο βλαστό του φυτού υποδηλώνοντας ότι η μεταφορά τους γίνεται μέσω του φλοιώματος. Πράγματι, πρόσφατη εργασία αποδεικνύει ότι το ιοειδές μετακινείται μέσω του φλοιώματος. Συγκεκριμένα υπάρχει η υπόθεση ότι ακολουθεί την ίδια πορεία με το σήμα για τη διασυστηματική PTGS (Zhu *et al.*, 2001[°] Voinnet *et al.*, 1998)

Το σήμα για τη διασυστηματική PTGS θα μπορούσε επίσης να είναι ένα RNA μόριο μεγαλύτερο από 21-23 nt, που θα παράγεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις αλλά θα είναι επίσης αρκετά μικρό έτσι ώστε να μπορέσει να αναγνωρισθεί από παράγοντες σίγησης και να προκαλέσει την επαγωγή του φαινομένου. Ένα τέτοιο υποψήφιο μόριο εμφανίζεται στις αναλύσεις κατά northern και έχει μήκος 26 nt περίπου, ποσότητα υπάρχει σε μικρότερη και εμφανίζεται μετά από υβριδοποιήσεις με όλους τους ανιχνευτές PSTVd που χρησιμοποιήθηκαν (Εικ. 3.3.α, 3.3.β, 3.3.δ, 3.3.ς και 3.3.ζ). Το γεγονός ότι το μόριο αυτό

είναι ελάχιστα μεγαλύτερο από τα PTGS-τυπικά μικρά RNA μόρια, καθιστά λιγότερο πιθανό το ενδεχόμενο το μόριο αυτό να παίζει κάποιο ρόλο στην κάθ'αυτού διαδικασία σίγησης διότι το μεγαλύτερο μήκος του (26 nt avti για 21-23 nt) αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την αναγνώρισή του από την RNAάση τύπου III που εμπλέκεται στο μηχανισμό. Αυτό δε σημαίνει ότι το μόριο μήκους 26 nt δε συνδέεται στην RNAάση τύπου III αλλά πιθανών να συνδέεται με μικρότερη συνάφεια σε σχέση με τα μόρια μήκους 21-23 nt. Επίσης, το γεγονός ότι το μόριο αυτό περιέχει 4 ή 5 νουκλεοτίδια περισσότερα από τα μικρά RNA μόρια το καθιστούν ευκολότερα «αναγνωρίσιμο», μέσα στο πλήθος των μικρών μορίων, από κάποιο πρωτεϊνικό μόριο που ίσως εμπλέκεται στη μεταφορά του σήματος.

4.4. Προοπτικές και μελλοντική εργασία

Μέχρι στιγμής υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα για το συσχετισμό της PTGS με τη σίγηση γονίδιων που εξαρτάται από ομολογία (Depicker and van Montagu, 1997' Sijen and Kooter, 2000' Wassenegger 2000).

Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα φαινόμενα είναι η παρατήρηση ότι η μόλυνση με PSTVd έχει ως αποτέλεσμα τη μεθυλίωση αλληλουχιών DNA του ιοειδούς που εισήχθη σε διαγονιδιακά φυτά (Wassenegger, 2000). Αργότερα βρέθηκε ότι το ελάχιστο μήκος της αλληλουχίας DNA που μεθυλιώνονταν, χρησιμοποιώντας ως μήτρα RNA, ήταν 30 bp και η μεθυλίωση ήταν συνεχόμενη καθ'όλο το μήκος του εντιθέμενου cDNA του ιοειδούς (Pelissier and Wassenegger, 2000). Το μικρό αυτό μήκος της μεθυλιωμένης DNA αλληλουχίας έχει εκπληκτική ομοιότητα με το μήκος που παρατηρείται στα μικρά PTGS-χαρακτηριστικά RNA μόρια. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, ίσως τα μικρά RNAs να είναι ένας σύνδεσμος μεταξύ της PTGS και της εξαρτώμενης από ομολογία μεταγραφικής σίγησης (TGS). Λαμβάνοντας υπ'όψη το γεγονός ότι τα μικρά RNA μόρια αντιπροσωπεύουν όλο το γένωμα του ιοειδούς, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η μόλυνση ενός ξενιστή με το ιοειδός

<u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>

PSTVd μπορεί να προκαλέσει μετα-μεταγραφική (PTGS) και μεταγραφική σίγηση (TGS) γονιδίων του ξενιστή που παρουσιάζουν μία κάποια-έστω και μικρή –ομολογία με το γένωμα του ιοειδούς. Η υπόθεση αυτή μπορεί επίσης να εξηγήσει και τη διαφορά στην παθογονικότητα μεταξύ των διαφόρων στελεχών του ιοειδούς. Με την πρόοδο των προγραμμάτων αλληλούχισης φυτικών γενωμάτων, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν κάποιες μικρές ποικιλόμορφες περιοχές σε ιοειδή με διαφορετική παθογονικότητα, παρουσιάζουν ομολογίες με σημαντικά γονίδια των φυτών ξενιστών.

Εκτός από αυτή την ερευνητική προοπτική που ανοίγεται, υπάρχουν και άλλες περιοχές έρευνας αποκλειστικά σε ότι αφορά στα μικρά RNAs. Η απομόνωση και κλωνοποίηση των μορίων αυτών σε κατάλληλους φορείς θα καταστήσει δυνατή την ανάλυση της αλληλουχίας τους απαντώντας στο ερώτημα αν το κλάσμα των μικρών RNAs αποτελείται από αλληλοεπικαλυπτόμενα ή συνεχόμενα μόρια. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό θα δώσει νέα στοιχεία γύρω από τη ρύθμιση και τη λειτουργία του φαινομένου.

Ένα άλλο πεδίο έρευνας που μας απασχολεί είναι η διερεύνηση του σήματος για την διασυστηματική σίγηση γονιδίων. Η γνώση αυτή ίσως καταστήσει ικανή την εργαστηριακή παραγωγή τέτοιων μορίων-σημάτων που θα αποτελέσουν ωφέλιμο εργαλείο στη βιοτεχνολογία κυριότερα σε εφαρμογές όπως στην αντίσταση καλλιεργούμενων ειδών σε διάφορα παθογόνα.

Η έρευνα του φαινομένου της μετα-μεταγραφικής σίγησης (PTGS ή RNAi), είναι τα τελευταία χρόνια ένα από τα πιο επίκαιρα και ενδιαφέροντα πεδία. Το γεγονός ότι ο μηχανισμός αυτός υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς-από τα φυτά μέχρι τα θηλαστικά-με ελάχιστες διαφοροποιήσεις δίνει απεριόριστες ερευνητικές εφαρμογές. Επίσης η μελέτη του μηχανισμού αυτού σε οργανισμούς-μοντέλα γενετικής και αναπτυξιακής έρευνας (*Arabidopsis, Drosophila, C. elegans, z*ebrafish) των οποίων το γονιδίωμα είναι σχεδόν ή πλήρως αποκρυπτογραφημένο, διευκολύνει κατά πολύ την έρευνα.

<u>4.4. Προοπτικές και μελλοντική εργασία</u>

Ήδη, η χρήση της PTGS ως εργαλείο γονιδιακής έρευνας έχει δώσει τα πρώτα αποτελέσματα στο *C. elegans* (Frazer *et al.*, 2000' Gönczy *et al.*, 2000' ανασκόπηση Hammond *et al.*, 2001), στο *Arabidopsis* (Levin *et al.*, 2000) και στη *Drosophila* (Kennerdell and Carthew, 1998' Clemens *et al.*, 2000). Βέβαια, το μεγάλο ερώτημα των περισσότερων ερευνητών είναι αν η PTGS εκδηλώνεται στον άνθρωπο και σε ποιο βαθμό. Με την ταχύτητα που διεξάγεται αυτή τη στιγμή η έρευνα και με τα καινούρια δεδομένα από μελέτες PTGS σε ποντίκια (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000) και το zebrafish (Wargelius *et al.*, 1999' Li *et al.*, 2000' Zhao *et al.*, 2001), η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα δε θα αργήσει να δοθεί. Ήδη από τώρα έχουν ξεκινήσει συζητήσεις και οραματισμοί για τη χρήση της PTGS στη γονιδιακή έρευνα του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και ως μέθοδο για γονιδιακή θεραπεία.
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adoute A. (2000) Small but mighty timekeepers. Nature, 408, 37-38.

Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J. M. Jr., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L. and Vance V. B. (2000) A calmodulinrelated protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **290**, 142-144.

Anandalakshmi R., Pruss J. G., Ge X., Marathe R., Mallory C. A., Smith H. T. and Vance B. V. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13079-13084.

Atencia E. A., Montes M., Günther Sillero M. A. and Sillero A (2000) Several dinucleoside polyphosphates are acceptor substrates in the T4 RNA ligase catalyzed reaction. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1707-1714.

Bass B. L. (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, **101**, 235-238.

Baulcombe D. C. (1996) RNA as a target and an initiator of posttranscriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, **32**, 79-88.

Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 109-113.

Baulcombe D. C. (2001) RNA silencing. Diced defence. Nature, 409, 295-6.

Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. and Hannon G. J. (2001) Role of a bipentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.

Bosher J. M. and Labouesse M. (2000) RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nature cell biology*, **2**, E31-E36.

Brigneti G., Voinnet O., Li W-X., Ji L-H., Ding S-W. and Baulcombe D. (1998) Viral pathogenicity determinants are supressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana. EMBO J.*, **17**, 6739-6746.

Carrington J. C. (2000) Moving targets. Nature, 408, 150-151.

Catalanotto C., Azzalin G., Macino G. and Cogoni C. (2000) Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, **404**, 245.

Chuang C-F. and Meyerowitz E. M. (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 4985-4990.

Citovsky V. and Zambryski P. (2000) Systemic transport of RNA in plants. *Trends in plant science*, **5**, 52-54.

Clemens J. M., Worby C. A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B. A. and Dixon J. E.(2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 6499-6503.

Cogoni C. and Macino G. (1997) Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10233-10238.

Cogoni C. and Macino G. (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, **399**, 166-169.

Cogoni C. and Macino G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 638-643.

Dalmay T., Hamilton A., Mueller E. and Baulcombe D. C. (2000) *Potato Virus X* amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell*, **12**, 369-379.

Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S. and Baulcombe D. C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.

Depicker A. and van Montagu (1997) Post-trascriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 373-382.

Diener T. O. (1971a) Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, **45**, 411-428.

Fagard M. and Vaucheret H. (2000a) (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 167-194.

Fagard M. and Vaucheret H. (2000b) Systemic silencing signal(s). *Plant* Mol. Biol., 43, 285-293.

Fagard M., Boutet S., Morel J-B., Bellini C. and Vaucheret H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for posttranscriptional gene silencing in plants, quelling in fungi and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 11650-11654.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.

Frazer A. G., Kamath R. S., Zipperlen P., Martinez-Campos M., Sohrmann M. and Ahringer J. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systemic RNA interference. *Nature*, **408**, 325-330.

Gast F-U., Kempe D. and Sänger H.L. (1998) The dimerization domain of Potato Spindle Tuber Viroid, a possible hallmark for infectious RNA. *Biochemistry*, **37**, 14098-14107.

Gönczy P. *et al.* (2000) Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, **408**, 331-336.

Grierson D., Fray R. G., Hamilton A. J., Smith C. J. S. and Watson C.
F. (1991) Does cosupression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA? *Trends Biotechnol.*, 9, 122-123.

Grishok A., Tabara H. and Mello C. C. (2000) Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans. Science*, **287**, 2494-2497.

Gross H. J., Liebl U., Alberty H., Krupp G., Domdey H., Ramm K. and Sänger, H. L. (1981) A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Biosci Rep*, **1**, 235-41.

Gruner R., Fels A., Qu F., Zimmat R., Steger G. and Riesner D. (1995) Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology*, **209**, 60-69.

Hamilton A. J. and Baulcombe D. C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.

Hammann C., Hormes R., Sczakiel G. and Tabler M. (1997). A spermidine-induced conformational change of long-armed hammerhead ribozymes: Ionic requirements for fast cleavage kinetics. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4715-4722.

Hammond R. W. (1994) Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology*, **201**, 36-45.

Hammond R. W. and Zhao Y. (2000) Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by *Potato spindle tuber viroid. MPMI*, **13**, 903-910.

Hammond S. M., Bernstein E., Beach D. and Hannon G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, **404**, 293-296.

Hammond S. M., Caudy A. A. and Hannon G. J. (2001) Posttranscriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews*, **2**, 110-119.

Harders J., Lukacs N., Robert-Nicoud M., Jovin T. M. and Riesner D. (1989) Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in *situ* hybridisation and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941-3949.

Herold T. (1990) PhD thesis, University of Giessen, Germany.

Hu Y., Feldstein P. A., Bottino P. J. and Owens R. A. (1996) Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. *Virology*, **219**, 45-56.

Hunter C. P. (2000) Gene silencing: Shrinking the black box of RNAi. *Current Biology*, **10**, 137-140.

Hutvágner G., Mlynárová L. and Nap J. P. (2000) Detailed characterization of the posttranscriptional gene-silencing-related small RNA in a GUS gene-silenced tobacco. *RNA*, **6**, 1445-1454.

Jones A. L., Thomas C. L. and Maule A. J. (1998) *De novo* methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J.*, **17**, 6385-6393.

Jones L., Hamilton A. J., Voinnet O., Thomas C. L., Maule A. J. and Baulcombe D. C. (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell*, **11**, 2291-2301.

Jorgensen R. (1990) Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.*, **8**, 340-344.

Kasshau D. K. and Carrington C. J. (1998) A counterdefence strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell*, **95**, 461-470.

Kennerdell J. R. and Carthew R. W. (2000) Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. Nature Biotechnology., **18**, 896-898. Kennerdell J.R. and Carthew R. W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, **95**, 1017-1026.

Ketting R. F. and Plasterk R. H. A. (2000) A genetic link between cosuppression and RNA interference in *C. elegans. Nature*, **404**, 296-298.

Ketting R. F., Haverkamp T. H., van Luenen H. G. and Plasterk R. H. (1999) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, **99**, 133-141.

Kinoshita Y., Nishigaki K. and Husimi Y. (1997) Fluorescence-, isotope- or biotin-labeling of the 5'-end of single-stranded DNA/RNA using T₄ RNA ligase. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3747-3748.

Kooter J. M., Matzke M. A. and Meyer P. (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.*, **9**, 340-347.

Lakshman D. K. and Tavantzis S. M. (1993) Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *Arch. Virol.*, **128**, 319-331.

Levin J. Z., de Framond A. J., Tuttle A., Bauer M. W. and Heifetz P. B. (2000) Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in *Arabidopsis* and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis *Plant Mol. Biol.*, **44**, 759–775.

Li Y. X., Farrell M. J., Liu R., Mohanty N. and Kirby M. L. (2000) Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev. Biol.*, **217**, 394-405.

Llave C., Kasschau K. D. and Carrington J. C. (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 13401-13406.

Lucy A. P., Guo H-S., Li W-X. and Ding S-W. (2000) Suppression of post transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.*, **19**, 1672-1680.

Marathe R., Anandalakshmi R., Smith T. H., Pruss G. J. and Vance V. B. (2000) RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.*, **43**, 295-306.

Martinez de Alba A. E. (2000) PhD. thesis, Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spain. Marx J. (2000) Interfering with gene expression. Science, 288, 1370-1372.

Matzke M.A., Mette M. F., Ayfsatz W., Jakowitsch J. and Matzke A. J. M. (1999) Host defenses to parasitic sequences and the evolution of epigenetic control mechanisms. *Genetica*, **107**, 271-287.

Meins F. (2000) RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**, 261-273.

Mishra K. K and Handa A. K (1998) Post-transcriptional silencing of pectin methylesterase gene in transgenic tomato fruits results from impaired pre-mRNA processing. *Plant J.*, **14**, (5) 583-592.

Montgomery M. K., Xu SQ. and Fire A. (1998) RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis* elegans. Proc. Natl. Acad. Sci., **95**, 15502-15507.

Mourrain P., Béclin C, Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J-B., Jouette D., Lacombe A-M., Nikic S., Picault N., Rémoué K., Sanial M., Vo T-A. and Vaucheret H. (2000) *Arabidopsis SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533-542.

Mühlbach H.-P. and Sänger H. L. (1979) Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature*, **278**, 185-188.

Palauqui J-C. and Vaucheret H. (1998) Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 9675-9680.

Parrish S., Fleenor J., Xu SQ, Mello C. and Fire A. (2000) Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular Cell*, **6**, 1077-1087.

Pelissier T. and Wassenegger M. (2000) A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA*, **6**, 55-65.

Pikaard C. S. (1999) Nucleolar dominance and silencing of transcription. *Trends in plant science*, **4**, 478-483.

Plasterk R. H. A. and Ketting R. F. (2000) The silence of the genes. Curr. Opin. Genet. Devel., 10, 562-567.

Ratcliff F. G., MacFarlane S. A. and Baulcombe D. C. (1999) Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, **11**, 1207-1216.

Romaniuk P. J. and Uhlenbeck O. C. (1983) Joining of RNA molecules with RNA ligase. *Methods Enzym.*, **100**, 52-59.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Sänger H. L., Klotz G., Riesner D., Gross H. J. and Kleinschmidt A.K. (1976) Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 3852-6.

Sänger H. L., Schiebel W., Riedel L., Pelissier T. and Wassenegger M. (1996) The possible links between RNA-directed DNA methylation (RdDM), sense and antisense RNA, gene silencing, symptom-induction upon microbial infections and RNA-directed RNA polymerase (RDRP). *Proceedings from the 8th international symposium on molecular plant-microbe interactions, Knoxville, Tennessee, USA* July 14-19,1996.

Sano T., Candresse T., Hammond R. W., Diener T. O. and Owens R. A. (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10104-8.

Schindler I. M. and Mühlbach H. P. (1992) Involvement of the nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a re-evaluation. *Plant Science*, **84**, 221-229.

Schmitz A. and Riesner D. (1998) Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different Potato Spindle Tuber Viroid strains. *RNA*, **4**, 1295-1303.

Schnölzer M., Haas B., Ramm K., Wang Z. F. and Sänger H. L. (1985) Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.*, **4**, 2181-2190.

Sharp P. (1999) RNAi and double strand RNA. *Genes & Dev.*, **13**, 139-141.

Sijen T. and Kooter J. M. (2000) Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays*, **6**, 520-531.

Spiesmacher E., Mühlbach H. P., Tabler M. and Sänger H. L. (1985) Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors. *Biosci. Rep.*, **5**, 251-265. **Tabler M. and Tsagris M.** (1990) Viroid replication mechanisms. *NATO* ASI Series, **H 41**, 185-205.

Tabler M., Günther I., Kern R. and Sänger H. L. (1989) A microscale procedure for isolating and sequencing the viroid RNA present in one gram of infected leaf tissue. *J. Virol. Meth.*, **23**, 111-126.

Takaiwa F. and Sugiura M. (1981) Heterogeneity of 5S RNA species in tobacco chloroplasts. *Mol. Gen. Genet.*, **182**, 385-389.

Tsagris M., Tabler M. and Sänger H. L. (1991) Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1605-1612.

Tsagris M., Tabler M., Mühlbach H-P., and Sänger H. L. (1987) Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed *in vitro* to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO J.*, **6**, 2173-2183.

van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. and Stuitje A. R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, **2**, 291-299.

Voinnet O., Lederer C. and Baulcombe D. C. (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana. Cell*, **103**, 157-167.

Voinnet O., Vain P., Angell S. and Baulcombe D. C. (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, **95**, 177-187.

Voinnet O., Pinto Y. M. and Baulcombe D.C. (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *96*, 14147-141522.

Wang L, and Ruffner D. E. (1998) Oligoribonucleotide circularization by "template-mediated" ligation with T₄ RNA ligase: synthesis of circular hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2502-2504.

Wargelius A., Ellingsen S. and Fjose A. (1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 156-161.

Wassenegger M. (2000) RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol. Biol.*,43, 203-220.

Wassenegger M., Heimes S. and Sänger H.L. (1994) An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious mutant via a complementary deletion *in vivo. EMBO J.*, **13**, 6172-6177.

Waterhouse P. M., Graham M. W. and Wang M-B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13959-13964.

Wianny F. and Zernicka-Goetz M. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biol.*, **2**, 70-75.

Yang D., Lu H. and Erickson J. W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Current Biology*, **10**, 1191-1200.

Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P. A. and Bartel D. P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.

Zhang X-H., and Chiang V. L. (1996) Single-stranded DNA ligation by T₄ RNA ligase for PCR cloning of 5'-noncoding fragments and coding sequence of a specific gene. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 990-991.

Zhao Z., Cao Y., Li M. and Meng A. (2001) Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Devel. Biol.*, **229**, 215-223.

Zhu Y., Green L., Woo Y-M., Owens R. and Ding B. (2001) Cellular basis of Potato Spindle Tuber Viroid systemic movement. *Virology*, **279**, 69-77.