

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΖΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ, ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ
ΣΙΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΩΝ ΠΟΥ
ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΔΙΚΛΩΝΟ RNA ΤΟΥ CMV**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΥΘΥΜΙΑ ΤΣΑΓΡΗ

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2004**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

ΤΖΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ, ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ
ΣΙΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΩΝ ΠΟΥ
ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΔΙΚΛΩΝΟ RNA ΤΟΥ CMV**

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ:

**ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΥΘΥΜΙΑ ΤΣΑΓΡΗ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ**



**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2004**

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την καθηγήτρια κ. Ευθυμία Τσαγρή που ήταν η επιβλέπουσα καθηγήτρια της μεταπτυχιακής μου διατριβής για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τη μοριακή βιολογία των φυτών, για την επιστημονική καθοδήγηση της και για την ενθάρρυνση που μου έδινε σε όλη τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Πάντοτε έδειχνε ενθουσιασμό όταν της παρουσίαζα τα αποτελέσματα των ερευνητικών μου προσπαθειών. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Martin Tablet για τις πολύτιμες υποδείξεις του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης τον καθηγητή κ. Νίκο Πανόπουλο, που είναι αξιολογητής της παρούσας διατριβής και την καθηγήτρια κ. Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, που είναι η υπεύθυνη καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών». Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω για άλλη μια φορά τους καθηγητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, απόφοιτος του οποίου είμαι, γιατί ήταν αυτοί που μου εμφύσησαν την αγάπη για την επιστήμη μου και με ενθάρρυναν να συνεχίσω τις σπουδές μου σε μεταπτυχιακό επίπεδο.

Θα ήταν όμως παράλειψη μου να μην αναφερθώ στους ανθρώπους με τους οποίους συνεργάστηκα στο εργαστήριο. Τον κ. Κρίτωνα Καλαντίδη που παρακολουθούσε καθημερινά την πορεία των πειραμάτων μου και μου πρότεινε το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Την κ. Μπούτλα Αλεξάνδρα που αποτέλεσε την πρώτη μου δασκάλα στο εργαστήριο και την κ. Σεργία Τζωρτζακάκη που είναι πάντα πρόθυμη να προσφέρει τις τεχνικές συμβουλές της.

Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές μου, που αποτέλεσαν τους συνοδοιπόρους σ' αυτή τη διαδρομή. Τον Νίκο Βρεττό με τον οποίο συνεργαστήκαμε αρμονικά στο εργαστήριο και που πάντοτε ήταν πρόθυμος να ακούσει τους προβληματισμούς μου. Επίσης την Σπυριδούλα Χαρόβα και την Κατερίνα Πετράκη για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τα αδέρφια μου που με στήριξαν ανεπιφύλακτα σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
1. Εισαγωγή	
1.1. Σίγηση μέσω RNA (RNA silencing).....	2
1.2. Ίικοί καταστολείς της γονιδιακής σίγησης.....	5
1.3. Οι λειτουργικοί ρόλοι της σίγησης μέσω RNA.....	6
1.4. RNA κατευθυνόμενη μεθυλίωση του DNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM).....	8
1.5. Μεθυλτρανσφεράσες των φυτών.....	12
1.6. Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών στις ιϊκές μολύνσεις...	13
1.7. Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού που εκφράζουν dsRNA ομόλογο του γενώματος του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς.....	13
2. Υλικά και μέθοδοι	
2.1. Υπόστρωμα Murashige & Skoog.....	18
2.2. Απολύμανση των σπόρων, σπορά και μεταφύτευση των σποροφύτων.....	18
2.3. Απομόνωση φυτικού DNA.....	19
2.4. Ανάλυση κατά Southern για την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου.....	19
2.4.1. Πέψεις γενωμικού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	20
2.4.2. Τριχοειδής μεταφορά του DNA σε νάυλον μεμβράνη.....	20
2.5. Ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή.....	21
2.6. Υβριδοποίηση.....	22
2.7. Παρασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή μέσω <i>in vitro</i> αντιγραφής.....	22
2.8. Απομόνωση φυτικού RNA.....	23
2.9. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μεταγραφόμενου διαγονιδίου.....	23
2.10. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση των siRNAs.....	23
2.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	24
2.12. Μετασχηματισμός βακτηριών με θερμικό σοκ.....	25
2.13. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	25
2.14. Απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης.....	25
2.15. Κλωνοποίηση ενθεμάτων μέσω της αντίδρασης σύνδεσης.....	25
3. Αποτελέσματα - Συζήτηση	
3.1. Κατά Southern ανάλυση των απογόνων της T ₄ γενιάς της σειράς CMV28.....	27
3.2. Η αντίδραση των διαγονιδιακών σειρών μετά από υποβολή τους σε μηχανική μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV).....	27
3.3. Ανάλυση της μεθυλίωσης με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση και ανάλυση κατά Southern.....	28
3.4. Η επιλογή των περιοριστικών ενζύμων για την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου των CMV28 σειρών.....	30
3.5. Το αναμενόμενο πρότυπο ζωνών από την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου των CMV28 σειρών.....	31
3.6. Ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου των διαγονιδιακών σειρών CMV28.....	32
3.6.1. Ανάλυση της μεθυλίωσης των σειρών CMV28C και CMV28D.....	33
3.6.2. Ανάλυση της μεθυλίωσης των σειρών CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E.....	36
3.7. Η δομή του “Super” εκκινητή των διαγονιδιακών σειρών CMV28.....	41

3.8. Κλωνοποίηση των τμημάτων ocs και mas του εκκινητή στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript.....	42
3.9. Η επιλογή της μεθοδολογίας για την ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή των διαγονιδιακών σειρών CMV28.....	43
3.10. Ανάλυση της μεθυλίωσης της περιοχής του εκκινητή (promoter) των διαγονιδιακών σειρών CMV28.....	44
3.11. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου στις διαγονιδιακές σειρές CMV28 μετά την μόλυνση τους με τον ιό της πατάτας Y (PVY).....	46
3.12. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου στις διαγονιδιακές σειρές CMV28 μετά την μόλυνση τους με τον ιό CMV.....	47
3.13. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση των siRNAs που προέρχονται από την αποδόμηση του μετάγραφου του διαγονιδίου.....	48
4. Συζήτηση.....	50
5. Βιβλιογραφία.....	54

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σίγηση μέσω RNA (RNA silencing)

Η σίγηση μέσω RNA αποτελεί ένα μηχανισμό καταστολής της έκφρασης γονιδίων με τρόπο ειδικό ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία και στον οποίο κεντρικό ρόλο παίζουν μόρια RNA (Voinnet, 2002). Ο μηχανισμός αυτός παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ διαφόρων οργανισμών, δεικνύοντας την αρχαία καταγωγή αυτού. Έτσι ενώ αρχικά ονομάστηκε κατάπνιξη (quelling) στους μύκητες, συν-καταστολή (co-suppression) και μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (post-transcriptional gene silencing, PTGS) στα φυτά και παρεμπόδιση του RNA (RNA-interference, RNAi) στους νηματώδεις και στα θηλαστικά, σήμερα αποκαλείται με τον κοινό για όλους τους οργανισμούς όρο σίγηση μέσω RNA (RNA silencing) (ανασκόπηση από Susi *et al.*, 2004). Ο μηχανισμός της σίγησης μέσω RNA ταξινομείται σε δυο κατηγορίες, στην μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (transcriptional gene silencing, TGS) όπου παρεμποδίζεται η μεταγραφή ενός γονιδίου και στην μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS), όπου το γονίδιο μεταγράφεται αλλά τα μετάγραφα του αποδομούνται.

Ο μηχανισμός του RNA-silencing παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 90', όταν ερευνητές εισήγαγαν σε φυτά πετούνιας αντίγραφα ενός γονιδίου υπεύθυνου για το χρώμα των ανθέων της για να το ενισχύσουν. Όμως σε αντίθεση με τις προσδοκίες τους μειώθηκε ή εξαφανίστηκε το χρώμα τους. Τότε διαπίστωσαν ότι η εισαγωγή του διαγονιδίου οδήγησε στην καταστολή της έκφρασης τόσο του ιδίου όσο και του ενδογενούς ομόλογου γονιδίου. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε συν-καταστολή (co-suppression) (Van der Krol *et al.*, 1990) και αργότερα διαπιστώθηκε ότι οφείλεται σε αποδόμηση των ώριμων mRNA των γονιδίων αυτών, δηλαδή συμβαίνει σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Blokland *et al.*, 1994). Παράλληλες έρευνες έδειξαν ότι τα φυτά ανταποκρίνονται στην προσβολή από RNA ιούς με την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού αποδόμησης των ιικών RNA. Μάλιστα βρέθηκε ότι όταν οι RNA ιοί φέρουν αλληλουχίες που είναι ομόλογες με γονίδια των φυτών, τότε η ενεργοποίηση του μηχανισμού αποδόμησης των ιικών RNA και των ομόλογων mRNA είναι πιο αποτελεσματικός (Angell *et al.*, 1997). Δεδομένου ότι αυτό το φαινόμενο σίγησης συμβαίνει σε επίπεδο RNA, δηλαδή μετά τη μεταγραφή του αντίστοιχου γονιδίου ονομάστηκε ως μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (post-transcriptional gene silencing, PTGS). Παράλληλα ανάλογα φαινόμενα διαπιστώθηκαν και σε άλλους οργανισμούς.

Ωστόσο ένα εύλογο ερώτημα που παρέμενε αναπάντητο αφορούσε το παράγοντα που ενεργοποιεί το μηχανισμό αποδόμησης των μορίων mRNA. Βεβαίως ήταν προφανές ότι για να γίνεται αποδόμηση συγκεκριμένων μορίων mRNA θα πρέπει ο παράγοντας αναγνώρισης των μεταγράφων που πρόκειται να αποδομηθούν να είναι ειδικός. Η απάντηση σ' αυτό το ερώτημα ήρθε από τον Fire και τους συνεργάτες του (1998), οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα δίκλινα μόρια RNA (dsRNA) είναι πιο αποτελεσματικά στην καταστολή της έκφρασης ομόλογου ενδογενούς γονιδίου του *C. elegans* σε σύγκριση με τα sense και antisense μόρια RNA. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε RNA-interference. Παράλληλα βρέθηκε από τον Waterhouse και τους συνεργάτες του (1998) ότι τα δίκλινα μόρια RNA ενεργοποιούν το μηχανισμό του PTGS και στα φυτά. Το ίδιο αποδείχτηκε να ισχύει και σε άλλους οργανισμούς που διαθέτουν το μηχανισμό της σίγησης μέσω RNA. Έτσι οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι το κύριο μόριο έναρξης της γονιδιακής σίγησης είναι το **dsRNA**.

Τα δίκλινα μόρια RNA που επάγουν την γονιδιακή σίγηση μπορούν να δημιουργηθούν στο κύτταρο με τους ακόλουθους τρόπους: με τη ταυτόχρονη σύνθεση sense και antisense RNA μορίων, με τη μεταγραφή ανάστροφων DNA

επαναλήψεων (inverted repeats) που οδηγεί στη σύνθεση δίκλωνου mRNA, με τη δράση των κυτταρικών RNA-εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RdRps) και με τη δράση της ιϊκής RdRp κατά τον πολλαπλασιασμό των RNA ιών (Matzke *et al.*, 2001)

Τα δίκλιωνα αυτά μόρια RNA που παράγονται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου γίνονται αντιληπτά από τα Dicer-like ένζυμα, τα οποία κόβουν τα δίκλιωνα μόρια RNA σε μικρά δίκλιωνα μόρια μήκους 21-26 nt. Τα μικρά αυτά δίκλιωνα μόρια ονομάζονται **short interfering RNAs** (siRNAs) και η παραγωγή τους είναι το κοινό χαρακτηριστικό του μηχανισμού της σίγησης μέσω RNA σε όλους τους οργανισμούς. Τα siRNAs εντοπίστηκαν για πρώτη φορά από τους Hamilton και Baulcombe (1999) σε φυτικό σύστημα και μετέπειτα βρέθηκαν να παράγονται και στη δροσόφιλα από μια πρωτεΐνη τύπου RNaseIII με την κατανάλωση ATP, η οποία ονομάστηκε Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των Dicer ενζύμων διαθέτουν μια περιοχή RNA ελικάσης, μια PAZ περιοχή, δυο μοτίβα RNaseIII και από μια ή δυο περιοχές πρόσδεσης dsRNA. Ομόλογες πρωτεΐνες της Dicer που εντοπίστηκε στη δροσόφιλα έχουν βρεθεί σε πολλούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά και στο *C. elegans* έχει εντοπιστεί μια Dicer πρωτεΐνη, στη δροσόφιλα έχουν εντοπιστεί δυο και στο *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν τέσσερα γονίδια που κωδικούν Dicer-like ένζυμα. Οι δυο από αυτές, οι DCL1 και DCL4 πιθανώς διαθέτουν σήματα πυρηνικής τοποθέτησης (nuclear localization signals). Μάλιστα υπάρχουν ενδείξεις ότι η DCL1 είναι πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο πυρήνα (Papp *et al.*, 2003). Συνεπώς ενδέχεται η αποδόμηση του dsRNA στα φυτά να λαμβάνει χώρα τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και πιθανώς αυτό να ισχύει και σε άλλους οργανισμούς, όπως στη δροσόφιλα και στα θηλαστικά. Ωστόσο ως σήμερα δεν έχει επιβεβαιωθεί βιοχημικά η δράση της Dicer στην παραγωγή των siRNAs στο *Arabidopsis*, παρά μόνο σε “εκχύλισμα από έμβρυα σιταριού” (wheat extracts) από τον Tang και τους συνεργάτες του (2002).

Τα siRNAs που παράγονται από τη δράση των Dicer-like ενζύμων είναι δίκλιωνα μόρια RNA μήκους 21-26 nt με 3' προεκβαλλόμενα άκρα μήκους 2nt. Τα 3' άκρα είναι υδροξυλιωμένα και τα 5' άκρα είναι φωσφορυλιωμένα. Αυτή η δομή είναι χαρακτηριστική της δράσης των Dicer ενζύμων (επισκόπηση από Susi *et al.*, 2004). Στα φυτά έχουν εντοπιστεί δυο μεγεθών siRNAs. Αυτά που είναι 21-22 nt και ονομάζονται μικρού μήκους siRNAs (short siRNAs) και αυτά που είναι 24-26 nt και ονομάζονται μεγάλου μήκους siRNAs (long siRNAs). Ο Hamilton και οι συνεργάτες του (2002), που ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τους δυο τύπους siRNAs στα φυτά, πρότειναν ότι πιθανώς οι δυο τύποι siRNAs να παίζουν διαφορετικό ρόλο στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης. Τα μεν μικρού μήκους siRNAs (short siRNAs) πιθανώς είναι αυτά που παίζουν κεντρικό ρόλο στη στόχευση των mRNA και τα μεγάλου μήκους siRNAs (long siRNAs) πιθανώς παίζουν ρόλο στη διασυστηματική μεταφορά του σήματος της σίγησης και στη μεθυλίωση των ομόλογων DNA αλληλουχιών. Επιπλέον ο Tang και οι συνεργάτες (2003) πρότειναν ότι πιθανώς οι δυο τύποι siRNAs που εντοπίζονται στα φυτά να προέρχονται από τη δράση διαφορετικών Dicer ενζύμων, καθώς τόσο στο *Arabidopsis* όσο και στο ρύζι υπάρχουν τέσσερα Dicer-like ένζυμα. Ομοίως στους μύκητες εντοπίζονται και οι δυο τύποι siRNAs. Ενώ αντίθετα στη δροσόφιλα και στα θηλαστικά εντοπίζονται μόνο τα 21-22nt siRNAs.

Μετά την παραγωγή των siRNAs με την δράση των Dicer-like ενζύμων στα δίκλιωνα μόρια RNA, τα siRNAs ενσωματώνονται στο ενζυμικό σύμπλοκο **RNA-inducing gene silencing (RISC)** (Hammond *et al.*, 2000) με την δαπάνη ATP. Η ενεργοποιημένη πλέον RISC καθοδηγείται από τα ενσωματωμένα siRNAs στην εύρεση των συμπληρωματικών mRNAs, τα οποία τα κόβει στο κέντρο της περιοχής

υβριδισμού (Elbashir *et al.*, 2001). Έτσι επιτυγχάνεται η αποδόμηση των RNA μορίων που είναι συμπληρωματικά ως προς το dsRNA που ενεργοποίησε όλο αυτό το μηχανισμό. Η δράση του συμπλόκου RISC έχει αποδειχτεί στη δροσόφιλα και γνωρίζουμε ότι πρωτεΐνες της οικογένειας *Argonaute* συμμετέχουν σ' αυτό. Ωστόσο στα φυτά, στο *C. elegans* και στο *N. crassa* δεν έχει αποδειχτεί ως σήμερα η δράση του εν λόγω ενζυμικού συμπλόκου (Susi *et al.*, 2004).

Επίσης σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν οι RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (**RNA-dependent RNA polymerases, RdRp**). Τα γονίδια των RdRp πρωτεϊνών απαιτούνται για τον μηχανισμό της σίγησης μέσω RNA στο *C. elegans*, στο *N. Crassa* και στο *Dictyostelium discoideum*, αλλά πιθανώς δεν χρειάζονται στη δροσόφιλα και στα θηλαστικά. Το φυτό *Arabidopsis* διαθέτει τουλάχιστον τρία γονίδια RdRp, τα RDR1, RDR2 και RDR6 (επίσης γνωστή ως SDE1/SGS2). Στα φυτά έχει αποδειχτεί ότι απαιτείται η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση RDR6 για να είναι ενεργός ο μηχανισμός της σίγησης μέσω RNA. Ενώ δεν απαιτείται η RdRp πρωτεΐνη όταν το φυτό φέρει διαγονίδιο που περιέχει ανάστροφες επαναλήψεις και συνεπώς συντίθεται δίκλωνο RNA κατά τη μεταγραφή του. Όπως επίσης δεν απαιτείται η RdRp του φυτού όταν ο μηχανισμός της σίγησης επάγεται από ιό, καθώς αυτός διαθέτει τη δική του RdRp (ανασκόπηση από Susi *et al.*, 2004).

Έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί ρόλοι των RdRp πρωτεϊνών στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης. Μια ενδεχόμενη δράση της RdRp είναι η μετατροπή των έκτροπων RNAs (aberrant RNAs, abRNAs) σε δίκλωνο RNA, το οποίο ενεργοποιεί το μηχανισμό της σίγησης. Επίσης ενδεχομένως η RdRp να χρησιμοποιεί ως μήτρα και τα κομμάτια του mRNA που προκύπτουν από τη δράση της RISC, γεγονός που θα οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης των siRNAs στο κύτταρο και συνεπώς σε ενίσχυση του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης (Matzke *et al.*, 2001). Η άμεση ανάμειξη της RdRp στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης σε φυτικό σύστημα αποδείχτηκε από τον Tang και τους συνεργάτες του (2003). Απέδειξαν ότι είναι δυνατή η σύνθεση δίκλωνων μορίων RNAs από μονόκλωνο RNA σε “εκχύλισμα από έμβρυα σιταριού” (wheat extracts) είτε με την παρουσία εκκινητή είτε χωρίς την παρουσία αυτού. Επίσης απέδειξαν ότι τα aberrant μονόκλιωνα RNAs όταν είναι σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση στο κύτταρο μετατρέπονται σε δίκλιωνα μόρια RNA, τα οποία αποδομούνται στη συνέχεια σε siRNAs μήκους 24nt κυρίως. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι τα δίκλιωνα μόρια RNA που παράγονται από τη δράση της RdRp επεξεργάζονται κατεξοχήν από τη Dicer που παράγει τα long siRNAs και ενδεχομένως αυτά τα δυο ένζυμα να συνδέονται.

Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η RdRp συμμετέχει στο φαινόμενο της μεταβατικής σίγησης (**transitive silencing**) (Vaistij *et al.*, 2002). Με αυτό τον όρο περιγράφεται το φαινόμενο στο οποίο παράγονται siRNAs που αντιστοιχούν σε περιοχές του mRNA στόχου που δεν είναι συμπληρωματικές του dsRNA που ενεργοποίησε το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης. Τα νέα αυτά siRNAs ονομάζονται δευτερογενή (secondary) siRNAs. Αυτό έχει παρατηρηθεί στο *C. elegans* και στα φυτά. Στο *C. elegans* τα δευτερογενή siRNAs αντιστοιχούν στη 3' περιοχή του mRNA. Η κατεύθυνση 3' → 5' της μεταβατικής σίγησης που παρατηρείται στο *C. elegans* οδήγησε στην υπόθεση ότι τα siRNAs χρησιμοποιούνται ως εκκινητές από την RdRp για να συνθέσουν το συμπληρωματικό του mRNA στόχου. Τα dsRNAs που συνθέτονται αποδομούνται στη συνέχεια από τη Dicer με συνέπεια να παράγονται εκτός από τα πρωτογενή siRNAs και τα δευτερογενή siRNAs, γεγονός που οδηγεί σε ενίσχυση της γονιδιακής σίγησης (Sijen *et al.*, 2001). Ωστόσο στα φυτά τα δευτερογενή siRNAs αντιστοιχούν τόσο στην 5' όσο και στη 3' περιοχή του mRNA.

Αυτή η διπλή κατεύθυνση της μεταβατικής σίγησης στα φυτά δεν μπορεί βεβαίως να εξηγηθεί με το μοντέλο που προτάθηκε για το *C. elegans*. Μια πιθανή υπόθεση είναι ότι ο μηχανισμός της σίγησης οδηγεί σε αλλαγή της δομής της χρωματίνης στην περιοχή όπου εντοπίζεται το γονίδιο στόχος, με συνέπεια την παραγωγή aberrant RNAs, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε dsRNA από την RdRp του κυττάρου (Hannon, 2002). Ένα άλλο πιθανό μοντέλο που έχει προταθεί είναι ότι τα τμήματα του mRNA που προκύπτουν από τη δράση της RISC μετατρέπονται σε δίκλινα με τη δράση της RdRp, τα οποία στη συνέχεια αποτελούν στόχο της Dicer. Αυτή η δράση της RdRp μπορεί να εξηγήσει τη δυνατότητα λίγων “εκκινητών” μορίων dsRNA να πυροδοτήσουν την αποδόμηση ενός πολύ μεγάλου πληθυσμού μορίων mRNA.

Ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης είναι διασυστηματικός στα φυτά και στο *C. elegans*. Στα φυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι το σήμα μετακινείται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασμοδεσμάτων και διασυστηματικά μέσω του φλοιώματος, μιμούμενο τη κίνηση των ιών (Voinnet *et al.*, 1998). Έχει ειπωθεί η άποψη ότι τα short siRNAs πιθανώς εμπλέκονται στη τοπική μεταφορά του σήματος (Klahre *et al.*, 2002) και τα long siRNAs στη διασυστηματική μεταφορά του σήματος (Hamilton *et al.*, 2002). Ωστόσο ως σήμερα το σήμα δεν έχει χαρακτηριστεί, αλλά υποθέτουμε ότι σ’ αυτό συμμετέχουν μόρια νουκλεϊκού οξέος καθώς δρα με ειδικό τρόπο.

1.2 Ίικοί καταστολείς της γονιδιακής σίγησης

Με δεδομένο ότι ένας από τους ρόλους του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης είναι η άμυνα του φυτού έναντι των ιών, είναι λογικό οι ιοί να έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να αντιμετωπίζουν και αυτή την άμυνα του φυτού. Έτσι έχει βρεθεί ότι το γένωμα πολλών φυτικών ιών κωδικοποιεί πρωτεΐνες που καταστέλλουν το μηχανισμό της σίγησης μέσω RNA, επιδρώντας σε διάφορα σημεία του μηχανισμού της. Οι κύριοι τρόποι δράσης των ιικών καταστολέων που γνωρίζουμε σήμερα είναι οι ακόλουθοι δύο. Πρώτον, η παρεμπόδιση της γονιδιακής σίγησης στα αρχικά στάδια της δηλαδή στην παραγωγή και στην δράση των siRNAs. Δεύτερον, η καταστολή του μηχανισμού της διασυστηματικής σίγησης παρεμποδίζοντας την παραγωγή του διασυστηματικού σήματος, την μεταφορά του ή την ανταπόκριση του κυττάρου σ’ αυτό (Roth *et al.*, 2004).

Μερικοί από τους ιικούς καταστολείς της γονιδιακής σίγησης που έχουν βρεθεί είναι οι ακόλουθοι: ο HC-Pro του PVY (Potato virus Y) που είναι και ο πρώτος καταστολέας της γονιδιακής σίγησης που ανακαλύφτηκε (Anandalakshmi *et al.*, 1998). Ο καταστολέας HC-Pro επιδρά στον μεταβολισμό των μικρών RNAs, τόσο των siRNAs όσο και των miRNAs. Όσον αφορά τα siRNAs μειώνει το πληθυσμό τους, ενώ όσο αφορά τα miRNAs αυξάνει τον πληθυσμό τους (Mallory *et al.*, 2002). Επίσης έχει τη δυνατότητα να καταστείλει το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης σε ιστούς όπου ήδη έχει εγκαθιδρυθεί η σίγηση. Ωστόσο δεν μπλοκάρει το διασυστηματικό σήμα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη HC-Pro αλληλεπιδρά με ένα φυτικό παράγοντα, την πρωτεΐνη που μοιάζει με καλμοδουλίνη, rgs-CaM (regulator of gene silencing calmodulin-like protein) (Roth *et al.*, 2004).

Ένας άλλος πολύ γνωστός ιικός καταστολέας είναι η πρωτεΐνη 2b του CMV (Cucumber mosaic virus). Αυτός μπλοκάρει το μηχανισμό της διασυστηματικής σίγησης. Ωστόσο δεν έχει τη δυνατότητα να καταστείλει το μηχανισμό της σίγησης όταν αυτός έχει ήδη εγκαθιδρυθεί, σε αντίθεση με το HC-Pro. Ιδιαίτερα

αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο 2b εντοπίζεται στον πυρήνα και μάλιστα ότι είναι απαραίτητη η ικανότητα του να εισέρχεται στο πυρήνα για να εκδηλώσει την κατασταλτική του δράση έναντι της γονιδιακής σίγησης (Lucy *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2004)

Ένας άλλος καταστολέας που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ο P19, που είναι μια πρωτεΐνη που κωδικεύεται από το γένωμα των ιών TBSV (Tomato bushy stunt virus) και CymRSV (Cymbidium ringspot virus). Βρέθηκε ότι ο P19 δρα ως καταστολέας δεσμεύοντας και απομονώνοντας τα siRNAs. Έτσι δεν είναι δυνατόν να ενσωματωθούν στη RISC και να την οδηγήσουν προς τα συμπληρωματικά μόρια mRNA (Silhavy *et al.*, 2002; ανασκόπηση από Moissiard and Voinnet, 2004).

Ωστόσο ως σήμερα έχουν βρεθεί και άλλοι ιικοί καταστολείς της γονιδιακής σίγησης, όπως ο P25 του PVX (Potato virus X), η AC2 του ACMV (African cassava mosaic virus), η P1 του RYMV (Rice yellow mottle virus) και πολλοί άλλοι.

1.3 Οι λειτουργικοί ρόλοι της σίγησης μέσω RNA

Η γονιδιακή σίγηση αποτελεί πιθανότατα ένα μηχανισμό άμυνας των οργανισμών έναντι των ιών και των μεταθετών στοιχείων. Νέα πειραματικά δεδομένα όμως, αποδίδουν στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης ρυθμιστικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση και στη διαμόρφωση της χρωματίνης (Denli and Hannon, 2003).

Η υπόθεση ότι η σίγηση μέσω RNA λειτουργεί ως μηχανισμός άμυνας του φυτού έναντι των ιών στηρίζεται σε ορισμένα δεδομένα. Πρώτον, η εισβολή ενός ιού στο φυτό ενεργοποιεί το μηχανισμό της σίγησης μέσω RNA του φυτού, ο οποίος αποδομεί τα ιϊκά μόρια RNA. Αυτό αποδεικνύεται αδιαμφισβήτητα με τον εντοπισμό siRNAs που προέρχονται από το RNA του ιού σε αγρίου τύπου φυτά που έχουν μολυνθεί με το εν λόγω ιό (Hamilton and Baulcombe, 1999). Αυτό βεβαίως οφείλεται στο ότι οι RNA ιοί κατά τον πολλαπλασιασμό τους δημιουργούν ενδιάμεσα δίκλιωνα RNA μόρια, τα οποία ενεργοποιούν το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης του φυτού. Η δεύτερη και πιο σημαντική απόδειξη είναι ότι πολλοί φυτικοί ιοί κωδικεύουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν σε διάφορα σημεία του μηχανισμού και τον καταστέλλουν. Αυτό δείχνει ότι ιοί έχουν εξελικτικά εφοδιαστεί με εργαλεία καταστολής του φυτικού αντι-ιϊκού μηχανισμού. Τρίτον, μεταλλάγματα του *Arabidopsis* στα οποία ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης είχε κατασταλεί παρουσίασαν υπερευαίσθησία σε μολύνσεις με τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Vance and Vaucheret, 2001). Επίσης είναι πιθανό η γονιδιακή σίγηση να αποτελεί αντι-ιϊκό μηχανισμό άμυνας και στα θηλαστικά, καθώς βρέθηκε ότι ένας ζωικός ιός, ο *Flock house virus* (FHV) κωδικεύει μια πρωτεΐνη-καταστολέα της σίγησης μέσω RNA, την B2 πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την 2b πρωτεΐνη-καταστολέα του CMV (Ding *et al.*, 2004). Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη NS1 του ιού A της γρίπης καταστέλλει το μηχανισμό της σίγησης στα φυτά και δεσμεύει τα siRNAs. Συνεπώς είναι πιθανόν η πρωτεΐνη NS1 να καταστέλλει το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης στα θηλαστικά και ενδεχομένως με ένα τρόπο παρόμοιο με αυτό του P19 στα φυτά (Bucher *et al.*, 2004).

Επιπλέον έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης συμβάλλει στην προστασία του γενώματος από τα μεταθετά στοιχεία. Αυτή η άποψη στηρίζεται στο γεγονός ότι μεταλλάγματα του *C.elegans* και του *Chlamydomonas reinhardtii* στα οποία ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης δεν ήταν λειτουργικός, παρουσίασαν αυξημένη κινητικότητα των μεταθετών στοιχείων (Tijsterman *et al.*, 2002). Επίσης

στα φυτά έχουν βρεθεί άφθονα siRNAs που αντιστοιχούν σε μεταθετά στοιχεία του γενωματος τους και για την σύνθεση τους απαιτείται η δράση ενζύμων που εμπλέκονται στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης, όπως οι πρωτεΐνες DCL3 και RDR2. Μεταλλαγές σ' αυτά τα γονίδια οδήγησε σε καταστολή της μεταγραφικής σίγησης ορισμένων μεταθετών στοιχείων (Xie *et al.*, 2004), κάτι που επιβεβαιώνει την άποψη ότι η γονιδιακή σίγηση παίζει ρόλο στην προστασία του γενώματος από τα μεταθετά στοιχεία .

Επίσης τα τελευταία χρόνια αυξάνονται τα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι ο μηχανισμός της σίγησης μέσω RNA επιδρά στη δομή της χρωματίνης. Το πρώτο δεδομένο που έγειρε υποψίες για αυτό τον πιθανό ρόλο ήταν η παρατήρηση ότι η μεταγραφική σίγηση συνοδεύεται από *de novo* μεθυλίωση του εκκινήτη (Mette *et al.*, 1999) και η μετα-μεταγραφική σίγηση συνοδεύεται από *de novo* μεθυλίωση της κωδικής περιοχής του γονιδίου (Ingelbrecht *et al.*, 1994). Αυτό αποτέλεσε την πρώτη φορά που αποδεικνυόταν ότι τα dsRNA σχετίζονται με επιγενετικές τροποποιήσεις. Αργότερα πραγματοποιήθηκαν νέες ερευνητικές εργασίες που αποδείκνυαν την σχέση της γονιδιακής σίγησης με τη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Έτσι έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Polycomb, οι οποίες διαθέτουν περιοχή πρόσδεσης σε χρωματίνη και καταστέλλουν την μεταγραφή δημιουργώντας συμπυκνωμένη δομή στη χρωματίνη, παίζουν ρόλο στο μηχανισμό του RNAi στη δροσόφιλα και στο *C. elegans* (Denli and Hannon, 2003). Όμως η πλέον άμεση επιβεβαίωση ήρθε από πειράματα στον μύκητα *SchizoSaccharomyces pombe* από τον Volpe και τους συνεργάτες του (2002). Αυτοί βρήκαν ότι ο *S. Pombe* φέρει γονίδια που κωδικεύουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μηχανισμό της σίγησης, την Dicer, την RdRp και την *Argonate* που συμμετέχει στο σύμπλοκο RISC. Μεταλλαγές σ' αυτά τα γονίδια οδήγησαν σε συσσώρευση μεταγράφων από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του κεντρομερούς και σε καταστολή της μεταγραφικής σίγησης γονιδίου που είχε εντεθεί στο κεντρομερές. Αυτό συνοδεύτηκε από μείωση της μεθυλίωσης στη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 που αποτελεί χαρακτηριστικό της ετεροχρωματίνης. Συνεπώς είναι απαραίτητη η λειτουργία του RNAi για τη διατήρηση της δομής της ετεροχρωματίνης στο κεντρομερές και για τη μεταγραφική σίγηση των αλληλουχιών που εδρεύουν σ' αυτό. Ο ρόλος της γονιδιακής σίγησης στη δομή της χρωματίνης επιβεβαιώθηκε αργότερα και στα φυτά από τον Zilberman και τους συνεργάτες του (2003). Ενώ πρόσφατα βρέθηκε ότι η εισαγωγή siRNAs σε ανθρώπινα κύτταρα επάγει τη μεθυλίωση ομόλογων περιοχών του DNA και της λυσίνης 9 της ιστόνης H3. Συνεπώς είναι πιθανό ότι τα siRNAs επιδρούν στη δομή της χρωματίνης, χωρίς ωστόσο να γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους (Kawasaki and Taira, 2004).

Τέλος ο μηχανισμός της σίγησης μέσω RNA εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης όχι μόνο με την αποδόμηση των mRNAs αλλά επίσης με την παρεμπόδιση της μετάφρασης των mRNAs. Προϊόντα της Dicer είναι εκτός από τα siRNAs και τα miRNAs, τα οποία προέρχονται από την αποδόμηση μη πλήρως συμπληρωματικών δίκλωνων μορίων RNA. Όταν τα miRNAs προσδένονται σε μη πλήρως συμπληρωματικές περιοχές του 3' UTR των mRNAs ενδογενών γονιδίων, τότε παρεμποδίζουν τη μετάφραση τους. Φαίνεται ότι ο τρόπος δράσης των μικρών RNAs (παρεμπόδιση της μετάφρασης ή αποδόμηση των mRNAs) εξαρτάται από τη συμπληρωματικότητα με τον mRNA στόχο που παρουσιάζουν. Ωστόσο στα φυτά τα miRNAs παρουσιάζουν μεγάλη συμπληρωματικότητα με τα mRNAs, συνεπώς είναι πιθανό τα miRNAs να δρουν και ως siRNAs. Επίσης στα φυτά έχει βρεθεί ότι πολλά από τα miRNAs στοχεύουν μεταγραφικούς παράγοντες, κάτι που σημαίνει ότι παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών. Αυτό επιβεβαιώνεται από μεταλλαγές που επέδρασαν στην συγκέντρωση των miRNAs, οι οποίες οδήγησαν σε

αναπτυξιακές ανωμαλίες (Mallory and Vaucheret, 2004). Επομένως ο μηχανισμός της σίγησης μέσω RNA εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης των ενδογενών γονιδίων.

1.4 RNA κατευθυνόμενη μεθυλίωση του DNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM)

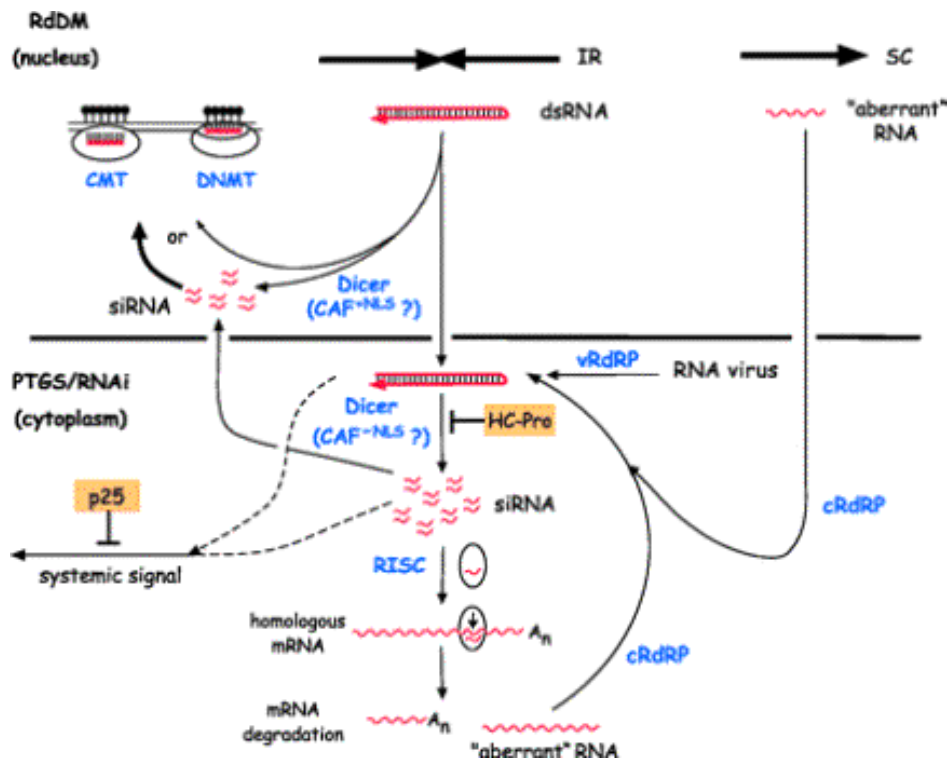
Ο μηχανισμός της RNA κατευθυνόμενης μεθυλίωσης του DNA (**RdDM**) αναφέρεται στη *de novo* μεθυλίωση των κυτοσινών της περιοχής του DNA που είναι ομόλογη με το μόριο RNA που ενεργοποίησε τον εν λόγω μηχανισμό. Το χαρακτηριστικό της είναι ότι επάγει πυκνή μεθυλίωση τόσο των συμμετρικών όσο και των μη συμμετρικών κυτοσινών στην ομόλογη περιοχή (Pelissier *et al.*, 1999). Το ελάχιστο μέγεθος της ομόλογης περιοχής για να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός του RdDM είναι περίπου 30bp (Pelissier and Wassenegger, 2000).

Ο μηχανισμός του RdDM ανακαλύφθηκε το 1994 από τον Wassenegger, όταν διαπίστωσε ότι αλληλουχίες του ιοειδούς PSTVd που είχαν εντεθεί σε διαγονιδιακά φυτά μεθυλιώθηκαν *de novo* μετά από μόλυνση των φυτών με το PSTVd. Μετά τη μόλυνση η περιοχή ομολογίας μεταξύ του φυτικού DNA και του ιοειδούς παρουσίαζε πολύ υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης τόσο στις συμμετρικές όσο και στις μη συμμετρικές κυτοσίνες. Ενώ στην περιοχή 30-50bp πάνω και κάτω από την περιοχή ομολογίας το ποσοστό μεθυλίωσης μειωνόταν δραματικά και πέραν αυτής ήταν αμελητέο. Με δεδομένο ότι τα ιοειδή είναι μόρια RNA και ο πολλαπλασιασμός τους λαμβάνει χώρα στον πυρήνα του κυττάρου μέσω αντιγραφής RNA σε RNA, χωρίς να παρεμβάλλεται κανένα μόριο DNA στον πολλαπλασιασμό τους, οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση των διαγονιδίων που είναι ομόλογα προς το PSTVd κατευθύνεται από το RNA του ιοειδούς.

Η πρώτη αυτή περιγραφή του RdDM αποτέλεσε και την πρώτη φορά που τα μόρια RNA εμπλεκόταν στον μηχανισμό της *de novo* μεθυλίωσης. Έως τότε πίστευαν ότι η *de novo* μεθυλίωση των ομόλογων DNA αλληλουχιών οφείλεται σε ζευγάρωμα αυτών. Η κύρια ένδειξη για αυτή την υπόθεση αποτελεί το φαινόμενο της προ-μειωτικής μεθυλίωσης (Methylation Induced Promeiotically, MIP) που ανακαλύφθηκε στο μύκητα *Ascobolus immersus*. Σύμφωνα με το φαινόμενο MIP γίνεται μεθυλίωση των διπλασιασμένων DNA αλληλουχιών μέσω DNA-DNA ζευγαρώματος κατά την προ-μειωτική φάση του μύκητα, γεγονός που οδηγεί στην μεταγραφική σιγήσή τους. Συνεπώς το ζευγάρωμα DNA αλληλουχιών ενεργοποιεί το μηχανισμό μεθυλίωσης αυτών, πιθανώς λόγω προσέλευσης των μεθυλτρανσφερών από την ασυνήθιστη δομή DNA-DNA. Η δράση του μηχανισμού της *de novo* μεθυλίωσης μέσω αλληλεπιδράσεων DNA-DNA πιθανώς να λαμβάνει χώρα στα φυτά, ωστόσο δεν μπορεί να εξηγήσει πολλές περιπτώσεις *de novo* μεθυλίωσης που έχουν παρατηρηθεί (ανασκόπηση από Wolfe and Matzke, 1999; Faugeron, 2000).

Μετά την πρώτη περιγραφή του μηχανισμού του RdDM από τον Wassenegger ακολούθησαν και άλλες πειραματικές εργασίες που επιβεβαίωσαν την λειτουργία αυτού του μηχανισμού στα φυτά. Έτσι ο Jones και οι συνεργάτες τους (1998) απέδειξαν ότι γονίδιο από RNA ιό που είχε εντεθεί σε ένα διαγονιδιακό φυτό υφίστανται μεθυλίωση μετά τη μόλυνση του φυτού με αυτό τον ιό. Η *de novo* μεθυλίωση παρουσιάζεται μόνο μετά τη μόλυνση και εντοπίζεται μόνο στο διαγονίδιο. Συνεπώς το RNA του ιού είναι αυτό που κατεύθυνε τη μεθυλίωση των ομόλογων περιοχών του φυτικού DNA. Επίσης ο Mette και οι συνεργάτες του (1999, 2000) απέδειξαν ότι όταν το φυτό συνθέτει dsRNA που φέρει τμήμα ενός εκκινητή

τότε επάγεται μεταγραφική σίγηση (TGS) του γονιδίου που βρίσκεται υπό τον έλεγχο



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της σίγησης μέσω RNA (PTGS/RNAi) και της RNA κατευθυνόμενης μεθυλίωσης του DNA (RdDM), όπως περιγράφεται από την Matzke και τους συνεργάτες της (2001). Τα δίκλινα μόρια RNA που ενεργοποιούν και τους δυο μηχανισμούς, αποδομούνται από την Dicer σε siRNAs. Αυτό πιθανώς συμβαίνει τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα τα siRNAs ενσωματώνονται στο ενζυμικό σύμπλοκο της RISC και το κατευθύνουν στα συμπληρωματικά μόρια mRNA, τα οποία αποδομούνται. Ενώ στον πυρήνα τα siRNAs ενδεχομένως κατευθύνουν τη μεθυλίωση των ομόλογων περιοχών του DNA, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται το ενδεχόμενο τα δίκλινα μόρια RNA να είναι αυτά που δρουν για την μεθυλίωση του DNA. Τα siRNAs ή τα dsRNAs είτε αλληλεπιδρούν με τις χρωμομεθυλάσες (CMT) και τις κατευθύνουν στις ομόλογες περιοχές του DNA είτε υβριδίζουν απ' ευθείας με ξεδιπλωμένο τμήμα του DNA και η ασυνήθιστη δομή που δημιουργείται προσελκύει τις *de novo* μεθυλτρανσφεράσες (DNMT). Τα δίκλινα μόρια RNA παράγονται κατά την μεταγραφή ανάστροφων DNA επαναλήψεων (Inverted Repeats, IR), από την δράση της κυτταρικής RdRp σε έκτροπα RNAs (aberrant RNAs) και κατά τον πολλαπλασιασμό των RNA ιών με τη δράση της ιϊκής RdRp. Τα έκτροπα RNA δημιουργούνται από τον πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής ή τη μη πολυαδενυλίωση των μεταγράφων και από την δράση της RISC στα mRNA μόρια.

αυτού του εκκινητή (γονίδιο-στόχος) και *de novo* μεθυλίωση του εκκινητή (εκκινητής-στόχος). Το ότι η μεθυλίωση του εκκινητή οφείλεται αποκλειστικά στην επίδραση του dsRNA και όχι σε DNA-DNA ζευγάρωμα των ομόλογων περιοχών του εκκινητή αποδείχθηκε από το ότι όταν έγινε καταστολή της μεταγραφής των ανάστροφων επαναλήψεων του εκκινητή χωρίς να αλλάξει η δομή τους, τότε εξαφανίστηκε η μεθυλίωση του εκκινητή-στόχου και ενεργοποιήθηκε η μεταγραφή του γονιδίου-στόχου. Συνεπώς αποδεικνύεται ότι η *de novo* μεθυλίωση οφείλεται σε **RNA** μόρια και επομένως είναι σωστή η ονομασία του μηχανισμού ως RNA-κατευθυνόμενη μεθυλίωση του DNA.

Επιπλέον το γεγονός ότι η *de novo* μεθυλίωση περιοχών του DNA επάγεται από ιούς και ιοειδή, τα οποία σχηματίζουν δίκλωνες ενδιάμεσες μορφές RNA κατά τον πολλαπλασιασμό τους, όπως επίσης από δίκλινα μόρια RNA που συνθέτονται κατά τη μεταγραφή ανάστροφων επαναλήψεων (inverted repeats) αποδεικνύει ότι **τα δίκλινα μόρια RNA** είναι αυτά που ενεργοποιούν το μηχανισμό της *de novo* μεθυλίωσης. Όταν το dsRNA φέρει αλληλουχίες ομόλογες του εκκινητή τότε επάγει μεταγραφική σίγηση (TGS) και μεθυλίωση του εκκινητή, ενώ όταν φέρει αλληλουχίες ομόλογες της κωδικής περιοχής του γονιδίου τότε επάγει μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS) και μεθυλίωση της κωδικής περιοχής (Jones *et al.*, 2001). Συνεπώς τα δίκλινα μόρια RNA αποτελούν ένα κοινό παράγοντα των μηχανισμών της σίγησης μέσω RNA και της RNA-κατευθυνόμενης μεθυλίωσης του DNA και αποδεικνύεται η **συσχέτιση του μηχανισμού της σίγησης μέσω RNA και της *de novo* μεθυλίωσης** των ομόλογων DNA περιοχών.

Είναι αξιοσημείωτο επίσης το γεγονός ότι τα δίκλινα μόρια RNA που συνθέτονται κατά τη μεταγραφή ανάστροφων επαναλήψεων ενός εκκινητή αποδομούνται σε siRNAs, όπως συμβαίνει και στο PTGS. Το γεγονός ότι τα dsRNA μπορούν να επάγουν και τους δύο μηχανισμούς του TGS και του PTGS, ότι τα dsRNA αποδομούνται σε siRNAs και στις δυο περιπτώσεις και ότι επάγεται η μεθυλίωση περιοχών του DNA που είναι ομόλογα ως προς το dsRNA, δείχνει ότι οι μηχανισμοί του **PTGS και του TGS συνδέονται** (Sijen *et al.*, 2001) και γι' αυτό σήμερα αναφερόμαστε και στους δύο μηχανισμούς με τον όρο σίγηση μέσω RNA.

Ωστόσο το ερώτημα που εγείρεται είναι ποιος είναι ο **παράγοντας που εισέρχεται στον πυρήνα** και κατευθύνει τη μεθυλίωση του γενώματος με ειδικό ως προς την αλληλουχία τρόπο. Είναι προφανές ότι σίγουρα πρέπει να περιλαμβάνει κάποιο RNA μόριο έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ειδικότητα του RdDM ως προς τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Οι πιο πιθανοί παράγοντες είναι το dsRNA και τα siRNAs. Ωστόσο φαίνεται πιθανότερο τα siRNAs να είναι αυτά που κατευθύνουν τη μεθυλίωση των ομόλογων περιοχών του DNA κατά αναλογία με το ρόλο τους στη αποδόμηση των ομόλογων mRNAs και με δεδομένο ότι η ελάχιστη περιοχή ομολογίας του DNA-στόχου και του RNA που απαιτείται για να ενεργοποιηθεί το RdDM είναι 30bp, πολύ κοντά δηλαδή στο μέγεθος των siRNAs. Ενώ πρόσφατα αποδείχτηκε ότι τα siRNAs είναι ικανά να επάγουν τη μεθυλίωση ομόλογων περιοχών του DNA και τη σίγηση αυτών, όταν εισάγονται σε ανθρώπινα κύτταρα (Kawasaki and Taira, 2004). Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι τα siRNAs είναι υπεύθυνα για τη *de novo* μεθυλίωση του γενώματος, χωρίς ωστόσο να γνωρίζουμε τον ακριβή τρόπο δράσης τους σ' αυτό το μηχανισμό. Έχουν προταθεί δυο υποθέσεις ως προς τον τρόπο μεθυλίωσης του DNA. Σύμφωνα με την πρώτη τα siRNAs έχουν άμεση πρόσβαση σε μερικώς ξεδιπλωμένο DNA, δεσμεύονται σ' αυτό και σχηματίζουν είτε DNA-RNA υβρίδια και μονόκλινη DNA λούπα είτε RNA-DNA τριπλή έλικα (εικόνα 1). Αυτή η δομή πιθανώς προσελκύει μεθυλτρανσφεράσες. Η

άλλη υπόθεση προτείνει ότι τα siRNAs αλληλεπιδρούν με μεθύλτρανσφεράσες και κατευθύνουν το ένζυμο σε συμπληρωματικές περιοχές του DNA (Matzke *et al.*, 2001). Ωστόσο καμία από τις παραπάνω υποθέσεις δεν έχει επιβεβαιωθεί μέχρι σήμερα πειραματικά.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της *de novo* μεθυλίωσης είναι η δυνατότητα της να μεταφέρεται **διασυστηματικά** εντός του φυτού. Έχει παρατηρηθεί ότι η διασυστηματική σίγηση ενός γονιδίου συνοδεύεται από μεθυλίωση αυτού (Jones *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999). Μάλιστα έχει προταθεί ότι το διασυστηματικό σήμα σίγησης είναι το ίδιο με αυτό που κατευθύνει τη διασυστηματική μεθυλίωση. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται στο ότι ο καταστολέας 2b μπλοκάρει τόσο τη διασυστηματική σίγηση όσο και τη μεθυλίωση του αντίστοιχου γονιδίου (Mallory *et al.*, 2001). Ενώ ο καταστολέας HC-Pro δεν καταστέλλει κανένα από τους δύο μηχανισμούς (Guo and Ding, 2002). Συνεπώς οι μηχανισμοί της διασυστηματικής σίγησης και της *de novo* μεθυλίωσης ανταποκρίνονται κατά τον ίδιο τρόπο στους καταστολείς, γεγονός που δείχνει είτε ότι διαθέτουν το ίδιο σήμα είτε ότι ο μηχανισμός τους διαθέτει κάποιους κοινούς παράγοντες (Mlotshwa *et al.*, 2002). Επιπλέον έχει προταθεί από τον Hamilton και τους συνεργάτες του ότι τα long siRNAs είναι αυτά που εμπλέκονται και στους δύο αυτούς μηχανισμούς. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά. Αντιθέτως η Mallory και οι συνεργάτες της (2003) έχουν υποστηρίξει ότι τα σήματα της διασυστηματικής σίγησης και της *de novo* μεθυλίωσης δεν σχετίζονται μεταξύ τους.

Επίσης ένα άλλο χαρακτηριστικό της *de novo* μεθυλίωσης είναι η δυνατότητα της να **διασπείρεται** εντός της κωδικής περιοχής πέρα από την περιοχή ομολογίας. Σε πειραματικές εργασίες για τον μηχανισμό του RdDM παρατηρήθηκε ότι όταν διαγονιδιακά φυτά μολύνθηκαν με ανασυνδιασμένους ιϊκούς φορείς που έφεραν τμήμα της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου, τότε μεθυλιώνεται όχι μόνο η περιοχή του διαγονιδίου που είναι ομόλογη αλλά ολόκληρη η κωδική περιοχή τόσο προς την 3' όσο και προς την 5' κατεύθυνση (Jones *et al.*, 1999). Έχει αποδειχτεί ότι το φαινόμενο της μεταβατικής σίγησης συνοδεύεται από τη διασπορά της μεθυλίωσης και απαιτείται η μεταγραφή του διαγονιδίου στόχου και η δράση της RdRp (Vastij *et al.*, 2002). Συνεπώς εάν όντως τα siRNAs είναι αυτά που κατευθύνουν τη μεθυλίωση των ομόλογων περιοχών, είναι πιθανόν τα δευτερογενή siRNAs να είναι υπεύθυνα για αυτή τη διασπορά της μεθυλίωσης εντός της κωδικής περιοχής. Ωστόσο έχει διατυπωθεί και μια άλλη υπόθεση, σύμφωνα με την οποία οι μεθυλτρανσφεράσες πιθανώς να συνεχίζουν τη δράση τους στις γειτονικές περιοχές της περιοχής ομολογίας του DNA και του RNA, προτού απομακρυνθούν (Pelissier *et al.*, 1999).

Η *de novo* μεθυλίωση συνδέεται με το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης όπως αποδεικνύεται από τα πειραματικά δεδομένα που αναφέραμε, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί ως σήμερα εάν η μεθυλίωση αποτελεί αίτιο ή επακόλουθο της γονιδιακής σίγησης. Φαίνεται ωστόσο ότι η μεθυλίωση παίζει ρόλο στην **εγκαθίδρυση** ή στη **διατήρηση** της γονιδιακής σίγησης. Όσον αφορά τον ρόλο της *de novo* μεθυλίωσης στο μηχανισμό της μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (PTGS), έχει προταθεί ότι η πυκνή μεθυλίωση της κωδικής περιοχής του γονιδίου οδηγεί στην παραγωγή έκτροπων RNAs (aberrant RNAs) τα οποία με τη δράση της RdRp μετατρέπονται σε δίκλινα μόρια RNA (Wassenegger M., 2000). Αυτά θα αποτελέσουν υπόστρωμα δράσης της Dicer. Αυτό θα οδηγήσει σε ενίσχυση και σε διατήρηση του PTGS. Ενώ στην περίπτωση της μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης γνωρίζουμε ότι η μεθυλίωση του εκκινήτη οδηγεί σε αλλαγή της δομής της χρωματίνης με τη δράση πρωτεϊνών που προσδένονται σε μεθυλ-κυτοσίνες (methyl-DNA binding domain proteins, MBD proteins), οι οποίες αλληλεπιδρούν με

σύμπλοκα καταστολής της μεταγραφής, όπως το Sin3, τα οποία έχουν δράση από-ακετυλάσης των ιστονών (Lewin B., 2000). Επομένως η χρωματίνη αποκτά τέτοια δομή που δεν επιτρέπει τη μεταγραφή και συνεπώς εγκαθιδρύεται η μεταγραφική σίγηση. Ωστόσο δεν γνωρίζουμε τον μηχανισμό με τον οποίο κατευθύνονται τα σύμπλοκα καταστολής της μεταγραφής σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA.

Το γεγονός ότι ο μηχανισμός του RdDM συνδέεται με αλλαγές της δομής της χρωματίνης στις περιοχές του DNA που είναι ομόλογες με το RNA έχει φανεί επιπλέον από ορισμένες ερευνητικές εργασίες. Μεταλλαγές σε παράγοντες που συμμετέχουν σε σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως στην πρωτεΐνη DDM1 που συμμετέχει στο σύμπλοκο SWI/SNF οδηγούν σε μερική αναστροφή του μηχανισμού του TGS που έχει επαχθεί από dsRNA και σε μείωση της μεθυλίωσης του εκκινήτη (Morel *et al.*, 2000; Aufsatz *et al.*, 2002a). Επίσης έχει προταθεί ότι η από-ακετυλάση των ιστονών HDA6 παίζει ρόλο στην ενίσχυση της *de novo* μεθυλίωσης του DNA που έχει επαχθεί από μόρια dsRNA (Aufsatz *et al.*, 2002b) και συνεπώς συντελεί στην ενίσχυση και στη διατήρηση της γονιδιακής σίγησης.

1.5 Μεθυλτρανσφεράσες των φυτών

Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται από τις μεθυλτρανσφεράσες (MTases), οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά της μεθυλομάδας από την S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM) στον C-5 της κυτοσίνης. Στα φυτά οι μεθυλκυτοσίνες εντοπίζονται στις συμμετρικές αλληλουχίες CpG και CpHpG, αλλά και σε μη συμμετρικές αλληλουχίες CpHpH, όπου H είναι A, C ή T. Προφανώς στα φυτά πρέπει να υπάρχουν αφενός MTases διατήρησης της μεθυλίωσης, οι οποίες δρουν κατά την αντιγραφή του DNA και μεθυλιώνουν τις κυτοσίνες των δινουκλεοτιδίων CG, όταν η κυτοσίνη του δινουκλεοτιδίου GC του αντίθετου κλώνου είναι μεθυλιωμένη. Αφετέρου πρέπει να υπάρχουν *de novo* MTases που μεθυλιώνουν τις θέσεις όπου δεν προϋπήρχε μεθυλίωση και είναι υπεύθυνες για την μεθυλίωση των μη συμμετρικών κυτοσινών.

Στα φυτά έχουν αναφερθεί έως σήμερα οι ακόλουθες ομάδες μεθυλτρανσφερασών. Η κατηγορία των “domain-rearranged” (DRM), η οποία είναι ομόλογη με την οικογένεια Dnmt3 μεθυλτρανσφερασών των θηλαστικών και έχει προταθεί ότι αποτελεί την κύρια ομάδα *de novo* μεθυλτρανσφερασών. Μάλιστα έχει αποδειχτεί ότι η DRM1 αποτελεί *de novo* μεθυλτρανσφεράση του καπνού και μάλιστα μεθυλιώνει τις κυτοσίνες που εντοπίζονται στις αλληλουχίες CpHpH και CpHpG (Wada *et al.*, 2003).

Επίσης η ομάδα της μεθυλτρανσφεράσης MET1, η οποία είναι ομόλογη με την Dnmt1 των θηλαστικών. Ο ρόλος της MET1 είναι η διατήρηση της μεθυλίωσης στις αλληλουχίες CpG χωρίς ωστόσο να αποκλείεται ότι μπορεί να δρα και ως *de novo* μεθυλτρανσφεράση υπό ορισμένες συνθήκες. Έχει μάλιστα ειπωθεί ότι είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης που έχει επαχθεί από RdDM (Aufsatz *et al.*, 2002).

Τέλος η ομάδα των χρωμομεθυλασών (chromomethylases, CMT), οι οποίες είναι μεθυλτρανσφεράσες που διαθέτουν περιοχή πρόσδεσης σε χρωματίνη (chromodomain). Στο *Arabidopsis* έχουν βρεθεί τρία γονίδια που κωδικεύουν χρωμομεθυλάσες, τα CMT1, CMT2 και CMT3. Ωστόσο μόνο τα δύο από αυτά κωδικεύουν λειτουργικές πρωτεΐνες, τα CMT2 και CMT3. Ομόλογα γονίδια έχουν βρεθεί και σε άλλα φυτικά είδη, ωστόσο δεν έχουν εντοπιστεί σε άλλους οργανισμούς. Έτσι πιστεύουμε ότι αυτή η οικογένεια μεθυλτρανσφερασών υπάρχει

μόνο στα φυτά (Bartee *et al.*, 2001). Η CMT3 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης στις αλληλουχίες CpNpG (Lindroth *et al.*, 2001). Ωστόσο για την οικογένεια των χρωμομεθυλασών έχει προταθεί ότι πιθανώς να είναι αυτές που παίζουν τον κύριο ρόλο στο μηχανισμό του RdDM. Πιο συγκεκριμένα έχει ειπωθεί ότι ενδεχομένως τα siRNAs να προσδένονται στην περιοχή πρόσδεσης της χρωματίνης (chromodomain) των χρωμομεθυλασών και κατευθύνουν το ένζυμο στις ομόλογες περιοχές του φυτικού DNA (Matzke *et al.*, 2001). Αυτή η υπόθεση στηρίζεται στην παρατήρηση ότι το chromodomain της MOF, που είναι ακετυλάση των ιστονών της δροσόφιλας αλληλεπιδρά με RNA μόρια. Συνεπώς είναι πιθανό τα chromodomains να διαθέτουν αυτή την ιδιότητα αλληλεπίδρασης με RNA μόρια (Akhtar A., 2000).

1.6 Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών στις ιϊκές μολύνσεις

Οι αρχικές προσπάθειες για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών σε ιώσεις περιοριζόταν στην εισαγωγή στο γένωμα του φυτού γονιδίου που κωδικεύει πρωτεΐνη του ιού (Abel *et al.*, 1986). Αργότερα διαπίστωσαν ότι μπορεί να επιτευχθεί η δημιουργία ανθεκτικών φυτών με την εισαγωγή τμήματος του ιϊκού γονιδίου, είτε σε sense είτε σε antisense προσανατολισμό και συνεπώς δεν απαιτείται η παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης (Lindbo *et al.*, 1992). Μετά όμως την κατανόηση της σημασίας των δίκλωνων μορίων RNA στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης, οι ερευνητές οδηγήθηκαν στη δημιουργία κατασκευών που έφεραν ταυτόχρονα την θετικής (sense) και αρνητικής (antisense) πολικότητας αλληλουχία. Μεταξύ αυτών παρεμβάλλεται ένα ξένο τμήμα DNA (spacer) που προσδίδει σταθερότητα στην κατασκευή. Η παραπάνω κατασκευή ονομάζεται τύπου φουρκέτας (hairpin ή panhandle κατασκευή). Κατά την μεταγραφή αυτής της κατασκευής παράγονται μόρια RNA που μετατρέπονται σε δίκλιωνα λόγω της συμπληρωματικότητας των δύο ανεστραμμένων επαναλήψεων και συνεπώς επάγεται ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης. Επομένως όταν ο ιός εισβάλλει στο φυτό, ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης είναι ενεργοποιημένος και δέχεται αμέσως επίθεση από το ενζυμικό σύμπλοκο της RISC. Αυτό εξασφαλίζει πολύ υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας σε σύγκριση με την εισαγωγή μόνο sense ή antisense προσανατολισμού αλληλουχίας (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000).

1.7 Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού που εκφράζουν dsRNA ομόλογο του γενόματος του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (Οι CMV σειρές)

Το εργαστήριο μας επίσης προέβη στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών καπνού που εκφράζουν δίκλινο μόριο RNA που είναι ομόλογο του 3' τμήματος του RNA 3 του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς (Cucumber mosaic virus, CMV). Το 3' τμήμα του RNA 3 του CMV κωδικεύει την καψιδιακή πρωτεΐνη αυτού (Kalantidis *et al.*, 2002).

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των φυτών φέρει ένα cDNA τμήμα του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του CMV σε sense και antisense προσανατολισμό. Από το cDNA τμήμα έχει αφαιρεθεί το κωδικόνιο έναρξης AUG. Οι δύο ανάστροφες επαναλήψεις διαχωρίζονται από ένα άλλο τμήμα

DNA (spacer) μεγέθους 1444bp που προέρχεται από τον βακτηριοφάγο λ και χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλίσει τη σταθερότητα της κατασκευής. Η εν λόγω κατασκευή εισήχθη σε δυο πλασμιδιακούς φορείς, τον PART27 και τον pATC940. Στον μεν πρώτο είναι υπό τον έλεγχο του εκκινητή 35S του CaMV και στο δεύτερο είναι υπό τον έλεγχο του ονομαζόμενου “Super” εκκινητή. Στη συνέχεια φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* ανατολικής ποικιλίας Μπασμάς μετασηματίστηκαν μέσω Αγροβακτηρίων που έφεραν είτε τον PART27 είτε τον pATC940. Έτσι τα διαγονιδιακά φυτά που δημιουργήθηκαν παράγουν δίκλωνα μόρια RNA τα οποία υφίστανται αποδόμηση από τον μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης μέσω RNA. Επομένως όταν εισβάλλει ο CMV στο διαγονιδιακό φυτό, ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης έναντι του ιϊκού RNA είναι ήδη ενεργοποιημένος και συνεπώς το φυτό αντιμετωπίζει άμεσα τον ιό.

Τα διαγονιδιακά φυτά που δημιουργήθηκαν κατατάχτηκαν σε τρεις ομάδες με βάση την ανταπόκριση τους στην μόλυνση με CMV. Φυτά **ευαίσθητα**, που πρόκειται για τα φυτά που παρουσίασαν συμπτώματα μετά από μόλυνση με τον CMV. Ωστόσο η πλειοψηφία των ευαίσθητων φυτών εμφάνισε συμπτώματα ηπιότερα απ’ ότι τα φυτά αγρίου τύπου. Φυτά με φαινότυπο “**ανάρρωσης**” (recovery), τα οποία εμφάνισαν συμπτώματα μετά από μόλυνση με τον CMV, αλλά σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης δεν παρουσίασαν συμπτώματα. Φυτά **ανθεκτικά** τα οποία δεν εμφάνισαν καθόλου συμπτώματα και όταν χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από αυτά για την μόλυνση φυτών αγρίου τύπου, τότε αυτά παρέμειναν αμόλυντα.

Μελετήθηκε η T_0 και η T_1 και βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας και της παρουσίας των siRNAs. Δηλαδή τα φυτά στα οποία ανιχνεύονταν siRNAs ήταν ανθεκτικά έναντι του CMV. Ενώ τα φυτά στα οποία δεν ανιχνεύονταν τα siRNAs ήταν ευαίσθητα. Συνεπώς η παρουσία των siRNAs μπορεί να αποτελέσει μοριακό δείκτη για την ανθεκτικότητα των γενετικά τροποποιημένων φυτών που εκφράζουν dsRNA ομόλογο ενός μέρους του ιϊκού γενώματος. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ανθεκτικότητα μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών που έφεραν τον εκκινητή 35S και αυτών που έφεραν τον “Super” εκκινητή. Επίσης η αντίδραση του φυτού έναντι της ιϊκής μόλυνσης δεν εξαρτάται μόνο από την μεταγραφή του διαγονιδίου, καθώς σε ορισμένα διαγονιδιακά φυτά ανιχνεύεται υψηλή συγκέντρωση του mRNA του διαγονιδίου αλλά ωστόσο δεν ανιχνεύονται siRNAs και δεν είναι ανθεκτικά. Επίσης υπάρχουν διαγονιδιακά φυτά στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν ούτε το μετάγραφο του διαγονιδίου ούτε τα siRNAs και ήταν ευαίσθητα έναντι της ιϊκής μόλυνσης. Συνεπώς δεν γνωρίζουμε εάν σ’ αυτά το διαγονίδιο μεταγράφεται αλλά σε τόσο χαμηλό βαθμό που δεν είναι δυνατή η ανίχνευση του μεταγράφου και των siRNAs ή εάν έχει υποστεί μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (TGS). Επίσης παρατηρήθηκε ότι αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας και ανίχνευσης των siRNAs με την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου, γεγονός που είναι αναμενόμενο. Ωστόσο δεν γνωρίζουμε εάν η αυξημένη παραγωγή των siRNAs οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο ή εάν οφείλεται στην συνεργατική δράση των περισσότερων του ενός ενθεμάτων.

Επιπλέον βρέθηκε ότι σε θερμοκρασία 32°C η συγκέντρωση των siRNAs είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με την συγκέντρωσή τους στους 25°C. Όπως επίσης βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των siRNAs αυξάνεται κατά την ανάπτυξη του φυτού από το στάδιο των 5 φύλλων στο στάδιο των 7 φύλλων. Ενώ μετά από αυτό το στάδιο η συγκέντρωση των siRNAs στο φυτό παραμένει σταθερή. Συνεπώς τόσο η θερμοκρασία όσο και το στάδιο ανάπτυξης επιδρούν στην συγκέντρωση των siRNAs. Αργότερα επιβεβαιώθηκε ότι η θερμοκρασία επιδρά στον μηχανισμό της γονιδιακής

σίγησης από τον Szittyá και τους συνεργάτες του (2003). Αυτοί βρήκαν ότι ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης παρεμποδίζεται στις χαμηλές θερμοκρασίες και η συγκέντρωση των siRNAs μειώνεται δραματικά. Ενώ αντίθετα με την αύξηση της θερμοκρασίας ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης ενεργοποιείται και η συγκέντρωση των siRNAs αυξάνεται σταδιακά. Αυτή η διαπίστωση έρχεται να εξηγήσει το γεγονός ότι τα φυτά είναι πιο ευαίσθητα στις ιϊκές προσβολές όταν επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες, κάτι που έχει παρατηρηθεί από παλιά. Προφανώς η ευαισθησία που παρουσιάζουν τα φυτά στις χαμηλές θερμοκρασίες έναντι των ιών οφείλεται στην μειωμένη αποτελεσματικότητα του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης.

Μια από τις διαγονιδιακές σειρές που χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτική ήταν η CMV28, η οποία είχε περισσότερα από δυο αντίγραφα του διαγονιδίου. Αυτή επέδειξε πολύ υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας τόσο έναντι φυλών του CMV που ανήκουν στον τύπο I όσο και έναντι φυλών που ανήκουν στον τύπο II. Επίσης παρουσίαζε πολύ υψηλή συγκέντρωση των siRNAs στην T1 και στην T2 γενιά, ενώ ανιχνεύτηκαν μόνο ίχνη του mRNA του διαγονιδίου γεγονός που οφείλεται στην ταχεία αποδόμηση του από το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης. Επίσης στην T2 γενιά παρατηρήθηκε ότι οι σειρές που επέδειξαν ανθεκτικότητα ήταν αυτές όπου ανιχνεύτηκαν siRNAs. Συνεπώς η ανθεκτικότητα κληρονομείται μαζί με τη δυνατότητα παραγωγής siRNAs σε ανιχνεύσιμη συγκέντρωση.

Το γεγονός ότι ορισμένες σειρές είναι ανθεκτικές έναντι του CMV ενώ άλλες είναι ευαίσθητες παρά το ότι φέρουν το ίδιο διαγονίδιο προκάλεσε πολλά ερωτήματα. Πιθανώς αυτή η διαφοροποίηση της συμπεριφοράς των διαγονιδιακών σειρών να οφείλεται στην θέση ένθεσης του διαγονιδίου, δηλαδή εάν έχει εντεθεί σε ενεργή μεταγραφική περιοχή ή όχι. Ωστόσο αυτό δεν φαίνεται να είναι ο μόνος παράγοντας που επιδρά στην ανταπόκριση του διαγονοδιακού φυτού έναντι της ιϊκής μόλυνσης καθώς υπήρχαν σειρές στην Το γενιά όπου ενώ ανιχνευόταν το μετάγραφο σε υψηλή συγκέντρωση εντούτοις ήταν ευαίσθητα και δεν ανιχνευόταν siRNAs. Αυτό σημαίνει ότι ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης δεν είναι λειτουργικός σε ορισμένες σειρές για άγνωστους λόγους. Επίσης η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν οι σειρές πιθανώς να οφείλεται σε μεθυλίωση της κωδικής περιοχής ή του εκκινήτη του διαγονιδίου. Η πιθανώς να οφείλεται σε κάποιο άλλο άγνωστο παράγοντα. Ενώ θα πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και το στάδιο ανάπτυξης επιδρούν στον μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης συνεπώς και στον φαινότυπο που εμφανίζουν μετά από μόλυνση του φυτού με CMV. Εμείς θελήσαμε να απαντήσουμε σ' αυτά τα ερωτήματα μελετώντας τους απόγονους της T4 γενιάς της σειράς CMV28.

Επιλέξαμε τις T4 διαγονιδιακές σειρές που έχουν προέλθει από την Το σειρά CMV28, καθώς ορισμένες από αυτές ήταν ομοζυγωτές συνεπώς όλος ο πληθυσμός μιας T4 σειράς θα είχε το ίδιο γενετικό υπόβαθρο, γεγονός που θα μας διευκόλυνε στην μελέτη μας. Επιπλέον το γεγονός ότι όλες οι T4 σειρές που επιλέξαμε να μελετήσουμε προέρχονται από τον ίδιο Το γονέα θα μας επιτρέψει να εντοπίσουμε πιθανές διαφορές των αντιγράφων του διαγονιδίου ως προς την έκφραση τους και ως προς τις επιγενετικές τροποποιήσεις που έχουν υποστεί, όταν πλέον έχουν διαχωριστεί στην T4 γενιά. Επίσης ορισμένες T4 σειρές ήταν ανθεκτικές ενώ άλλες ήταν ευαίσθητες. Αυτό θα μας επέτρεπε την συγκριτική μελέτη αυτών και πιθανώς την εύρεση του παράγοντα που ευθύνεται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από ορισμένες σειρές και όχι από άλλες. Εμείς επικεντρωθήκαμε στη ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής και του εκκινήτη του διαγονιδίου τόσο ευαίσθητων σειρών όσο και ανθεκτικών, έτσι ώστε να μελετήσουμε την πιθανή συσχέτιση της ανθεκτικότητας με τη μεθυλίωση. Έως τώρα γνωρίζουμε ότι η ανθεκτικότητα

σχετίζεται με το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης και μάλιστα υπάρχει στενή συσχέτιση με τη συγκέντρωση των siRNAs. Ωστόσο γνωρίζουμε ότι ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης σχετίζεται με τη μεθυλίωση του γονιδίου στόχου, συνεπώς γεννάτε το εύλογο ερώτημα: σχετίζεται η ανθεκτικότητα με το επίπεδο μεθυλίωσης του διαγονιδίου? Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο να απαντήσει σ' αυτό το ερώτημα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υπόστρωμα Murashige & Skoog (MS medium)

Χρησιμοποιήθηκε για την βλάστηση των σπόρων των διαγονιδιακών φυτών καπνού και για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους (ως ότου γίνει η επιλογή τους από το αντιβιοτικό επιλογής – περίπου στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων) το υπόστρωμα Murashige & Skoog, το οποίο αποτελείται από τα εξής:

Μακροστοιχεία

CaCl ₂	2.99 mM
KH ₂ PO ₄	1.25 mM
KNO ₃	18.79 mM
MgSO ₄	1.50 mM
NH ₄ NO ₃	20.61 mM

Μικροστοιχεία

CoCl ₂ .6H ₂ O	0.11 μM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.10 μM
H ₃ BO ₃	0.10 mM
KI	5.00 μM
MnSO ₄ .H ₂ O	0.10 mM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.03 μM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	29.91 μM

Βιταμίνες

Γλυσίνη	26.64 mM
Μυο-Ινοσιτόλη	0.56 mM
Νικοτινικό οξύ	4.06 mM
Πυριδοξίνη HCl	2.43 mM
Θειαμίνη HCl	0.30 mM

Επιπλέον προσθέεται FeNaEDTA σε συγκέντρωση 0.10 mM. Ρυθμίζεται το pH στο 5.8 και προσθέεται agar 8 gr/lit. Ακολουθεί αποστείρωση και προσθήκη του αντιβιοτικού επιλογής, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η καναμυκίνη σε συγκέντρωση 100 mgr/lit. Το MS υπόστρωμα «απλώνεται» σε τρυβλία petri υπο στείρες συνθήκες.

2.2 Απολύμανση των σπόρων, σπορά και μεταφύτευση των σποροφύτων

Οι σπόροι του καπνού που πρόκειται να απλωθούν στο MS υπόστρωμα απολυμαίνονται με πλύσιμο τους σε 10% χλωρίνη για 10 λεπτά. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με αποστειρωμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα της χλωρίνης. Στη συνέχεια απλώνονται στο MS υπόστρωμα. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται υπό στείρες συνθήκες. Στη συνέχεια τα τρυβλία petri σφραγίζονται με parafilm και τυλίγονται με αλουμινοχαρτό για να επικρατεί υψηλή υγρασία και σκοτάδι εντός αυτών, συνθήκες που ευνοούν την βλάστηση των σπόρων. Μετά την βλάστηση των σπόρων απομακρύνεται το αλουμινοχαρτό και τα τρυβλία τοποθετούνται σε συνθήκες υψηλού φωτισμού. Στο στάδιο των τεσσάρων φύλλων, οπότε έχει γίνει πλέον η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών, μεταφυτεύονται σε μικρού μεγέθους γλάστρες με τύρφη και τοποθετούνται στο θερμοκήπιο. Αρχικά τα

γλαστράκια είναι καλυμμένα με διαφανή σακουλάκια ώστε να αναπτύσσεται το νεαρό φυτάριο σε περιβάλλον με υψηλή σχετική υγρασία, τα οποία αργότερα απομακρύνονται. Η ανάπτυξη των φυτών συνεχίζεται εντός του θερμοκηπίου του τμήματος βιολογίας υπο ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια της ημέρας η θερμοκρασία είναι 23°C και κατά τη διάρκεια της νύχτας είναι 19°C.

2.3 Απομόνωση φυτικού DNA

0,5-1gr φυτικού ιστού (φύλλα) λειοτριβείται σε υγρό άζωτο και μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες (falcon) των 30ml, όπου προσθέτονται 15ml διαλύματος εκχύλισης (100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Στη συνέχεια προσθέτονται 2ml 10% SDS, ανακινείται το δείγμα και τοποθετείται στους 65°C για 10 λεπτά. Μετά προσθέτονται 5 ml οξικού καλίου 5M, αναδεύεται το δείγμα και αφήνεται για τουλάχιστον 20 λεπτά στους 0°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο falcon των 50ml, το οποίο περιέχει 10 ml ισοπροπανόλη, αφού διυλιστεί με γάζα «miracloth». Το δείγμα αναδεύεται και αφήνεται στους -20°C για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 30 λεπτά και η πελέτα αφήνεται να στεγνώσει. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 700 μl TE (50mM Tris, 10 mM EDTA pH 8) και μεταφέρεται σε δοχείο των 1,5 ml. Αφού το δείγμα φυγοκεντρηθεί για να καθίσουν τα αδιάλυτα συστατικά, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο δοχείο και ακολουθεί καθαρισμός με την προσθήκη ίσου όγκου ουδέτερης φαινόλης και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα φαινόλης και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο, προστίθεται 1/15 του όγκου οξικό νάτριο 3M και 2,5 όγκοι απόλυτης αιθανόλης, ανακινείται το δείγμα και φυγοκεντείται για 10 λεπτά στις 13000 rpm. Η πελέτα πλένεται με 70% αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 400μl TE. Προστίθεται 1μl Rnase (10 mg/ml) και επωάζεται το δείγμα στους 37°C για 15 λεπτά.

Στη συνέχεια για να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη καθαρότητα του DNA προστίθενται 400μl διαλύματος CTAB 2% (0,2M Tris/Cl pH 7,5-8, 0,05 NaEDTA, 2M NaCl, 2% CTAB), ανακινείται το δείγμα και ακολουθεί επώαση στους 65°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και φυγοκέντρηση του μίγματος στις 13000rpm για 10 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με απόλυτη αιθανόλη και πλύσιμο της πελέτας με 70% αιθανόλη. Αφού στεγνώσει η πελέτα, επαναδιαλύεται σε 100μl αποστειρωμένου νερού. Η παραπάνω διαδικασία απομόνωσης του φυτικού DNA βασίζεται στο πρωτόκολλο του Dellaporta με κάποιες τροποποιήσεις.

2.4 Ανάλυση κατά Southern για την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου βασίζεται σε περιοριστικά ένζυμα που είναι ευαίσθητα στην μεθυλίωση και ακολουθεί ανάλυση κατά Southern των δειγμάτων DNA που έχουν υποβληθεί σε πέψη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των ισοσχιζομερών ενζύμων *MspI* και *HpaII*, τα οποία παρουσιάζουν ευαισθησία στην

μεθυλίωση. Ωστόσο πραγματοποιείται πέψη με τα ένζυμα *SacI* και *XbaI* των δειγμάτων DNA πριν την υποβολή τους σε πέψη με τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*, για λόγους που αναφέρονται στο κεφάλαιο «Αποτελέσματα».

2.4.1 Πέψεις γενωμικού DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Περίπου 30 μ g γενωμικού DNA υπόκειται σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *XbaI*. Το ένζυμο *XbaI* έχει μια θέση αναγνώρισης στην αρχή της κατασκευής τύπου φουρκέτας (pan handle ή hairpin κατασκευή) που φέρουν τα διαγονιδιακά φυτά και το *SacI* έχει μια θέση αναγνώρισης στο τέλος της εν λόγω κατασκευής. Έτσι η πλήρης πέψη με τα παραπάνω ένζυμα απελευθερώνει ολόκληρο το διαγονίδιο, μεγέθους 2767bp. Η αντίδραση πέψης αποτελείται από το DNA, το διάλυμα δράσης που είναι κατάλληλο και για τα δύο ένζυμα (με βάση τις συστάσεις της εταιρείας) σε τελική συγκέντρωση 1x, BSA σε τελική συγκέντρωση 1x και 150 units από κάθε ένζυμο. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 600 μ l. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 4 ώρες. Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης, αφαιρείται από κάθε δείγμα μια μικρή ποσότητα για να ελεγχθεί ηλεκτροφορητικά η επιτυχία της πέψης. Εφόσον είναι επιτυχής ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με απόλυτη αιθανόλη, πλύσιμο της πελέτας με 70% αιθανόλη, στέγνωμα αυτής και επαναδιάλυση σε αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια μοιράζουμε το διάλυμα σε τρία δοχεία. Στο ένα εισάγεται το 1/5 του διαλύματος και στα άλλα δύο εισάγονται τα 2/5 του διαλύματος. Το μεν πρώτο θα το χρησιμοποιηθεί για ανάλυση κατά Southern για να ελεγχθεί εάν η πέψη του γενωμικού DNA με τα ένζυμα *SacI* και *XbaI* ήταν πλήρης. Ενώ στα άλλα δύο μέρη θα ακολουθήσει δεύτερη πέψη με τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*. Στα δείγματα που πρόκειται να ακολουθήσει πέψη με *MspI* ή *HpaII* προστίθεται το κατάλληλο διάλυμα δράσης του ενζύμου σε τελική συγκέντρωση 1x και αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 200 μ l (συνυπολογίζοντας και τον όγκο του ενζύμου που πρόκειται να προστεθεί) και αφήνονται overnight στους 4°C. Τα δείγματα που πρόκειται να κοπούν με *MspI* ή *HpaII* υποβάλλονται σ' αυτή τη διαδικασία για να χαλαρώσει η δομή του DNA και να είναι ευκολότερη η πρόσβαση των εν λόγω ενζύμων στη θέση αναγνώρισης τους. Την επόμενη μέρα προσθέτονται 100 units του ενζύμου *MspI* ή *HpaII* στο αντίστοιχο δείγμα και η αντίδραση πραγματοποιείται για 7 ώρες στους 37°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης μειώνεται ο όγκος της σε λυοφιλοποιητή και τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας ανάλογα με το μέγεθος των ζωνών που αναμένονται. Το πήκτωμα αγαρόζης περιλαμβάνει βρωμιούχο εθίδιο. Επίσης μαζί με τα δείγματα φορτώνονται και δύο μάρτυρες, με βάση τους οποίους θα προσδιοριστεί το μέγεθος των ζωνών που θα ανιχνευτεί. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε τάση 20 Volts για περισσότερο από 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης η πηκτή φωτογραφίζεται υπό UV ακτινοβολία μαζί με ένα χάρακα για να είναι γνωστό το ύψος στο οποίο έτρεξε η κάθε ζώνη του μάρτυρα.

2.4.2 Τριχοειδής μεταφορά του DNA σε νάυλον μεμβράνη

Η πηκτή υπόκειται στους ακόλουθους χειρισμούς για να είναι δυνατή η τριχοειδής μεταφορά των μορίων DNA στη μεμβράνη: τοποθετείται σε διάλυμα 0,2 N HCl και αναδεύεται για 10 λεπτά. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 1,5 M NaCl και 0,5 N NaOH για 45 λεπτά υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται ρύθμιση του pH με τοποθέτηση της πηκτής σε διάλυμα 1 M Tris pH 7,4 και 1,5 M NaCl για 30 λεπτά υπό

ανάδευση. Το διάλυμα αλλάζεται και η πηκτή αναδεύεται για άλλα 15 λεπτά στο παραπάνω διάλυμα. Κατόπιν τοποθετείται σε διάλυμα 10x SSC για 10 λεπτά και ακολουθεί τοποθέτηση της σε κατάλληλη συσκευή για τριχοειδή μεταφορά των μορίων DNA σε νάυλον μεμβράνη (Nytran-N). Το διάλυμα μεταφοράς είναι 10x SSC και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε 2x SSC προτού τοποθετηθεί επάνω στο πήκτωμα. Η διαδικασία μεταφοράς αφήνεται για 12 ώρες. Όταν ολοκληρωθεί, η μεμβράνη πλένεται σε διάλυμα 2x SSC για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αγαρόζης και στεγνώνεται. Μετά υπόκειται στην επίδραση UV ακτινοβολίας ενέργειας 60.000 μJoules για να μονιμοποιηθούν τα μεταφερόμενα μόρια DNA επάνω στη μεμβράνη. Επίσης μετά το τέλος της διαδικασίας μεταφοράς το πήκτωμα βάφεται με βρωμιούχο εθίδιο και φωτογραφίζεται υπό UV ακτινοβολία για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Στη συνέχεια η μεμβράνη φυλάσσεται σε ασφαλές μέρος ως ότου υβριδοποιηθεί με το κατάλληλο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

2.5 Ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή

Η ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή βασίστηκε επίσης σε ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση και σε ηλεκτροφορητική ανάλυση των πέψων. Με τη διαφορά ότι η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήγμα πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των μορίων DNA στη μεμβράνη.

Περίπου 40-50μg DNA υπόκειται σε ταυτόχρονη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Xba*I, τα οποία διαθέτουν θέσεις αναγνώρισης στην αρχή και στο τέλος του «mas» τμήματος του εκκινητή αντίστοιχα. Ακολουθεί και δεύτερη πέψη με τα ισοσχιζομερή ένζυμα *Msp*I και *Hpa*II, τα οποία διαθέτουν θέση αναγνώρισης εντός του «mas» τμήματος. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια με αυτή που περιγράφηκε για την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής με τη διαφορά ότι τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης, λόγω του ότι τα μεγέθη των ζωνών που αναμένεται να ανιχνευτούν είναι πολύ μικρά. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα είναι 6%. Η ακρυλαμίδα που χρησιμοποιείται είναι μείγμα μόνο και δις-ακρυλαμίδα σε αναλογία 38:2. Η πηκτή αποτελείται από 6% ακρυλαμίδα, 8M ουρία, 0.5x TBE και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό ως τα 60ml. Προστίθεται 250μl APS 10% και 50μl TEMED για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης.

Τα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος φόρτωσης και βράζονται για 5 λεπτά. Αμέσως μετά τοποθετούνται στο πάγο. Μαζί ηλεκτροφορούνται και δυο μάρτυρες. Το διάλυμα φόρτωσης αποτελείται από 95% φορμαμίδη, 1mM EDTA pH 8, 0.1% κυανού της βρωμοφαινόλης και 0.1% κυανού του ξυλενίου. Αφού τα πηγάδια της πηκτής ξεπλυθούν από τα υπολείμματα της ουρίας, τα δείγματα φορτώνονται και ηλεκτροφορούνται σε σταθερή ένταση ρεύματος 40mA, τάση 800V και υπό θερμοκρασία 50-55°C. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με βρωμιούχο εθίδιο και φωτογραφίζεται υπό UV ακτινοβολία μαζί με ένα χάρακα για να είναι εφικτός ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνών που θα ανιχνευτούν.

Ακολουθεί ηλεκτρο-μεταφορά (electro-blotting) του DNA από τη πηκτή πολυακρυλαμίδης σε νάυλον μεμβράνη. Δηλαδή πραγματοποιείται η μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων μέσω ηλεκτρικού πεδίου και βασίζεται στη κίνηση των νουκλεϊκών οξέων από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Αυτή γίνεται σε σταθερή ένταση ρεύματος 40mA, τάση περίπου 10V, σε θερμοκρασία 4°C και για 12 ώρες.

Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με 2x SSC, στέγνωμα αυτής και υπόκειται στην επίδραση UV ακτινοβολίας ενέργειας 60.000 μ Joules.

2.6 Υβριδοποίηση

Η μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί και μονιμοποιηθεί τα μόρια DNA τοποθετείται σε κύλινδρο υβριδοποίησης με το διάλυμα προϋβριδοποίησης για περίπου 2 ώρες στους 60°C, υπό ανάδευση. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αποτελείται από 5x SSC, 1% SDS, 250 μ g/ml tRNA και 1x Denhards. Μετά την προϋβριδοποίηση προστίθεται στο ίδιο διάλυμα ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής και ακολουθεί η υβριδοποίηση για περίπου 12 ώρες υπό τις ίδιες συνθήκες με την προϋβριδοποίηση. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος υβριδοποίησης και πλύσιμο της μεμβράνης για 5 λεπτά με 2x SSC, για 20 λεπτά με 2x SSC και 0,2% SDS και τέλος για 10 λεπτά με 0,2x SSC και 0,2% SDS. Ακολουθεί πλαστικοποίηση της μεμβράνης και τοποθετείται σε μεταλλική θήκη (κασέτα) μαζί με το φιλμ για έκθεση. Η κασέτα τοποθετείται στους -80°C για 5-7 ημέρες έως ότου εμφανιστεί το φιλμ.

2.7 Παρασκευή ραδιοσημασμένου ανιχνευτή μέσω *in vitro* αντιγραφής.

Η σύνθεση του ανιχνευτή γίνεται με την πολυμεριστική δράση του τμήματος Klenow της DNA πολυμεράσης I και ως εκκινητές χρησιμοποιούνται τυχαία οκτανουκλεοτίδια (Random Primers). Επίσης ως μήτρα αντιγραφής χρησιμοποιείται τμήμα DNA ταυτόσημο με αυτό που θέλουμε να ανιχνεύσουμε και για τη ραδιοσήμανση χρησιμοποιείται [γ -32P]CTP και [γ -32P]ATP. Το μείγμα αντίδρασης περιλαμβάνει 10 μ M dGTP, 10 μ M dTTP, 1x διαλύματος τυχαίων εκκινητών, 50ng DNA (template), 40 units ενζύμου Klenow, 5mCi/ml [γ -32P]CTP και 5mCi/ml [γ -32P]ATP. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μ l, στους 37°C για 1 ώρα. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση προσθέτονται 5 μ l διαλύματος τερματισμού και αυξάνεται ο όγκος στα 100 μ l. Ο ανιχνευτής απομονώνεται στη συνέχεια με στήλη χρωματογραφίας διήθησης. Η στήλη παρασκευάζεται σε υάλινες πιπέτες Pasteur, που στο κάτω μέρος κλείνεται η οπή με υαλόνημα. Μέσα στη στήλη προσθέτονται σφαιρίδια αγαρόζης (Bio-Gel® A-0,5m gel, BIORAD) μέχρι η στάθμη του Bio-Gel να φτάσει 1cm κάτω από την κορυφή της pasteur. Μετά προσθέτονται 5 μ l ειδικής χρωστικής και η στήλη ξεπλύνεται με 1X TE. Αφού η στήλη καθαριστεί από τη χρωστική τοποθετείται στο πρώτο από μία σειρά 10 αποστειρωμένων δοχείων των 1,5 ml. Στη συνέχεια τοποθετείται ο ανιχνευτής στο πάνω μέρος της στήλης και προσθέτονται 400 μ l 1X TE. Αφού περάσουν από την κολόνα, μεταφέρεται η στήλη στο επόμενο δοχείο και προσθέτονται άλλα 100 μ l TE 1X. Η διαδικασία συνεχίζεται ως και το δέκατο δοχείο. Τα ραδιενεργά μόρια RNA βγαίνουν νωρίτερα από τη στήλη σε σχέση με τα ελεύθερα ραδιενεργά νουκλεοτίδια και συνήθως συγκεντρώνονται στο 4^ο-7^ο δοχείο. Τέλος, μετράται η ενεργότητα του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή σε ειδική συσκευή (scintillation counter) σε cpm και υπολογίζεται η ποσότητα που πρέπει να προστεθεί στο διάλυμα υβριδοποίησης ώστε να υπάρχουν 500.000-1.200.000 cpm/ml διαλύματος υβριδοποίησης.

2.8 Απομόνωση φυτικού RNA

0.5-1 gr φυτικού ιστού λειοτριβείται σε υγρό άζωτο και μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα (falcon) των 15ml. Σ' αυτά προστίθεται ομογενοποιημένο διάλυμα (με θέρμανση) 5 ml όξινης φαινόλης και 5 ml διαλύματος εκχύλισης RNA (0,1M LiCl, 100mM Tris-HCl PH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS). Προστίθεται 5ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24/1), γίνεται ισχυρή ανάδευση και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3.300 rpm για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο falcon και προστίθεται ίσος όγκος ουδέτερης φαινόλης. Πάλι τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 3300 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται ξανά σε νέο αποστειρωμένο falcon και τα υπολείμματα της φαινόλης απομακρύνονται με προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 13300 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon, προστίθεται 1/15 όγκου οξικό νάτριο 3M και 2,5 όγκοι κρύας απόλυτης αιθανόλης. Το δείγμα ανακινείται και αφήνεται στους -20°C για 10 λεπτά. Μετά φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 3300 rpm για να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα. Η πελέτα πλένεται με 70% αιθανόλη και αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε 100μl H_2O .

2.9 Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μεταγραφόμενου διαγονιδίου

Περίπου 10-15μgr συνολικού RNA που απομονώθηκε από το διαγονιδιακό φυτό ηλκτροφορούνται σε αποδιατακτική πηκτή αγαρόζης 1.2%. Η αποδιατακτική πηκτή αποτελείται από 1x MOPS, 1.6% (w/w) φορμαλδεύδη και 1.2% αγαρόζη. Ο όγκος συμπληρώνεται με αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100ml.

Τα δείγματα που πρόκειται να ηλκτροφορηθούν αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος φόρτωσης και βράζονται για 4 λεπτά. Αμέσως μετά τοποθετούνται σε πάγο ως ότου φορτωθούν. Η ηλκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 100V για 4-5 ώρες. Το διάλυμα φόρτωσης αποτελείται από 1x MOPS pH 7, 50% formamide deionized, 8% φορμαλδεύδη και 0.02% μπλε της βρωμοφαινόλης.

Η ηλκτροφόρηση πραγματοποιείται ως ότου το διάλυμα φόρτωσης φτάσει στα $\frac{3}{4}$ της πηκτής. Στη συνέχεια η πηκτή υπόκειται σε χρώση με βρωμιούχο εθίδιο για 5 λεπτά και μετά απομακρύνεται η χρωστική με πλύσιμο της πηκτής σε αποστειρωμένο νερό δύο φορές από 20 λεπτά. Βεβαίως η χρώση των νουκλεϊκών οξέων διατηρείται. Έτσι ελέγχεται η ηλκτροφόρηση των δειγμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται τριχοειδής μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων σε μεμβράνη νάυλον όπως ακριβώς περιγράφηκε στην ανάλυση κατά Southern. Η μεμβράνη υπόκειται στην επίδραση UV ακτινοβολίας ενέργειας 120.000 μJoules για να μονιμοποιηθούν τα μεταφερόμενα μόρια RNA επάνω στη μεμβράνη.

Η υβριδοποίηση της μεμβράνης πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6 με μόνη διαφορά ότι η θερμοκρασία προϋβριδοποίησης και υβριδοποίησης είναι 65°C .

2.10 Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση των siRNAs

Περίπου 15-20 μgr ολικού RNA που απομονώνονται από το φυτό ηλκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήγμα πολυακρυλαμίδης. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα είναι 12%. Η ακρυλαμίδη που χρησιμοποιείται είναι

μείγμα μόνο και δις-ακρυλαμίδη σε αναλογία 38:2. Η πηκτή αποτελείται από 12% ακρυλαμίδη, 7M ουρία, 0.5x TBE και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό ως τα 60ml. Προσθέτονται 250μl APS 10% και 50μl TEMED για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Η ουρία προστίθεται γιατί έχει την ιδιότητα να αποδιατάσει τις δίκλωνες μορφές των RNA μορίων.

Τα δείγματα RNA που θα ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος φόρτωσης και βράζονται για 5 λεπτά. Αμέσως μετά τοποθετούνται στο πάγο. Το διάλυμα φόρτωσης αποτελείται από 95% φορμαμίδη, 1mM EDTA pH 8, 0.1% κυανού της βρωμοφαινόλης και 0.1% κυανού του ξυλενίου. Αφού τα πηγάδια της πηκτής ξεπλυθούν από τα υπολείμματα της ουρίας, τα δείγματα φορτώνονται και ηλεκτροφορούνται σε σταθερή ένταση ρεύματος 40mA, τάση 800V και υπό θερμοκρασία 50-55°C. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με βρωμιούχο εθίδιο και φωτογραφίζεται υπό UV ακτινοβολία για να ελεγχθεί η επιτυχία της ηλεκτροφόρησης και για να εκτιμηθεί η ποσότητα του RNA που φορτώθηκε από κάθε δείγμα

Ακολουθεί τριχοειδής μεταφορά των siRNA μορίων από την πηκτή της πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη. Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα 10x SSC για 10 λεπτά και ακολουθεί τοποθέτηση της σε κατάλληλη συσκευή για την τριχοειδής μεταφορά των siRNA μορίων σε νάυλον μεμβράνη (Nytran-N). Το διάλυμα μεταφοράς είναι 10x SSC και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε 2x SSC προτού τοποθετηθεί επάνω στο πήκτωμα. Η διαδικασία μεταφοράς αφήνεται για 12 ώρες. Όταν ολοκληρωθεί, η μεμβράνη πλένεται σε διάλυμα 2x SSC για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αгарόζης και στεγνώνεται. Μετά υπόκειται στην επίδραση UV ακτινοβολίας ενέργειας 120.000 μJoules για να μονιμοποιηθούν τα μεταφερόμενα μόρια RNA επάνω στη μεμβράνη. Επίσης μετά το τέλος της διαδικασίας μεταφοράς το πήκτωμα βάφεται με βρωμιούχο εθίδιο και φωτογραφίζεται υπό UV ακτινοβολία για να εκτιμηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Στη συνέχεια η μεμβράνη φυλάσσεται σε ασφαλές μέρος ως ότου υβριδοποιηθεί με το κατάλληλο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

Η υβριδοποίηση της μεμβράνης πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6 με μόνη διαφορά ότι η θερμοκρασία προϋβριδοποίησης και υβριδοποίησης είναι 53 °C.

2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

1,5 ml από καλά αναπτυγμένη καλλιέργεια στο κατάλληλο αντιβιοτικό, φυγοκεντρείται σε δοχείο των 1,5 ml και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 100μl διαλύματος I (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA). Στη συνέχεια προσθέτονται 200 μl φρέσκου διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% SDS), αναδεύεται το διάλυμα και τοποθετείται για 5 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προσθέτονται 150 μl κρύου διαλύματος III (3M οξικό κάλιο, 11,5% καθαρό οξικό οξύ), αναδεύεται το μείγμα και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3200 rpm. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο δοχείο και γίνεται καθαρισμός με την προσθήκη ίσου όγκου ουδέτερης φαινόλης και απομάκρυνση στη συνέχεια των φαινολικών υπολειμμάτων με την προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24/1). Ακολουθεί κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με την προσθήκη 1/15 του όγκου οξικό νάτριο 3M και 2,5 όγκους απόλυτη αιθανόλη. Στη συνέχεια πλένεται η πελέτα με 70% αιθανόλη και αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε νερό.

2.12 Μετασηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ

Σε 100 μl δεκτικών κυττάρων (JM83 ή DH5a) προστίθεται το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης ή κάποιο πλασμίδιο, το μίγμα ανακινείται ελαφρά και τοποθετείται στο πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια μεταφέρεται στους 40°C για 1 λεπτό και πάλι στο πάγο για 3 λεπτά. Κατόπιν προσθέτονται 400μl θρεπτικού μέσου LB και το μίγμα ανακινείται στους 37 °C για 45-60 sec. Το μίγμα απλώνεται σε τρυβλία petri που περιέχουν στερεό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και επωάζονται στους 37 °C για περίπου 16 ώρες. Στη συνέχεια επιλέγονται αποικίες από το τρυβλίο και εμβολιάζονται σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επωάζεται για 16 ώρες στους 37 °C και ακολουθείται η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

2.13 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις πλασμιδιακές κατασκευές αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο «Αποτελέσματα». Οι περιοριστικές πέψεις έγιναν σύμφωνα με τις συστάσεις και τα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρείας προκειμένου να υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου.

2.14 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Η ανάλυση τμημάτων DNA που πρόκειται να απομονωθούν γίνεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης πυκνότητας. Οι ζώνες του πηκτώματος με το DNA κόβονται με λεπίδα και στη συνέχεια το DNA καθαρίζεται και απομονώνεται ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στο εγχειρίδιο GENECLEAN III της εταιρείας BIO 101. Η μέθοδος βασίζεται στην δέσμευση του DNA σε ειδικά σφαιρίδια γυαλιού. Πρόκειται για μια διαδικασία που χρησιμοποιούμε τόσο για την απομόνωση του DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα σε *in vitro* αντιγραφή όσο και για την απομόνωση τμημάτων DNA που θα χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις σύνδεσης (ligation).

2.15 Κλωνοποίηση ενθεμάτων μέσω της αντίδρασης σύνδεσης

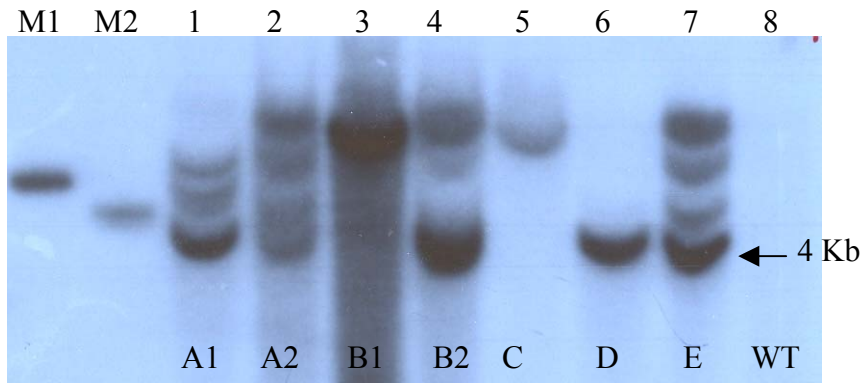
Τα τμήματα DNA που απομονώνονται από την πηκτή αγαρόζης ενσωματώνονται στο πλασμίδιο μέσω μιας αντίδρασης σύνδεσης (ligation). Βεβαίως για να είναι εφικτή η σύνδεση θα πρέπει τα κομμάτια DNA να έχουν συμβατά άκρα, κάτι που επιτυγχάνεται με την επιλογή των κατάλληλων ενζύμων περιορισμού. Στις αντιδράσεις σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T₄ λιγάση και η μοριακή αναλογία φορέα:ένθεμα ήταν 1:3. Το μίγμα αντίδρασης περιέχει επίσης 1mM ATP, το κατάλληλο διάλυμα δράσης του ενζύμου και ο συνολικός όγκος αντίδρασης είναι 10 ή 15 μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16°C για περισσότερο από 3 ώρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποτελέσματα

3.1 Κατά Southern ανάλυση των απογόνων της T4 γενιάς της σειράς CMV28

Οι διαγονιδιακές σειρές της T4 γενιάς που προέρχονται από την σειρά CMV28 ονομάστηκαν CMV28A1, CMV28A2, CMV28B1, CMV28B2, CMV28C, CMV28D και CMV28E. Απομονώθηκε γενωμικό DNA από αυτές τις σειρές και υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Xba*I, το οποίο διαθέτει μια θέση αναγνώρισης στην αρχή της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου. Συνεπώς η πέψη με αυτό το ένζυμο θα προσδιορίσει τον αριθμό των αντιγράφων.



Εικόνα 2. Ανάλυση κατά Southern των ακόλουθων DNA δειγμάτων:

1. CMV28A1/ *Xba*I
2. CMV28A2/ *Xba*I
3. CMV28B1/ *Xba*I
4. CMV28B2/ *Xba*I
5. CMV28C/ *Xba*I
6. CMV28D/ *Xba*I
7. CMV28E/ *Xba*I
8. WT/ *Xba*I

M1: λ BsteII
M2: λ PstI
WT: φυτό αγρίου τύπου

Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα

Οι σειρές CMV28A1, CMV28A2, CMV28B2 και CMV28E έχουν 2 ή περισσότερα αντίγραφα του διαγονιδίου. Ενώ οι σειρές CMV28B1, CMV28C και CMV28 D έχουν ένα αντίγραφο. Κατά την ανάπτυξη των σποροφύτων της T4 γενιάς σε υπόστρωμα MS που φέρει το αντιβιοτικό επιλογής δεν παρατηρήθηκε διάσχιση του πληθυσμού σε καμία από τις σειρές. Συνεπώς οι σειρές που φέρουν μόνο ένα αντίγραφο είναι με βεβαιότητα ομοζυγωτές. Ενώ όσον αφορά τις σειρές με περισσότερα από δυο αντίγραφα, ενδέχεται κάποια από τα αντίγραφα να είναι σε ομοζυγωτή κατάσταση. Πιθανώς σε ομοζυγωτή κατάσταση είναι τα αντίγραφα που αντιστοιχούν στις ζώνες που έχουν μεγαλύτερη ένταση από τις υπόλοιπες.

3.2 Η αντίδραση των διαγονιδιακών σειρών μετά από υποβολή τους σε μηχανική μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV)

Οι σειρές CMV28A2, CMV28B2, CMV28D και CMV28E παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι του CMV μετά την υποβολή τους σε μηχανική μόλυνση. Οι σειρές CMV28B1 και CMV28C παρουσιάζουν ευαισθησία έναντι του CMV. Ενώ η

σειρά CMV28A1 χαρακτηρίζεται ως «μέτριας» ανθεκτικότητας γιατί μόνο ένα μέρος του πληθυσμού της παρουσιάζει ανθεκτικότητα. Οι παραπάνω αντιδράσεις των διαγονιδιακών σειρών έναντι του CMV παρατηρήθηκαν όταν υποβλήθηκαν σε μηχανική μόλυνση κατά τη διάρκεια του Χειμώνα και της Άνοιξης. Επίσης και οι προγονοί τους στην T3 γενιά παρουσίασαν την ίδια αντίδραση. Ωστόσο όταν υποβλήθηκαν σε μηχανική μόλυνση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, τότε προς έκπληξη μας όλες οι σειρές παρουσίασαν ευαισθησία, άλλες σε μεγαλύτερο και άλλες σε μικρότερο βαθμό. Συμπτώματα παρουσίασαν το 20% των φυτών της σειράς CMV28A2 και CMV28B2, το 60% των φυτών της σειράς CMV28A1, το 100% των φυτών της σειράς CMV28B1, CMV28C και CMV28D και το 80% των φυτών της σειράς CMV28E, στην οποία όμως τα συμπτώματα ήταν πολύ ελαφριά. Είναι πιθανό αυτή η διαφορετική συμπεριφορά των διαγονιδιακών φυτών να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, στην συγκέντρωση του ιϊκού μολύσματος που χρησιμοποιήθηκε ή σε κάποιο άλλο άγνωστο παράγοντα.

Επίσης παρατηρούμε στην εικόνα 2 ότι οι διαγονιδιακές σειρές CMV28A2, CMV28B2, CMV28D και CMV28E που φέρουν το αντίγραφο μεγέθους 4 Kb είναι αυτές που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα. Ενώ και η σειρά CMV28A1 φέρει το αντίγραφο των 4Kb και είναι πιθανό το φυτό της σειράς CMV28A1 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ανάλυση να ήταν ανθεκτικό. Επομένως ενδέχεται η παρουσία του αντιγράφου των 4 Kb να είναι χαρακτηριστική της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών της σειράς CMV28.

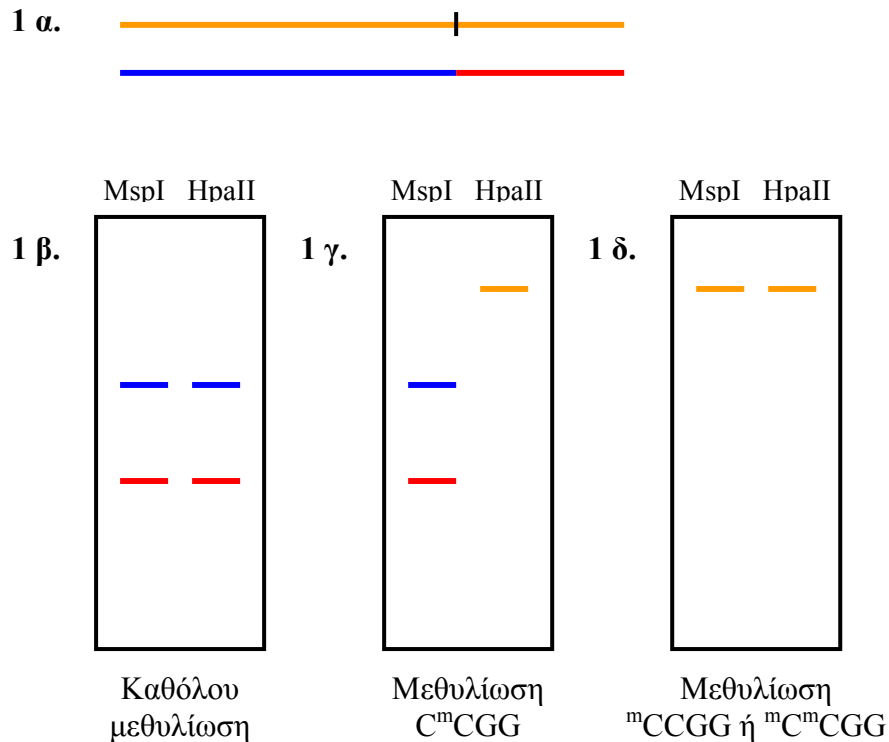
3.3 Ανάλυση της μεθυλίωσης με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση και ανάλυση κατά Southern

Μια κλασική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA βασίζεται σε περιοριστικά ένζυμα που είναι ευαίσθητα στη μεθυλίωση. Ως ευαίσθητα στη μεθυλίωση χαρακτηρίζονται τα ένζυμα που αδυνατούν να κόψουν στη θέση αναγνώρισης τους όταν αυτή είναι μεθυλιωμένη. Ακολουθεί ανάλυση κατά Southern των δειγμάτων DNA που έχουν υποβληθεί σε πέψη και υβριδισμός με ανιχνευτή που είναι συμπληρωματικός του τμήματος του DNA που περιλαμβάνει τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου. Συνήθως επιλέγονται ζεύγη ισοσχιζομερών ενζύμων που διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στη μεθυλίωση έτσι ώστε να είναι δυνατό να εκτιμηθεί εάν το πρότυπο ζωνών που προκύπτει οφείλεται σε μεθυλίωση της θέσης αναγνώρισης των ισοσχιζομερών ή σε παρεμπόδιση της πέψης του DNA από κάποιο άλλο παράγοντα, πέραν της μεθυλίωσης.

Ένα κλασικό ζεύγος ισοσχιζομερών ενζύμων που χρησιμοποιείται είναι το *MspI* και το *HpaII*, τα οποία αναγνωρίζουν την αλληλουχία CCGG. Η μεθυλίωση στην εσωτερική κυτοσίνη της θέσης αναγνώρισης CCGG παρεμποδίζει μόνο το περιοριστικό ένζυμο *HpaII*. Ενώ η μεθυλίωση στην εξωτερική κυτοσίνη της θέσης αναγνώρισης παρεμποδίζει και τα δυο ένζυμα, *MspI* και *HpaII*.

Συνεπώς όπως φαίνεται από το σχήμα 1, όταν η θέση αναγνώρισης δεν είναι μεθυλιωμένη τότε η πέψη με τα ένζυμα *MspI* και *HpaII* δίνει το ίδιο πρότυπο ζωνών του αναμενόμενου μεγέθους. Όταν είναι μεθυλιωμένη η εσωτερική κυτοσίνη της αλληλουχίας CCGG τότε η πέψη με το ένζυμο *HpaII* δίνει ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους απ' ότι η πέψη με το ένζυμο *MspI*. Ενώ όταν είναι μεθυλιωμένη η εξωτερική κυτοσίνη ή και οι δύο κυτοσίνες της αλληλουχίας CCGG τότε και τα δυο ένζυμα δίνουν το ίδιο πρότυπο ζωνών αλλά μεγαλύτερου μεγέθους από το αναμενόμενο.

MspI / HpaII



Σχήμα 1. α. Τμήμα του DNA που περιλαμβάνει μια θέση αναγνώρισης των ενζύμων *MspI* και *HpaII*. Όταν κόβεται αυτή η θέση αναγνώρισης τότε προκύπτουν δύο ζώνες, η μπλε και η κόκκινη. Όταν δεν κόβεται τότε προκύπτει μια ζώνη, η πορτοκαλί. Το πρότυπο ζωνών που προκύπτει από την πέψη του παραπάνω DNA τμήματος από τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*, όταν β. η θέση CCGG δεν είναι μεθυλιωμένη. γ. η εσωτερική κυτοσίνη της θέσης αναγνώρισης είναι μεθυλιωμένη. δ. η εξωτερική κυτοσίνη της θέσης αναγνώρισης είναι μεθυλιωμένη ή και οι δύο κυτοσίνες είναι μεθυλιωμένες.

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μεθυλίωσης του γενωμικού DNA βασίζεται επίσης στην πέψη με ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση αλλά επακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) με εκκινητές που αντιστοιχούν σε περιοχές του DNA αριστερά και δεξιά της θέσης αναγνώρισης. Οπότε εάν η θέση αναγνώρισης είναι μεθυλιωμένη, τότε δεν κόβεται από τα ένζυμα που είναι ευαίσθητα στη μεθυλίωση και η PCR δίνει προϊόν. Ενώ εάν δεν είναι μεθυλιωμένη τότε κόβεται από τα περιοριστικά ένζυμα και συνεπώς η PCR δεν δίνει προϊόν. Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει εάν μια θέση του γενώματος έχει υποστεί μεθυλίωση σε ορισμένα κύτταρα. Ωστόσο μπορεί σε ορισμένα κύτταρα του οργανισμού η θέση που μελετάται να είναι μεθυλιωμένη αλλά σε άλλα κύτταρα να μην είναι και η παραπάνω μέθοδος δεν παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού του ποσοστού των κυττάρων που η παραπάνω θέση είναι μεθυλιωμένη. Ενώ αντίθετα η ανάλυση κατά Southern παρέχει αυτή τη δυνατότητα, καθώς αποτυπώνεται η κατάσταση μεθυλίωσης του γενώματος του συνόλου των κυττάρων.

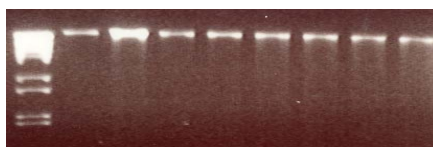
Τέλος μια άλλη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα είναι η δισουλφιδική μέθοδος. Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει τη μεθυλίωση όλης της περιοχής που έχει επιλεχτεί και όχι μόνο μιας θέσης. Ωστόσο είναι τεχνικά δύσκολη, με υψηλό οικονομικό κόστος και δεν είναι πάντα αξιόπιστη. Έτσι επιλέξαμε στην παρούσα εργασία να βασιστούμε στην χρήση ενζύμων ευαίσθητων στην μεθυλίωση και σε ανάλυση κατά Southern, καθώς αποτελεί μια γρήγορη μέθοδο, δίνει τόσο την ποιοτική όσο και την ποσοτική διάσταση της μεθυλίωσης και αποτελεί μια μέθοδο χωρίς ιδιαίτερα υψηλό οικονομικό κόστος.

3.4 Η επιλογή των περιοριστικών ενζύμων για την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου των CMV28 σειρών

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση της μεθυλίωσης του τμήματος της κατασκευής τύπου φουρκέτας που μεταγραφόμενο σχηματίζει δίκλωνο RNA, καθώς είναι αναμενόμενο ότι η *de novo* μεθυλίωση συμβαίνει κατεξοχήν σ' αυτή την περιοχή, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η διασπορά της στις γειτονικές περιοχές. Τα CMV-CP τμήμα της κατασκευής τύπου φουρκέτας διαθέτουν θέση αναγνώρισης των ενζύμων *MspI* και *HpaII*. Έτσι επιλέγει αυτό το ζεύγος ισοσχιζομερών για την μελέτη της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου.

Οι αρχικές προσπάθειες για την ανάλυση της μεθυλίωσης των διαγονιδιακών σειρών με τα ένζυμα *MspI* και *HpaII* ήταν ανεπιτυχείς, καθώς για άγνωστους λόγους παρεμποδιζόταν η πέψη του γενωμικού DNA από τα παραπάνω ένζυμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.

M 1 2 3 4 5 6 7 8



Εικόνα 3 . Πέψεις γενωμικών DNA από τις CMV28 σειρές με το ένζυμο *HpaII* (αριθ. 1-4) και με το ένζυμο *MspI* (αριθ. 5-8).

Οπότε θεωρήθηκε ότι οι απομονώσεις του γενωμικού DNA περιείχαν φυτικούς παράγοντες π.χ πολυσαγχαρίτες που παρεμπόδιζαν την δράση των περιοριστικών ενζύμων. Γι' αυτό δοκιμάστηκαν διάφοροι μέθοδοι απομόνωσης του φυτικού DNA για την εξασφάλιση καθαρού DNA. Η πιο αποτελεσματική ήταν η προσθήκη στη μέθοδο "Dellaporta" του βήματος CTAB. Τότε βελτιώθηκε η πέψη από το ένζυμο *MspI*, ωστόσο το ένζυμο *HpaII* εξακολουθούσε να αδυνατεί να κόψει το φυτικό DNA. Αυτό δημιούργησε προβληματισμό και οδήγησε στην υπόθεση ότι το ένζυμο *MspI* και ιδίως το *HpaII* παρουσιάζουν εν γένει δυσκολίες στην δράση τους. Η επόμενη σκέψη που έγινε ήταν ότι έπρεπε να υποβοηθηθεί η δράση των περιοριστικών ενζύμων. Ένας πιθανός τρόπος θα ήταν το γενωμικό DNA να έχει διασπαστεί σε τμήματα με την δράση κάποιου ή κάποιων ενζύμων, πριν την υποβολή του σε πέψη από τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*. Ενδεχομένως έτσι να είναι πιο εύκολη η πρόσβαση των παραπάνω ενζύμων στις θέσεις αναγνώρισης τους στο γενωμικό DNA.

Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν για την πέψη του φυτικού DNA πριν την πέψη με τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*, ήταν τα *XbaI* και *SacI* τα οποία διαθέτουν θέση αναγνώρισης στην αρχή και στο τέλος της κατασκευής τύπου φουρκέτας αντίστοιχα. Επιλέχθηκαν αυτά καθώς αφενός διαθέτουν θέση κοπής στην

hr-CMV κατασκευή οπότε θα είναι γνωστό το μέγεθος των ζωνών που αναμένεται και αφετέρου διαθέτουν μόνο μια θέση αναγνώρισης στην κατασκευή, γεγονός που θα διευκολύνει την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

3.5 Το αναμενόμενο πρότυπο ζωνών από την ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου των CMV28 σειρών.

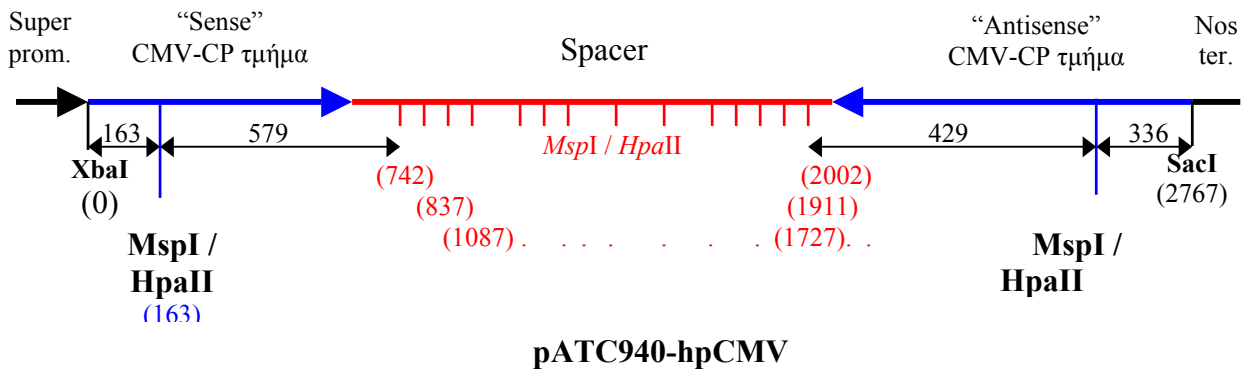
Οι διαγονιδιακές σειρές “CMV28” φέρουν κατασκευή τύπου φουρκέτας του 3’ τμήματος του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του CMV. Η εν λόγω κατασκευή φέρει ένα cDNA τμήμα του CMV μεγέθους 541 bp σε sense κατεύθυνση και ένα cDNA τμήμα του CMV μεγέθους 740 bp σε antisense κατεύθυνση. Το sense τμήμα είναι ομόλογο της 3’ περιοχής του antisense τμήματος. Οι δυο ανεστραμμένες επαναλήψεις διαχωρίζονται από ένα ξένο τμήμα DNA (spacer) μεγέθους 1444 bp, το οποίο προέρχεται από τον βακτηριοφάγο λ.

Τα ένζυμα *XbaI* και *SacI* διαθέτουν θέσεις αναγνώρισης στην αρχή και στο τέλος της κατασκευής τύπου φουρκέτας, αντίστοιχα. Συνεπώς πέψη του pATC940-hrCMV ή των CMV28 σειρών με τα παραπάνω ένζυμα αφαιρεί όλη την κατασκευή τύπου φουρκέτας. Οι ανεστραμμένες επαναλήψεις διαθέτουν μια θέση αναγνώρισης των *MspI* και *HpaII*. Ενώ ο “spacer” διαθέτει 14 θέσεις αναγνώρισης των *MspI* και *HpaII*. Μετά από πλήρη πέψη του pATC940-hrCMV ή των CMV28 σειρών με τα ένζυμα *SacI*, *XbaI* και *MspI* ή *HpaII*, αναμένονται τέσσερις ζώνες που είναι ομόλογες με το CMV τμήμα (Σχήμα 2). Πρόκειται για τις ακόλουθες:

- Η 163 bp ζώνη που προέρχεται από το sense τμήμα του cDNA τμήματος του CMV.
- Η 579 bp ζώνη που προέρχεται από το sense τμήμα του cDNA τμήματος του CMV και περιλαμβάνει ένα τμήμα του “spacer”.
- Η 429 bp ζώνη που προέρχεται από το antisense τμήμα του cDNA τμήματος του CMV και περιλαμβάνει ένα τμήμα του “spacer”.
- Η 336 bp ζώνη που προέρχεται από το antisense τμήμα του cDNA τμήματος του CMV.

Τα παραπάνω μεγέθη ζωνών έχουν επιβεβαιωθεί με ανάλυση κατά Southern του πλασμιδιακού DNA του pATC940-hrCMV μετά από πέψη του με τα ένζυμα *SacI*, *XbaI* και *MspI* ή *HpaII* (Εικόνα 4, δείγμα 7_{1h}). Η ακρίβεια του μεγέθους των ζωνών επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση σε πήγμα πολυακρυλαμίδης.

Ωστόσο εάν κάποιες από τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων είναι μεθυλιωμένη τότε οι ζώνες που θα παρουσιαστούν δεν θα είναι του αναμενόμενου μεγέθους. Έτσι εάν η θέση 163 bp είναι μεθυλιωμένη, είτε στην εξωτερική είτε στην εσωτερική κυτοσίνη τότε το ένζυμο *HpaII* παρεμποδίζεται και συνεπώς θα ληφθεί μια ζώνη μεγέθους 742 bp. Εάν η θέση 2431 bp είναι μεθυλιωμένη τότε θα ληφθεί μια ζώνη μεγέθους 765 bp από την πέψη με το εν λόγω ένζυμο (Πίνακας 1). Ωστόσο εάν υπάρχει μεθυλίωση στον “spacer”, τότε θα ληφθούν άλλα μεγέθη ζωνών από αυτά που αναφέραμε, αναλόγως με το ποιες θέσεις του spacer έχουν μεθυλιωθεί.



Σχήμα 2. Η κατασκευή τύπου φουρκέτας της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) του CMV υπό τον έλεγχο του “Super” εκκινήτη στον μετασχηματισμένο φορέα pATC940. Φαίνονται οι θέσεις κοπής των ενζύμων *XbaI*, *SacI*, *MspI* και *HpaII*. Πάνω από τα βέλη διπλής κατεύθυνσης (↔) φαίνονται τα μεγέθη των τμημάτων που είναι ομόλογα του CMV-CP τμήματος και αναμένονται μετά από πλήρη πέψη του pATC940-hpCMV με τα ένζυμα *XbaI*, *SacI* και *MspI* ή *HpaII*. Επίσης αναγράφονται εντός παρενθέσεων (...) οι θέσεις κοπής των παραπάνω ενζύμων.

Επίσης γνωρίζουμε ότι και το ένζυμο *MspI* παρεμποδίζεται από την μεθυλίωση όταν αυτή εντοπίζεται στη εξωτερική κυτοσίνη της θέσης αναγνώρισης. Συνεπώς εάν είναι μεθυλιωμένη μόνο η εσωτερική κυτοσίνη του CCGG τότε η πέψη με το ένζυμο *MspI* θα δώσει τις ζώνες των 163 bp, 579 bp, 429 bp και 336 bp. Όμως εάν είναι μεθυλιωμένη η εξωτερική κυτοσίνη τότε η πέψη με το *MspI* θα δώσει τις ίδιες ζώνες με αυτές που δίνει η πέψη με το *HpaII*, αλλά μεγαλύτερου μεγέθους από αυτές που θα παρουσιαζόταν εάν δεν υπήρχε μεθυλίωση.

Καμία μεθυλίωση	Μεθυλίωση στη θέση 163	Μεθυλίωση στη θέση 2431
148 bp	727 bp	148 bp
579 bp		579 bp
429 bp	429 bp	765 bp
336 bp	336 bp	


Πίνακας 1. Τα μεγέθη των ζωνών της πέψης του γενωμικού DNA των CMV28 σειρών με τα ένζυμα *SacI*, *XbaI* και *HpaII* που αναμένονται όταν δεν υπάρχει μεθυλίωση ή όταν υπάρχει στη θέση 163 ή στη θέση 2431. Βεβαίως εφόσον δεν υπάρχει μεθυλίωση στην περιοχή του “spacer”.

3.6. Ανάλυση της μεθυλίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου των διαγονιδιακών σειρών CMV28

Η ανάλυση της μεθυλίωσης των διαγονιδιακών σειρών CMV28C και CMV28D πραγματοποιήθηκε δυο φορές κατά την παρούσα εργασία. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε κατά το μήνα Δεκέμβριο και ονομάστηκε Smet 2/12/03 και η

επόμενη πραγματοποιήθηκε κατά το μήνα Ιούλιο και ονομάστηκε Smet 7/7/04. Οι σειρές CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E αναλύθηκαν επίσης δυο φορές. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε στις αρχές του Μαρτίου και ονομάστηκε Smet 4/3/04 και η επόμενη πραγματοποιήθηκε στα τέλη του μηνός Ιουνίου και ονομάστηκε ως Smet 29/6/04.

3.6.1. Ανάλυση της μεθυλίωσης των σειρών CMV28C και CMV28D

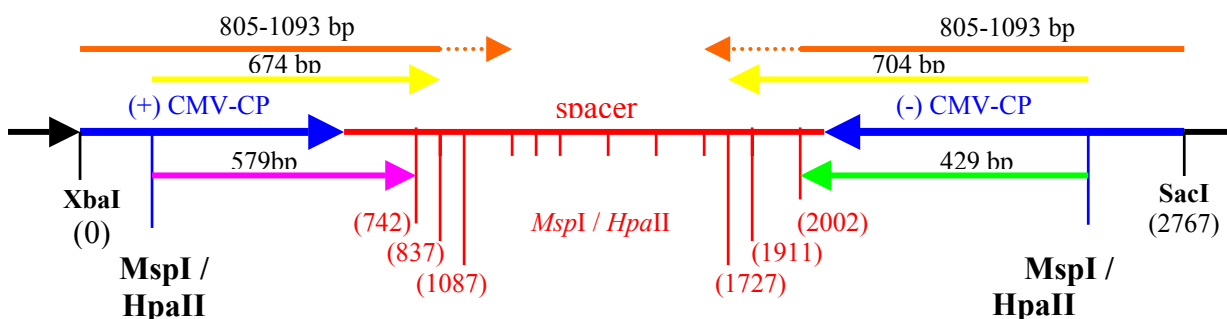
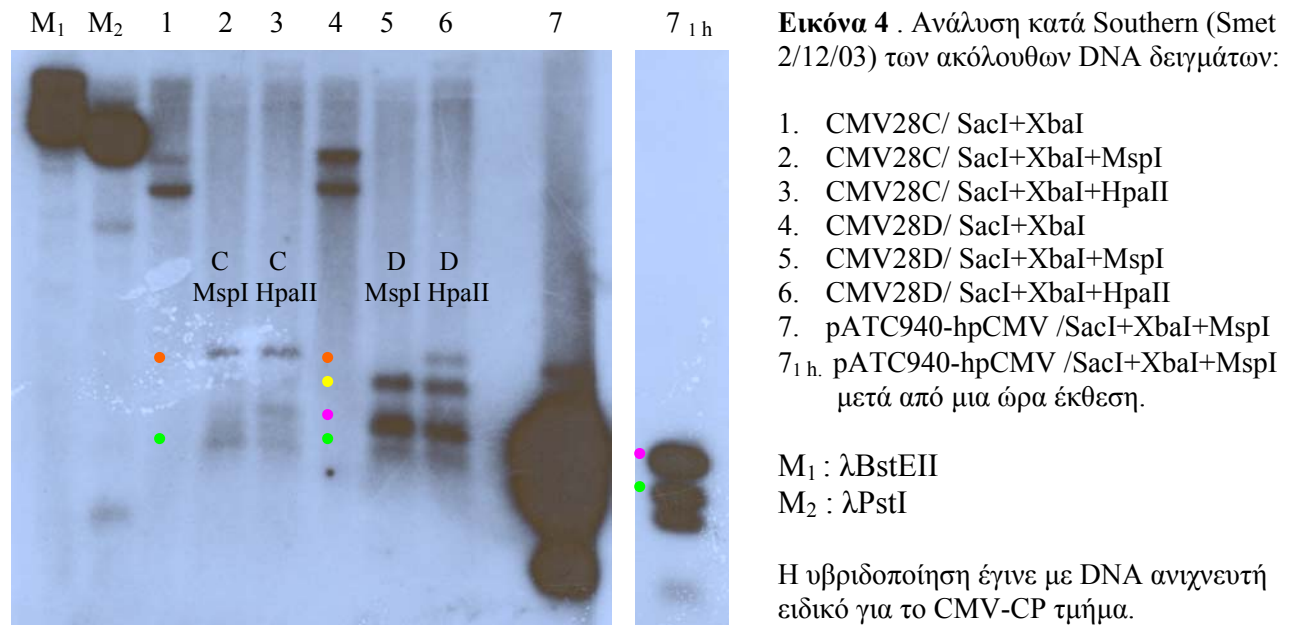
Στο Southern Smet 2/12/03 (εικόνα 4) αναλύεται η μεθυλίωση των σειρών CMV28 C και CMV28 D. Όσον αφορά τη σειρά **CMV28 D** ανιχνεύεται η ζώνη των 579 bp και 429 bp και στις δύο πέψεις, το μέγεθος των οποίων επιβεβαιώνεται από τη σύγκριση με τις ζώνες του pATC940-hpCMV/ *SacI*+*XbaI*+*MspI*. Επιπλέον ανιχνεύεται και στις δύο πέψεις μια ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 700 bp. Αυτή η ζώνη κατά πάσα πιθανότητα ότι οφείλεται σε μεθυλίωση των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων *MspI* και *HpaII* της περιοχής του spacer όταν δεν είναι μεθυλιωμένες οι θέσεις των εν λόγω ενζύμων στα CMV-CP τμήματα. Πρόκειται για μεθυλίωση της εξωτερικής κυτοσίνης καθώς η ζώνη εντοπίζεται και στις δυο πέψεις, χωρίς βεβαίως να αποκλείεται ότι και η εσωτερική κυτοσίνη είναι μεθυλιωμένη στις ίδιες θέσεις. Ενώ στην πέψη με το *HpaII* εντοπίζεται μια επιπλέον ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 805-1093 bp και προτείνεται ότι προέρχεται από ταυτόχρονη μεθυλίωση στις θέσεις των *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων και του spacer και πρόκειται για εσωτερική μεθυλίωση καθώς ανιχνεύεται μόνο στην πέψη με το  II.

Συνεπώς σε ένα υψηλό ποσοστό των κυττάρων δεν υπάρχει μεθυλίωση στις θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων. Οι ζώνες 148 bp και 336 bp δεν ανιχνεύονται πιθανώς λόγω μη επαρκούς ποσότητας DNA που αναλύθηκε. Ωστόσο σ' ένα ποσοστό των κυττάρων οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων είναι μεθυλιωμένες στην εσωτερική κυτοσίνη. Στις γεινιάζουσες προς τα CMV-CP τμήματα περιοχές του spacer ανιχνεύεται μεθυλίωση στις εσωτερικές και στις εξωτερικές κυτοσίνες των θέσεων *MspI/HpaII*.

Όσον αφορά τη σειρά **CMV28 C** ανιχνεύεται η ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 805-1093 bp και προτείνεται ότι προέρχεται από ταυτόχρονη μεθυλίωση στις θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων και του spacer. Πρόκειται για μεθυλίωση της εξωτερικής κυτοσίνης των εν λόγω θέσεων, καθώς η παραπάνω ζώνη ανιχνεύεται και στις δύο πέψεις, χωρίς να αποκλείεται η μεθυλίωση και της εσωτερικής κυτοσίνης αυτών. Επίσης ανιχνεύεται μια ομάδα μη διαχωριζομένων ζωνών (smear) που το μέγεθος τους κυμαίνεται από 429 bp ως 579 bp ή λίγο μεγαλύτερο. Προτείνεται ότι αυτή η ομάδα των μη διαχωριζομένων ζωνών οφείλεται σε μεθυλίωση των θέσεων *MspI/HpaII* του spacer όταν οι θέσεις *MspI/HpaII* εντός των CMV-CP τμημάτων δεν είναι μεθυλιωμένες. Επίσης με προσεκτική παρατήρηση αντιλαμβάνεται κανείς ότι στην πέψη με *MspI* η ομάδα των μη διαχωριζομένων ζωνών “κινείται” προς τα κάτω, ενώ στην πέψη με το *HpaII* “κινείται” προς τα επάνω, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει εσωτερική μεθυλίωση στις θέσεις *MspI/HpaII* του spacer. Συνεπώς σ' ένα ποσοστό των κυττάρων οι παραπάνω θέσεις δεν είναι καθόλου μεθυλιωμένες. Ενώ σ' ένα υψηλό ποσοστό των κυττάρων οι θέσεις *MspI /HpaII* των CMV-CP τμημάτων είναι μεθυλιωμένες στην εξωτερική κυτοσίνη, χωρίς να αποκλείεται και η ύπαρξη μεθυλίωσης στην εσωτερική κυτοσίνη αυτών.

Η συγκριτική μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των δυο παραπάνω σειρών δείχνει ότι η σειρά CMV28C παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης σε σύγκριση με την σειρά CMV28D, καθώς στο CMV28C οι υψηλές ζώνες είναι οι πιο

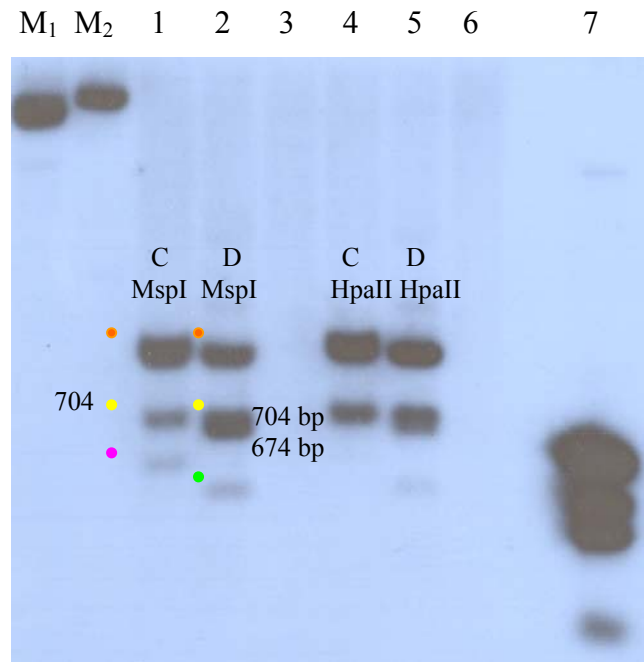
έντονες απ' ότι οι χαμηλές, ενώ στο CMV28D οι χαμηλές ζώνες είναι πιο έντονες απ' ότι οι υψηλές. Επίσης το επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης είναι υψηλότερο στην σειρά CMV28C απ' ότι στην σειρά CMV28D, καθώς η σειρά CMV28C παρουσιάζει μικρότερες διαφορές στο πρότυπο ζωνών μεταξύ των δυο πέψεων σε σύγκριση με τη σειρά CMV28 D.



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση των ζωνών που ανιχνεύονται στην ανάλυση μεθυλίωσης των CMV28C και CMV28D στο Southern Smet 2/12/03. Το κάθε βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη της ανάλυσης Smet 2/12/03 που έχει αριστερά της κουκίδα του ίδιου χρώματος.

Στο Smet 7/7/04 (εικόνα 5) αναλύεται επίσης η μεθυλίωση των σειρών CMV28 C και CMV28 D. Στη σειρά **CMV28C** ανιχνεύεται η ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 805-1093 bp και πιθανώς περικλείει δυο ζώνες που δεν διαχωρίστηκαν. Προτείνεται ότι προέρχεται από ταυτόχρονη μεθυλίωση των θέσεων *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων και του spacer. Επίσης ανιχνεύεται μια ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 579-702bp και προτείνεται ότι προέρχεται από μεθυλίωση των θέσεων *MspI/HpaII* στην περιοχή του spacer, όταν οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων δεν είναι μεθυλιωμένες. Οι παραπάνω ζώνες των 805-1093 bp και 579-702 bp ανιχνεύονται και στις δυο πέψεις συνεπώς πρόκειται

για εξωτερική μεθυλίωση των θέσεων *MspI/HpaII* του spacer και των CMV-CP τμημάτων, χωρίς να αποκλείεται η μεθυλίωση και της εσωτερικής κυτοσίνης αυτών. Επίσης στην πέψη με το *MspI* ανιχνεύεται μια ζώνη που εκτιμάται ότι είναι η 579 bp. Το γεγονός ότι ανιχνεύεται μόνο στην πέψη με το *MspI* σημαίνει ότι μια από τις θέσεις *MspI/HpaII* 163 και *MspI/HpaII* 742 ή και οι δυο θέσεις φέρουν εσωτερική μεθυλίωση σ' ένα ποσοστό των κυττάρων. Επομένως στη σειρά CMV28C σ' ένα ποσοστό των κυττάρων οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων είναι μεθυλιωμένες στην εξωτερική ή στην εσωτερική κυτοσίνη. Ενώ σ' ένα ποσοστό των κυττάρων οι παραπάνω θέσεις δεν είναι μεθυλιωμένες.



Εικόνα 5. Ανάλυση κατά Southern (Smet 7/7/04) των ακόλουθων DNA δειγμάτων:

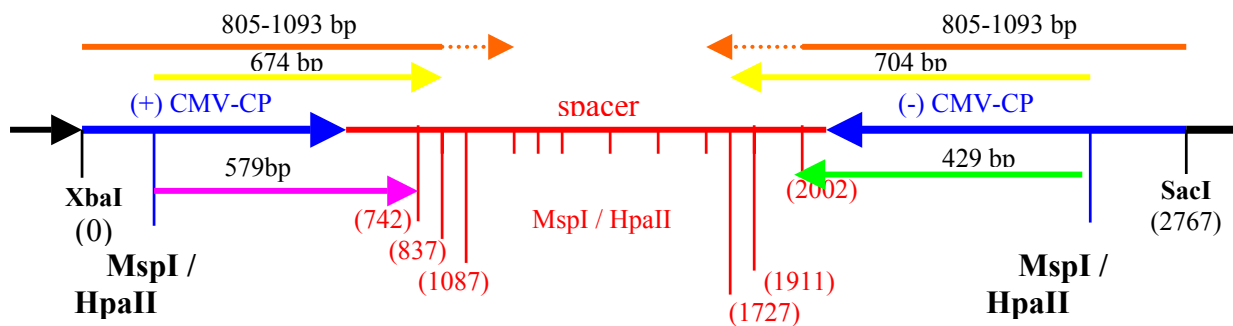
1. CMV28C/ *SacI*+*XbaI*+*MspI*
2. CMV28D/ *SacI*+*XbaI*+*MspI*
3. WT/ *SacI*+*XbaI*+*MspI*
4. CMV28C/ *SacI*+*XbaI*+*HpaII*
5. CMV28D/ *SacI*+*XbaI*+*HpaII*
6. WT/ *SacI*+*XbaI*+*HpaII*
7. pATC940-hpCMV/ *SacI*+*XbaI*+*MspI*

M_1 : λ PstI

M_2 : λ BstEII

WT: αγρίου τύπου φυτό *N. tabaccum*

Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα.



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση των ζωνών που ανιχνεύονται στην ανάλυση μεθυλίωσης των CMV28C και CMV28D στο Southern Smet 7/7/04. Το κάθε βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη της ανάλυσης Smet 7/7/04 που έχει αριστερά της κουκίδα του ίδιου χρώματος.

Ωστόσο συγκρίνοντας το Smet 2/12/03 με το Smet 7/7/04 διαπιστώνεις ότι το συνολικό επίπεδο μεθυλίωσης της σειράς CMV28C αυξήθηκε σημαντικά καθώς δεν παρατηρείται αυτό το smir ζωνών από 429-579 bp που ανιχνεύθηκε στην προηγούμενη ανάλυση. Η μόνη μικρή ζώνη που ανιχνεύθηκε στην ανάλυση Smet 7/7/04 είναι η 579 bp. Αντιθέτως δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά στο επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης της σειράς CMV28C μεταξύ των δυο αναλύσεων. Στην

ανάλυση Smet 7/7/04 οι υψηλές ζώνες ανιχνεύονται και στις δυο πέψεις με *MspI* και *HpaII* και έχουν την ίδια ένταση, κάτι που παρατηρήθηκε και στην ανάλυση Smet 2/12/03. Επίσης και στις δυο αναλύσεις παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πέψεων στις χαμηλές ζώνες. Συνεπώς ο βαθμός διαφοροποίησης του πρότυπου ζωνών των δυο πέψεων της σειράς CMV28C είναι ο ίδιος στις δυο αναλύσεις. Με λίγα λόγια το συνολικό επίπεδο μεθυλίωσης της σειράς CMV28C είναι αυξημένο στην ανάλυση που έγινε τον Ιούλιο σε σύγκριση με το Δεκέμβριο αλλά το επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης διατηρήθηκε στο ίδιο υψηλό επίπεδο.

Όσον αφορά την ανάλυση μεθυλίωσης της σειράς CMV28 D, ανιχνεύεται η ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 805-1093, η ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 579-702 bp και περιλαμβάνει δυο ζώνες, τις 674 bp και 704 bp, και μια ζώνη που εκτιμάται ότι είναι η 429 bp. Το αξιοσημείωτο σ' αυτή την ανάλυση είναι ότι δεν ανιχνεύεται η ζώνη 579 bp, που είχε ανιχνευτεί στην ανάλυση Smet 2/12/03 και μάλιστα η ένταση των υψηλών ζωνών είναι πολύ εντονότερη σε σύγκριση με την ανάλυση Smet 2/12/04. Συνεπώς παρατηρείται μια θεαματική αύξηση του επιπέδου μεθυλίωσης της σειράς CMV28D στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο σε σύγκριση με αυτή που πραγματοποιήθηκε τον Δεκέμβριο. Επιπλέον μειώθηκαν οι διαφορές μεταξύ των πέψεων *MspI* και *HpaII* της σειράς CMV28 D στην ανάλυση Smet 7/7/04 σε σύγκριση με την ανάλυση Smet 2/12/03, γεγονός που σημαίνει ότι αυξήθηκε το επίπεδο της εξωτερικής μεθυλίωσης.

Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι δυο σειρές δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στο πρότυπο ζωνών που παρουσιάζουν στην ανάλυση Smet 7/7/04, σε αντίθεση με την ανάλυση Smet 2/12/03. Αυτό είναι αποτέλεσμα του ότι αυξήθηκε το επίπεδο μεθυλίωσης της σειράς CMV28D. Ωστόσο η σειρά CMV28C συνεχίζει να παρουσιάζει λίγο υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης σε σύγκριση με τη σειρά CMV28D.

	Δεκέμβριος		Ιούνιος	
	Επίπεδο μεθυλίωσης	Διαφοροποίηση των πέψεων με <i>MspI</i> και <i>HpaII</i>	Επίπεδο μεθυλίωσης	Διαφοροποίηση των πέψεων με <i>MspI</i> και <i>HpaII</i>
CMV28 C	Μέτριο	Μικρή	Υψηλό	Μικρή
CMV28 D	Μέτριο	Μεγάλη	Υψηλό	Μικρή

Πίνακας 2. Το επίπεδο συνολικής μεθυλίωσης και η διαφοροποίηση του πρότυπου ζωνών των πέψεων με *MspI* και *HpaII* των σειρών CMV28 C και CMV28 D στις αναλύσεις Smet 2/12/03 (Δεκέμβριος) και Smet 29/6/04 (Ιούνιος).

3.6.2. Ανάλυση της μεθυλίωσης των σειρών CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E

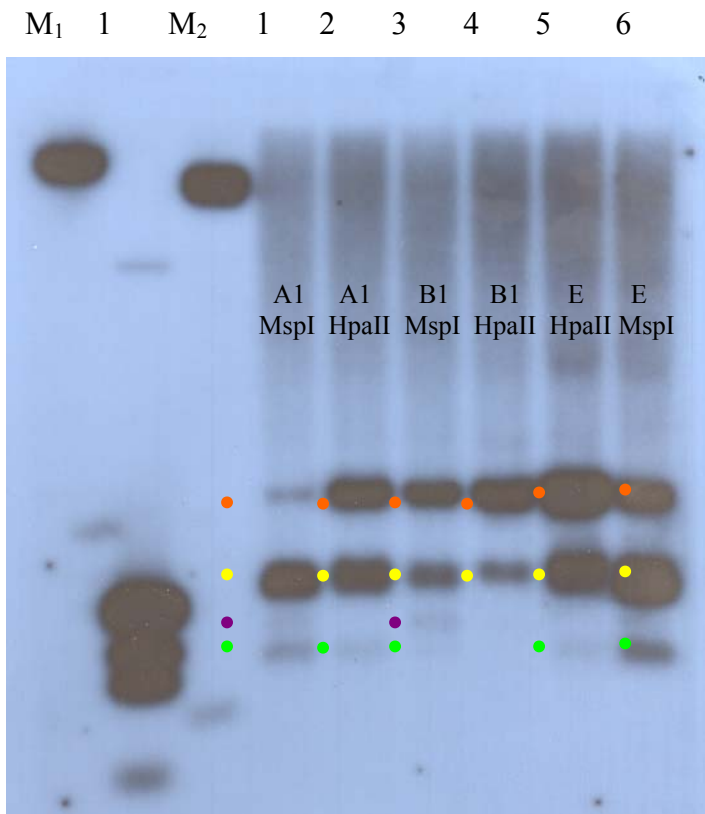
Στο Smet 4/3/04 (εικόνα 6) αναλύεται η μεθυλίωση των σειρών CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E. Όσον αφορά τη σειρά **CMV28A1** παρατηρείται μια ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 805-1093 bp, η οποία είναι ιδιαίτερη έντονη στην πέψη με το *HpaII*, ενώ στην πέψη με το *MspI* μόλις που είναι ανιχνεύσιμη. Προτείνεται ότι προέρχεται από ταυτόχρονη μεθυλίωση των θέσεων *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων και μεθυλίωση των θέσεων *MspI/HpaII* που είναι στην περιοχή του spacer. Πρόκειται για μεθυλίωση κατεξοχήν εσωτερική καθώς η ζώνη είναι ιδιαίτερα έντονη στην πέψη με το *HpaII*, ενώ σ' ένα ποσοστό των κυττάρων υπάρχει

και εξωτερική μεθυλίωση καθώς η εν λόγω ζώνη είναι ανιχνεύσιμη και στην πέψη με το *MspI*. Επίσης ανιχνεύεται μια ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 579-702 bp και πρόκειται για δυο ζώνες, τις 674 bp και 704 bp που δεν έχουν διαχωριστεί. Προτείνεται ότι οφείλεται σε μεθυλίωση εντός του spacer όταν οι θέσεις του *MspI/HpaII* εντός των CMV-CP τμημάτων δεν είναι μεθυλιωμένες. Πρόκειται κατεξοχήν για εξωτερική μεθυλίωση στις θέσεις *MspI/HpaII* του spacer καθώς αυτή η διπλή ζώνη ανιχνεύεται και στις δύο πέψεις. Επίσης στην πέψη με το *MspI* ανιχνεύεται μια ζώνη που το μέγεθος της εκτιμάται ότι είναι 520 bp και προτείνεται ότι προέρχεται από μεθυλίωση της θέσης *MspI/HpaII* 2002 όταν δεν υπάρχει μεθυλίωση στη θέση 2431. Επίσης ανιχνεύεται η ζώνη των 429 bp και στις δυο πέψεις, συνεπώς σε ένα ποσοστό των κυττάρων δεν υπάρχει μεθυλίωση στη θέση 2431. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων είναι μεθυλιωμένες σε ένα ποσοστό των κυττάρων και είναι μεθυλιωμένες κυρίως στην εσωτερική κυτοσίνη. Ενώ σ' ένα ποσοστό των κυττάρων δεν είναι καθόλου μεθυλιωμένες. Ενώ οι θέσεις στον spacer είναι μεθυλιωμένες και στην εσωτερική και στην εξωτερική κυτοσίνη.

Όσον αφορά τη σειρά CMV28B1 παρατηρούνται οι ζώνες που ανιχνεύτηκαν και στο CMV28A1. Ωστόσο δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πέψεων με *MspI* και *HpaII* της σειράς CMV28C. Συνεπώς η σειρά CMV28B1 παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης τόσο στις θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων όσο και του spacer σε σύγκριση με την σειρά CMV28A1. Ωστόσο το συνολικό επίπεδο μεθυλίωσης της σειράς CMV28B1 κυμαίνεται στο ίδιο επίπεδο με τη σειρά CMV28A1.

Όσον αφορά τη σειρά CMV28E ανιχνεύεται η ζώνη των 805-1093 bp, η οποία είναι ιδιαίτερα έντονη και στις δύο πέψεις, επομένως οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων και του spacer είναι μεθυλιωμένες στην εξωτερική κυτοσίνη χωρίς να αποκλείεται και μεθυλίωση στην εσωτερική κυτοσίνη. Επίσης παρατηρείται η διπλή ζώνη των 579-702 bp και στις δυο πέψεις, η οποία προέρχεται από μεθυλίωση στην περιοχή του spacer όταν οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων δεν είναι μεθυλιωμένες. Πρόκειται για εξωτερική μεθυλίωση καθώς ανιχνεύεται και στις δύο πέψεις, ωστόσο παρατηρείται μια μικρή διαφορά στην μορφή αυτής της διπλής ζώνης, κάτι που δεικνύει την ύπαρξη και εσωτερικής μεθυλίωσης. Επίσης ανιχνεύεται η ζώνη των 429 bp και στις δυο πέψεις, συνεπώς σ' ένα ποσοστό των κυττάρων η θέση *MspI/HpaII* 2431 δεν είναι μεθυλιωμένη. Ωστόσο η ένταση της ζώνης των 429 bp είναι μεγαλύτερη στην πέψη με το *MspI*, συνεπώς σ' ένα ποσοστό των κυττάρων η θέση 2431 ή η 2002 είναι μεθυλιωμένη στην εσωτερική κυτοσίνη. Συνεπώς διαπιστώνουμε ότι οι θέσεις *MspI/HpaII* των CMV-CP τμημάτων είναι μεθυλιωμένες σε ένα ποσοστό των κυττάρων και είναι μεθυλιωμένες στην εσωτερική ή/και στην εξωτερική κυτοσίνη. Ενώ σ' ένα ποσοστό των κυττάρων δεν είναι καθόλου μεθυλιωμένες.

Από τη σύγκριση του πρότυπου ζωνών που παρουσιάζουν οι σειρές CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E στην παρούσα ανάλυση μεθυλίωσης, συμπεραίνουμε ότι και οι τρεις σειρές παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο μεθυλίωσης και δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά μεταξύ τους ως προς το επίπεδο της συνολικής μεθυλίωσης. Ωστόσο διαφέρουν ως προς το επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης. Έτσι όλες οι σειρές εμφανίζουν υψηλό επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης, ωστόσο η σειρά CMV28B1 εμφανίζει το υψηλότερο, ενώ οι σειρές CMV28A1 και CMV28E εμφανίζουν χαμηλότερο επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης καθώς παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των πέψεων με *MspI* και *HpaII*.



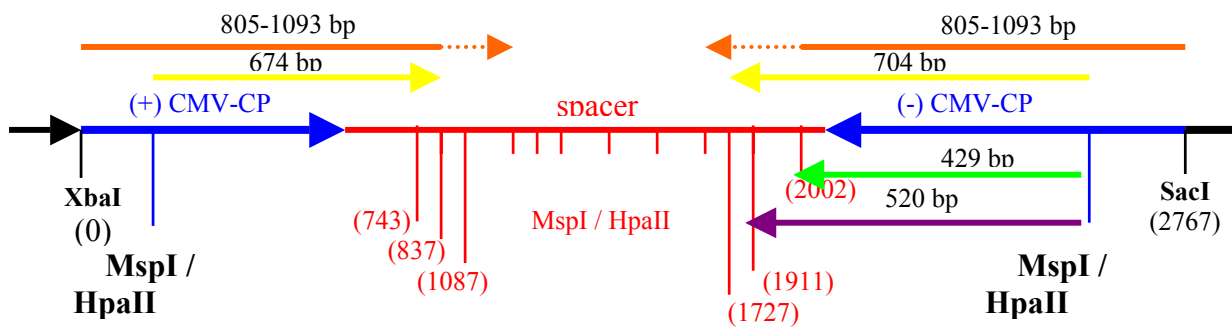
Εικόνα 6. Ανάλυση μεθυλίωσης Smet 4/3/04 των ακόλουθων DNA δειγμάτων:

1. pATC940-hpCMV/ SacI+XbaI+MspI
2. CMV28A1/ SacI+XbaI+MspI
3. CMV28A1/ SacI+XbaI+HpaII
4. CMV28B1/ SacI+XbaI+MspI
5. CMV28B1/ SacI+XbaI+HpaII
6. CMV28E / SacI+XbaI+HpaII
7. CMV28E / SacI+XbaI+MspI

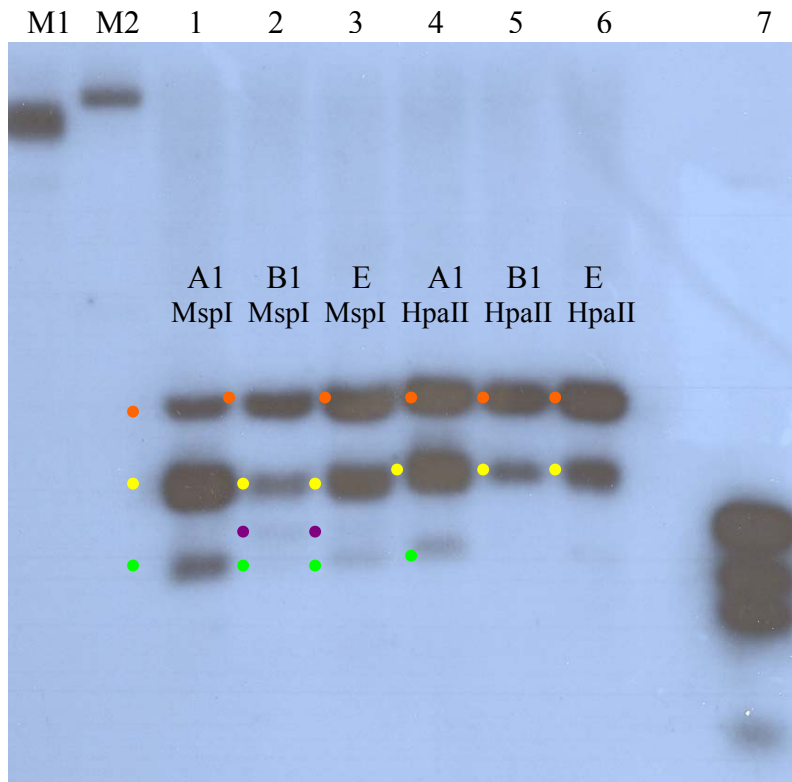
M1: λBstEII

M2: λPstI

Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα.



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση των ζωνών που ανιχνεύονται στην ανάλυση μεθυλίωσης των σειρών CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E στο Southern Smet 4/3/04. Το κάθε βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη της ανάλυσης Smet 4/3/04 που έχει αριστερά της κουκίδα του ίδιου χρώματος.

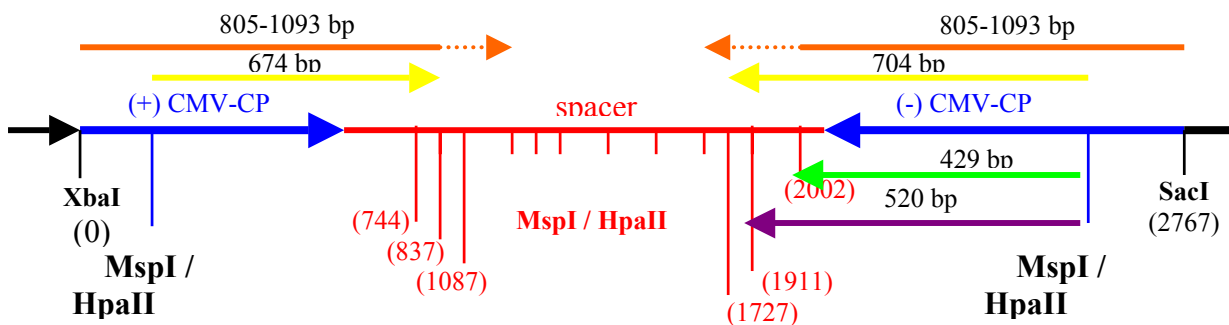


Εικόνα 7. Ανάλυση κατά Southern Smet 29/6/04 των ακόλουθων DNA δειγμάτων:

1. CMV28A1/ SacI+XbaI+MspI
2. CMV28B1/ SacI+XbaI+MspI
3. CMV28E/ SacI+XbaI+MspI
4. CMV28A1/ SacI+XbaI+HpaII
5. CMV28B1/ SacI+XbaI+HpaII
6. CMV28E/ SacI+XbaI+HpaII
7. pATC940-hpCMV/ SacI+XbaI+MspI

M1: λPstI
M2: λBsteII

Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα.



Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση των ζωνών που ανιχνεύονται στην ανάλυση μεθυλίωσης των σειρών CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E στο Southern Smet 4/3/04. Το κάθε βέλος αντιστοιχεί στη ζώνη της ανάλυσης Smet 4/3/04 που έχει αριστερά της κουκίδα του ίδιου χρώματος.

Στο **Smet 29/6/04** (εικόνα 7) αναλύεται η μεθυλίωση των σειρών CMV28 A1, CMV28 B1 και CMV28 E. Στη σειρά CMV28 A1 ανιχνεύονται οι ίδιες ζώνες που ανιχνεύτηκαν στο Smet 4/3/04 με μόνη εξαίρεση την μη ανίχνευση της ζώνης των 520 bp. Ωστόσο έχει αυξηθεί σημαντικά το επίπεδο της εξωτερικής μεθυλίωσης καθώς έχουν μειωθεί οι διαφορές στο πρότυπο των ζωνών που προκύπτουν από τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*. Μάλιστα πρόκειται για πολύ υψηλό επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης τόσο στην περιοχή των CMV-CP τμημάτων όσο και στην περιοχή του spacer. Συνεπώς το συνολικό επίπεδο μεθυλίωσης διατηρείται σε υψηλό επίπεδο και αυξήθηκε σημαντικά το επίπεδο της εξωτερικής μεθυλίωσης.

Η σειρά CMV28 B1 δεν παρουσιάζει διαφορές στο πρότυπο ζωνών που δίνει σε σύγκριση με την ανάλυση Smet 4/3/04. Συνεπώς διατηρεί το υψηλό επίπεδο συνολικής μεθυλίωσης όπως επίσης και το υψηλό επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης

τόσο στην περιοχή του spacer όσο και στην περιοχή των CMV-CP τμημάτων. Το αξιοσημείωτο σ' αυτή τη σειρά είναι η μη μεταβολή της μεθυλίωσης των *MspI* / *HpaII* θέσεων.

Η σειρά CMV28 E διατηρεί το ίδιο πρότυπο ζωνών με αυτό της ανάλυσης Smet 4/3/04, αλλά έχει αυξηθεί το επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης καθώς δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των δύο ενζύμων. Συνεπώς και αυτή η σειρά διατηρεί το υψηλό επίπεδο μεθυλίωσης αλλά έχει αυξηθεί το επίπεδο της εξωτερικής μεθυλίωσης.

Συμπεραίνουμε ότι το συνολικό επίπεδο μεθυλίωσης των σειρών CMV28 A1, CMV28 B1 και CMV28 E διατηρείται στα ίδια υψηλά επίπεδα και στις δυο αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν τον Μάρτιο και τον Ιούνιο. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στο επίπεδο της εξωτερικής μεθυλίωσης στις σειρές CMV28A1 και CMV28E στην ανάλυση του Ιουνίου.

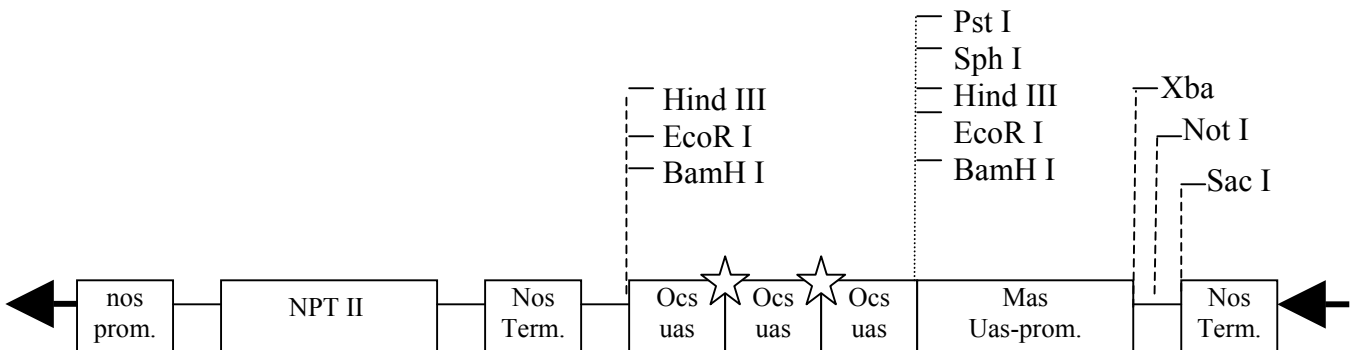
	Μάρτιος		Ιούνιος	
	Επίπεδο μεθυλίωσης	Διαφοροποίηση των πέψεων με <i>MspI</i> και <i>HpaII</i>	Επίπεδο μεθυλίωσης	Διαφοροποίηση των πέψεων με <i>MspI</i> και <i>HpaII</i>
CMV28 A1	Υψηλό	Μεγάλη	Υψηλό	Μικρή
CMV28 B1	Υψηλό	Μικρή	Υψηλό	Μικρή
CMV28 E	Υψηλό	Μεγάλη	Υψηλό	Μικρή

Πίνακας 3. Το επίπεδο συνολικής μεθυλίωσης και η διαφοροποίηση του πρότυπου ζωνών των πέψεων με *MspI* και *HpaII* των σειρών CMV28 A1, CMV28 B1 και CMV28 E στην ανάλυση Smet 4/3/04 (Μάρτιος) και Smet 29/6/04 (Ιούνιος) σε σύγκριση μ' αυτή του Μαρτίου.

3.7 Η δομή του “Super” εκκινητή των διαγονιδιακών σειρών CMV28

Οι διαγονιδιακές σειρές “CMV28” έχουν προέλθει από γενετικό μετασχηματισμό φυτών καπνού με τον μετασχηματισμένο φορέα pATC940, στον οποίο η κατασκευή τύπου φουρκέτας του 3’ τμήματος του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του CMV βρίσκεται υπό τον έλεγχο του εκκινητή (Aocs)₃AmasPmas (Ni *et al.*, 1995; He *et al.*, 1996). Στην παρούσα εργασία ονομάζεται ως “Super” εκκινητής.

Ο “Super” εκκινητής αποτελείται από τρεις διαδοχικές επαναλήψεις των αλληλουχιών του ενεργοποιητή (upstream activator sequences, uas) του γονιδίου της συνθάσης της οκταπίνης (octapine synthase, ocs) και από ένα αντίγραφο των αλληλουχιών του ενεργοποιητή (uas) και του εκκινητή της συνθάσης της μαννοπίνης (mannopine synthase, mas). Η T-DNA περιοχή του pATC940 παρουσιάζεται στο σχήμα 7, όπου φαίνεται και η δομή του “Super” εκκινητή.

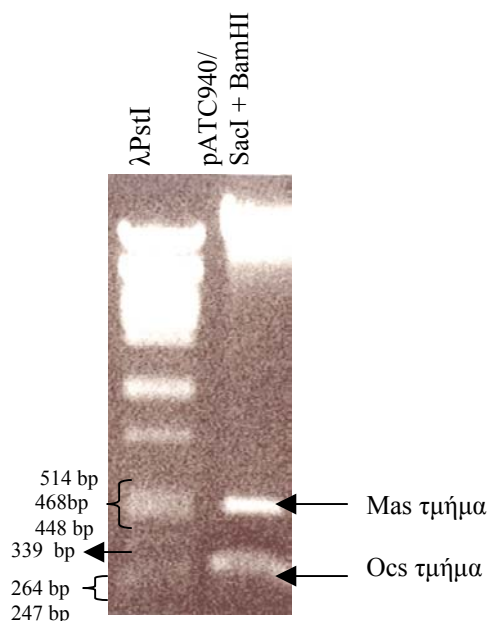


Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση του T-DNA του pATC940, όπου παριστάνεται το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (NPT II) και ο εκκινητής που αποτελείται από τρεις διαδοχικές επαναλήψεις του τμήματος ocs-uas και από το τμήμα mas uas-promoter. Επίσης παριστάνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων που υπάρχουν στον εκκινητή. Τέλος παριστάνονται τα ένζυμα που διαθέτουν θέσεις αναγνώρισης στον πολυσυνδέτη του φορέα και πρόκειται για τα ένζυμα *XbaI*, *NotI* και *SacI*. Τα ένζυμα *XbaI* και *SacI* είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της κατασκευής τύπου φουρκέτας (hp-CMV) στον παραπάνω φορέα. ☆ :Σ’ αυτές τις θέσεις υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα: *HindIII*, *EcoRI* και *BamHI*

Ωστόσο παρόλο που γνωρίζαμε την δομή του εκκινητή, δεν γνωρίζαμε την νουκλεοτιδική αλληλουχία των τμημάτων από τα οποία αποτελείται, ούτε και υπήρχαν δεδομένα που να μας δίνουν με ακρίβεια την αλληλουχία του εκκινητή. Αυτό που ήταν ωστόσο γνωστό είναι τα μεγέθη των τμημάτων από τα οποία απαρτίζεται ο Super εκκινητής. Το mas τμήμα είναι 386 bp και το ocs τμήμα είναι 217 bp (Ni *et al.*, 1995). Συνεπώς ήταν απαραίτητη η αλληλούχιση του εκκινητή για να είναι εφικτή η ανάλυση μεθυλίωσης αυτού στα διαγονιδιακά φυτά. Έτσι κρίθηκε απαραίτητη η κλωνοποίηση των ocs και mas τμημάτων του εκκινητή στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript II KS +/-, ώστε να ακολουθήσει η αλληλούχιση αυτών.

3.8. Κλωνοποίηση των τμημάτων *ocs* και *mas* του εκκινητή στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript

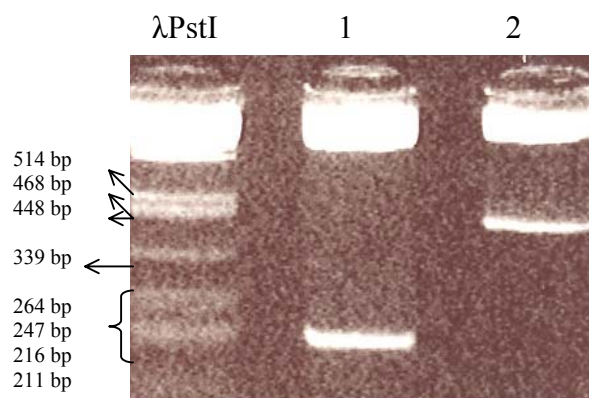
Η πλήρης πέψη του πλασμιδιακού DNA του μη μετασχηματισμένου φορέα pATC940 με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *BamHI*, απέδωσε δυο ζώνες. Η μια ήταν περίπου 450 bp και πρόκειται για το *mas* τμήμα και η άλλη ήταν περίπου 200 bp και πρόκειται για το *ocs* τμήμα του εκκινητή (εικόνα 8). Το γεγονός ότι το μέγεθος του *mas* τμήματος είναι λίγο μεγαλύτερο από αυτό που αναφέρει ο Ni και οι συνεργάτες του (1995) οφείλεται στις περιοχές του πολυσυνδέτη που φέρει στα άκρα του το *mas* τμήμα. Ακολούθησε απομόνωση του DNA των *mas* και *ocs* τμημάτων από το πήκτωμα της αγαρόζης με τη χρήση του Kit BIO101 GeneClean. Στη συνέχεια έγινε αντίδραση σύνδεσης των *mas* και *ocs* τμημάτων με τον φορέα pBluescript II KS +/-, οποίος ήταν κομμένος με τα κατάλληλα ένζυμα. Ο φορέας pBluescript που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση σύνδεσης με το *mas* τμήμα ήταν κομμένος με τα ένζυμα *BamHI* και *SacI*. Ενώ ο φορέας pBluescript που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση σύνδεσης με το *ocs* τμήμα ήταν κομμένος με το ένζυμο *BamHI* και τα άκρα του είχαν αποφωσφορυλιωθεί με τη δράση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (CIP). Το DNA των κομμένων με τα κατάλληλα ένζυμα φορέων απομονώθηκε από το πήγμα αγαρόζης με τη χρήση του Kit BIO101 GeneClean.



Εικόνα 8. Ηλεκτοφορητική ανάλυση της πέψεως του pATC940 από τα ένζυμα *SacI* και *BamHI* σε πήγμα αγαρόζης 1.2 %. Φαίνονται τα μεγέθη των ζωνών της πέψεως του λ φάγου από το ένζυμο *PstI*.

Το προϊόν της κάθε αντίδρασης σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli*. Ακολούθησε επώαση στερεής καλλιέργειας LB που περιείχε αμπικιλίνη (αντιβιοτικό επιλογής για το pBluescript) στους 37 °C overnight, επιλογή αποικιών και καλλιέργεια αυτών σε υγρό μέσο LB με αμπικιλίνη (100mg/ml). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις καλλιέργειες και πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα για να ελεγχθεί εάν ήταν επιτυχής η ένθεση των *mas* και *ocs* τμημάτων στον pBluescript. Για τον έλεγχο της αντίδρασης σύνδεσης του *mas* τμήματος με τον pBluescript έγινε πέψη του

πλασμιδιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *SacI* και *PstI*. Το ένζυμο *PstI* διαθέτει θέση αναγνώρισης στον πολυσυνδέτη του pBluescript, η οποία διατηρείται μετά την απομάκρυνση του τμήματος *SacI-BamHI* από αυτόν. Η πέψη απέδωσε ζώνη μεγέθους περίπου 450 bp (εικόνα 9), που είναι το αναμενόμενο μέγεθος. Ενώ για τον έλεγχο της αντίδρασης σύνδεσης του *ocs* τμήματος με τον pBluescript, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο *BamHI*. Η πέψη απέδωσε ζώνη μεγέθους 200 bp που είναι το αναμενόμενο μέγεθος (εικόνα 9). Στη συνέχεια έγινε αλληλούχιση των *ocs* και *mas* τμημάτων.



Εικόνα 9. Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήγμα αγαρόζης 2.2 % 1) της πέψεως με το ένζυμο *BamHI* του pBluescript στο οποίο εντέθηκε το *ocs* τμήμα και 2) της πέψεως με τα ένζυμα *SacI* και *PstI* του pBluescript στο οποίο εντέθηκε το *mas* τμήμα. Όπως φαίνεται ήταν επιτυχής η κλωνοποίηση των τμημάτων *ocs* και *mas* στον pBluescript.

3.9. Η επιλογή της μεθοδολογίας για την ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή των διαγονιδιακών σειρών CMV28

Η περιοχή *mas* του εκκινητή διαθέτει μια θέση αναγνώρισης για το ζεύγος των ισοσχιζομερών ενζύμων *MspI/HpaII*. Έτσι αποφασίστηκε ότι το ζεύγος αυτό θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεθυλίωσης του εκκινητή των διαγονιδιακών σειρών CMV28. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ανάλυση είναι η πέψη του γενωμικού DNA των διαγονιδιακών σειρών CMV28 με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *XbaI*, τα οποία διαθέτουν θέσεις αναγνώρισης στην αρχή και στο τέλος του *mas* τμήματος του εκκινητή αντίστοιχα (σχήμα 7). Ακολουθεί η πέψη με τα ένζυμα *MspI* και *HpaII*.

Με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του *mas* τμήματος που είναι πλέον γνωστή, η πλήρης πέψη του pATC940 ή των διαγονιδιακών σειρών CMV28 με τα ένζυμα *BamHI* και *XbaI* αποδίδει μια ζώνη μεγέθους 467 bp ομόλογη του *mas* τμήματος. Η κοπή αυτού του τμήματος με το ένζυμο *MspI* ή *HpaII* αποδίδει δυο ζώνες που το μέγεθος τους είναι 181 bp και 286 bp. Συνεπώς εάν αυτή η θέση δεν είναι μεθυλιωμένη τότε θα ανιχνευτούν δυο ζώνες, οι 181 bp και 286 bp. Ενώ εάν είναι μεθυλιωμένη είτε στην εσωτερική είτε στην εξωτερική κυτοσίνη τότε θα ανιχνευτεί μια ζώνη μεγέθους 467 bp στην πέψη του γενωμικού DNA με το ένζυμο *HpaII*. Η πέψη με το ένζυμο *MspI* θα αποδώσει τη ζώνη των 467 bp μόνο στην περίπτωση που είναι μεθυλιωμένη η εξωτερική κυτοσίνη. Σε κάθε άλλη περίπτωση θα αποδώσει δυο ζώνες, τις 181 bp και 286 bp.

Επειδή τα μεγέθη των ζωνών που αναμένονται από την ανάλυση της μεθυλίωσης της περιοχής του εκκινητή είναι μικρά, προτιμήθηκε η ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων να γίνει σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 6% και όχι σε πήγμα αγαρόζης ώστε να εξασφαλιστεί η καλή ανάλυση των αναμενόμενων ζωνών.

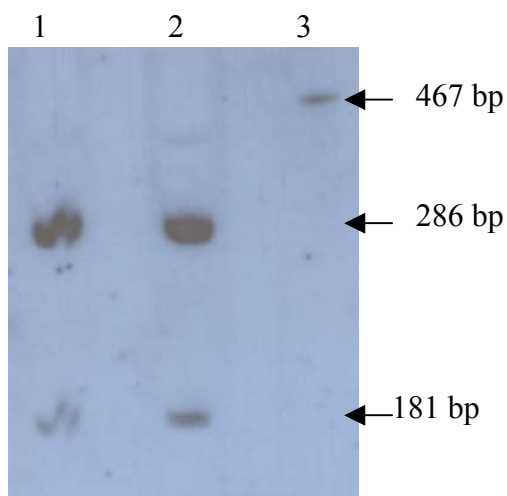
Καμία μεθυλίωση	Μεθυλίωση
181 bp	467 bp
286 bp	

Πίνακας 4. Τα μεγέθη των ζωνών της πέψης του γενωμικού DNA των CMV28 σειρών με τα ένζυμα *Bam*HI, *Xba*I και *Hpa*II που είναι ομόλογα με το mas τμήμα, τα οποία αναμένονται όταν δεν υπάρχει μεθυλίωση ή όταν υπάρχει μεθυλίωση της θέσεως *Msp*I/*Hpa*II του mas τμήματος.

3.10. Ανάλυση της μεθυλίωσης της περιοχής του εκκινητή (promoter) των διαγονιδιακών σειρών CMV28

Η ανάλυση της μεθυλίωσης των σειρών CMV28B1 και CMV28C επιτεύχθηκε με ηλεκτροφόρηση των πέψεων με τα ένζυμα *Bam*HI, *Xba*I και *Msp*I ή *Hpa*II του DNA των παραπάνω σειρών σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 6%. Στις εικόνες 10 και 11 φαίνεται η αυτοραδιογραφία της ανάλυσης της μεθυλίωσης του εκκινητή των σειρών CMV28B1 και CMV28C όπου χρησιμοποιήθηκε DNA ανιχνευτής ομόλογος του mas τμήματος.

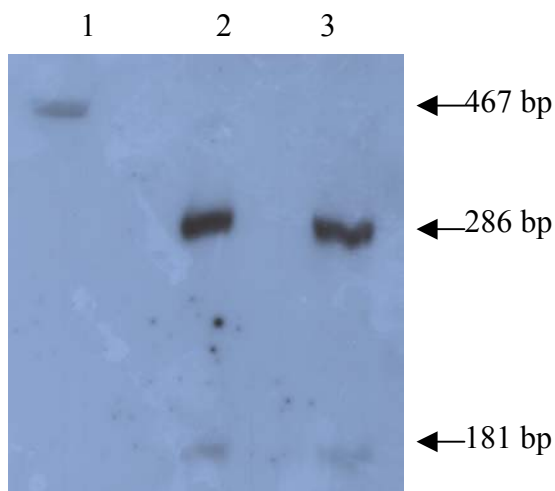
Η ζώνη που προκύπτει από την πέψη του γενωμικού DNA των σειρών CMV28C και CMV28B1 με τα ένζυμα *Bam*HI και *Xba*I είναι του αναμενόμενου μεγέθους (467 bp). Ενώ η επιπλέον πέψη των παραπάνω δειγμάτων είτε με το ένζυμο *Msp*I είτε με το *Hpa*II δίνει δυο ζώνες ομόλογες του mas τμήματος, τις 286 bp και 181bp. Πρόκειται για τις ζώνες που αναμένονται όταν δεν είναι μεθυλιωμένη η θέση αναγνώρισης των ενζύμων *Msp*I και *Hpa*II του mas τμήματος του εκκινητή. Συνεπώς η θέση *Msp*I/*Hpa*II του mas τμήματος του εκκινητή δεν είναι μεθυλιωμένη στις σειρές CMV28B1 και CMV28C, οι οποίες δεν είναι ανθεκτικές.



Εικόνα 10. Ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή της σειράς CMV28B1.

1. CMV28B1/ *Bam*HI + *Xba*I + *Msp*I
2. CMV28B1/ *Bam*HI + *Xba*I + *Hpa*II
3. CMV28B1/ *Bam*HI + *Xba*I

Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικού για το mas τμήμα.

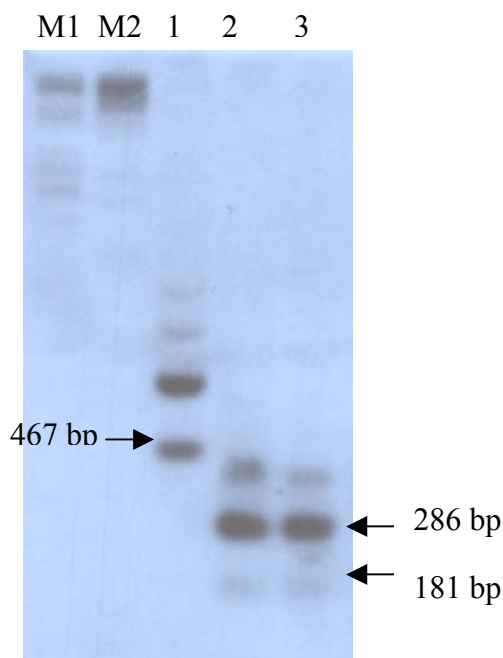


Εικόνα 11. Ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή της σειράς CMV28C

1. CMV28C/ BamHI + XbaI
2. CMV28C/ BamHI + XbaI + HpaII
3. CMV28C/ BamHI + XbaI + MspI

Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το mas τμήμα.

Ωστόσο επειδή η ηλεκτροφορητική ανάλυση των DNA δειγμάτων και η ηλεκτρομεταφορά τους στην νάυλον μεμβράνη παρουσίαζε τεχνικές δυσκολίες επιχειρήθηκε η ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήγμα αγαρόζης πυκνότητας 1.4 %. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση μεθυλίωσης του εκκινητή της σειράς CMV28D. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, ανιχνεύτηκε η ζώνη του αναμενόμενου μεγέθους (467 bp) στην ανάλυση του DNA δείγματος που είχε υποβληθεί σε πέψη με τα ένζυμα *Bam*HI και *Xba*I. Ωστόσο ανιχνεύτηκαν και ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους, πιθανώς λόγω μη πλήρους πέψης του γενωμικού DNA. Ενώ στην ανάλυση των DNA δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε πέψη επιπλέον με το ένζυμο *Msp*I ή *Hpa*II, ανιχνεύτηκαν τρεις ζώνες. Οι δύο από αυτές είναι αναμενόμενου μεγέθους (286 bp και 181 bp). Η επιπλέον ζώνη που ανιχνεύτηκε πιθανώς οφείλεται στην μη πλήρη κοπή των θέσεων *Bam*HI και *Xba*I που υπάρχουν στην αρχή και στο τέλος του mas τμήματος, όπως φαίνεται στη διαδρομή 1 της εικόνας 12.



Εικόνα 12. Ανάλυση κατά Southern των ακόλουθων DNA δειγμάτων:

1. CMV28D/ BamHI + XbaI
2. CMV28D/ BamHI + XbaI + MspI
3. CMV28D/ BamHI + XbaI + HpaII

M1: λPstI

M2: λBsteII

Υβριδισμός με DNA ανιχνευτή ειδικό για το mas τμήμα του εκκινητή.

Συνεπώς η θέση αναγνώρισης των ενζύμων *Msp*I και *Hpa*II στο mas τμήμα του εκκινητή της σειράς CMV28D δεν είναι μεθυλιωμένη.

3.11. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου στις διαγονιδιακές σειρές CMV28 μετά την μόλυνση τους με τον ιό της πατάτας Y (PVY)

Στις διαγονιδιακές σειρές CM8B1 και CMV28C δεν έχει καταστεί δυνατό να ανιχνευτεί το μετάγραφο του διαγονιδίου και τα siRNAs που παράγονται από την πιθανή αποδόμηση αυτού. Αυτή η παρατήρηση γέννησε το ερώτημα εάν η μη ανίχνευση του μεταγράφου οφείλεται στο ότι το διαγονίδιο μεταγράφεται σε πολύ μικρό βαθμό και επιπλέον τα λίγα μετάγραφα αποδομούνται από το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης με συνέπεια να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή τους ή οφείλεται στο ότι το διαγονίδιο δεν μεταγράφεται οπότε έχει υποβληθεί στο μηχανισμό του TGS. Στην προσπάθεια μας να απαντήσουμε σ' αυτό το ερώτημα αποφασίσαμε να μολύνουμε φυτά από τις παραπάνω διαγονιδιακές σειρές με τον ιό Y της πατάτας (*Potato virus Y*, PVY), ο οποίος φέρει τον καταστολέα HC-Pro του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης. Ο HC-Pro αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς καταστολείς της γονιδιακής σίγησης (Anandalakshmi *et al.*, 1998) και ενδεχομένως εάν ο HC-Pro καταστείλει το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης να είναι δυνατή πλέον η ανίχνευση του μεταγράφου που συντίθεται σε μικρό βαθμό καθώς θα παρεμποδιστεί η αποδόμηση του.

Φυτά από τις διαγονιδιακές σειρές CMV28B1 και CMV28C υποβλήθηκαν σε μηχανική μόλυνση με τον ιό PVY. Όπως επίσης φυτά από την σειρά CMV28E και φυτά αγρίου τύπου ως μάρτυρες της όλης διαδικασίας. Όλα τα φυτά που υποβλήθηκαν σε μηχανική μόλυνση παρουσίασαν συμπτώματα της μόλυνσης από τον PVY. Έγινε ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μεταγράφου του διαγονιδίου σε δείγματα ολικού RNA τόσο από φυτά μολυσμένα με τον PVY όσο και από φυτά μη μολυσμένα. Όπως φαίνεται από την εικόνα 13 ανιχνεύτηκε το μετάγραφο μόνο στην σειρά CMV28E. Ενώ δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευτεί το μετάγραφο σε φυτά των σειρών CMV28B1 και CMV28C που είχαν μολυνθεί με τον PVY. Το αξιοπερίεργο είναι η ανίχνευση πολλών ζωνών στο CMV28E, κάτι που πιθανώς οφείλεται στο ότι το μετάγραφο αποδομείται από την Dicer και προκύπτουν τμήματα ποικίλων μεγεθών.



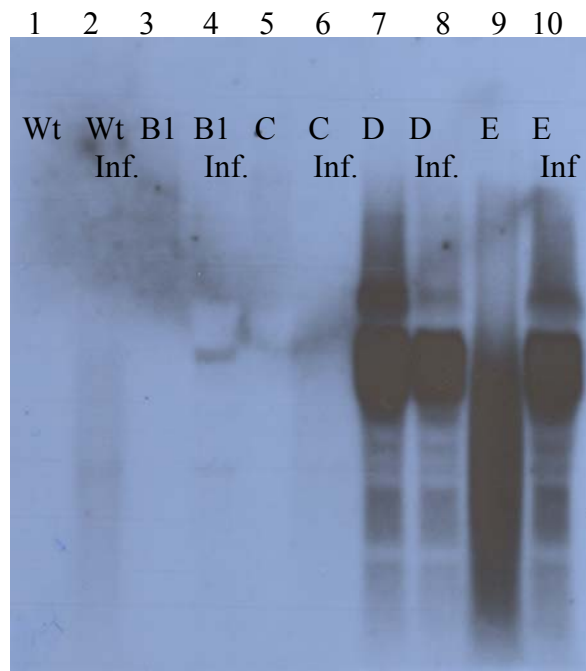
Εικόνα 13 . Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου στις ακόλουθες σειρές:

1. Αγρίου τύπου φυτό μολυσμένο από PVY
2. Φυτό της σειράς CMV28B1
3. Φυτό της σειράς CMV28B1 μολυσμένου με PVY
4. Φυτό της σειράς CMV28C
5. Φυτό της σειράς CMV28C μολυσμένου με PVY
6. Φυτό της σειράς CMV28E
7. Φυτό της σειράς CMV28E μολυσμένου με PVY

Υβριδισμός με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα.

3.12. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου στις διαγονιδιακές σειρές CMV28 μετά την μόλυνση τους με τον ιό CMV

Η επόμενη προσπάθεια για την ανίχνευση του μετάγραφου στις διαγονιδιακές σειρές CMV28B1 και CMV28C ήταν η μόλυνση φυτών από τις παραπάνω σειρές με τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), οποίος φέρει τον καταστολέα 2b του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου του διαγονιδίου σ' αυτά. Η λογική που οδήγησε σ' αυτή την προσπάθεια ήταν η ίδια μ' αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως.



Εικόνα 14 . Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση του μετάγραφου του διαγονιδίου σε δείγματα ολικού RNA από τα ακόλουθα φυτά:

1. Φυτό αγρίου τύπου
2. Φυτό αγρίου τύπου μολυσμένο με CMV
3. Φυτό της σειράς CMV28B1
4. Φυτό της σειράς CMV28B1 μολυσμένο με CMV
5. Φυτό της σειράς CMV28C
6. Φυτό της σειράς CMV28C μολυσμένο με CMV
7. Φυτό της σειράς CMV28D
8. Φυτό της σειράς CMV28D που έχει υποβληθεί σε μηχανική μόλυνση με τον ιό CMV
9. Φυτό της σειράς CMV28E
10. Φυτό της σειράς CMV28E που έχει υποβληθεί σε μηχανική μόλυνση με τον ιό CMV

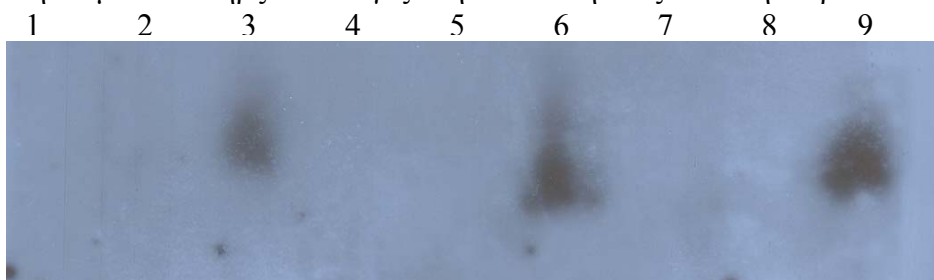
Υβριδοποίηση με DNA ανιχνευτή ειδικό για τον “spacer” της hr-CMV κατασκευής

Ωστόσο όπως φαίνεται στην εικόνα 14 και πάλι δεν επιτεύχθη η ανίχνευση του μετάγραφου του διαγονιδίου στις σειρές CMV28B1 και CMV28C. Όπως φαίνεται

στην εικόνα 14, ανιχνεύτηκε ένα πλήθος ζωνών στο RNA που προέρχεται από φυτό της σειράς CMV 28D είτε αυτό είχε υποβληθεί σε μηχανική μόλυνση είτε όχι και σε φυτό της σειράς CMV28E που είχε υποβληθεί σε μηχανική μόλυνση. Η εικόνα που παρουσιάζει το φυτό της σειράς CMV28E οφείλεται σε αποδόμηση του RNA. Επίσης ανιχνεύτηκαν δυο αγνές ζώνες στο RNA που προέρχεται από το CMV28C που είχε μολυνθεί με τον ιό του CMV οι οποίες δεν προέρχονται από το μετάγραφο. Αυτές οφείλονται σε ομολογία μεταξύ του ιού του CMV και του “spacer” που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής, κάτι που προέκυψε από αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν και δεν παρουσιάζονται εδώ.

3. 13. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση των siRNAs που προέρχονται από την αποδόμηση του μεταγράφου του διαγονιδίου

Το γεγονός ότι οι διαγονιδιακές σειρές CMV28 και ιδίως οι σειρές CMV28C και CMV28D παρουσίασαν αύξηση του επιπέδου μεθυσίας κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε σύγκριση με την περίοδο του Χειμώνα δημιούργησε προβληματισμό ως προς τους παράγοντες που πιθανώς ευθύνονται για αυτή την αλλαγή. Έτσι θελήσαμε να εξετάσουμε εάν οι αλλαγές στο επίπεδο της μεθυσίας συνοδεύτηκαν από αλλαγές στον μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης καθώς πρόκειται για δυο αλληλοσυνδεόμενους μηχανισμούς. Τα siRNAs αποτελούν την πιο αξιόπιστη ένδειξη της λειτουργίας του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης και γι' αυτό θελήσαμε να μελετήσουμε εάν υπήρξαν αλλαγές στην σύνθεση τους κατά τη διάρκεια του έτους.



Εικόνα 15. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση των siRNAs που προέρχονται από την αποδόμηση του μεταγράφου του διαγονιδίου hp-CMV. Το ολικό RNA που αναλύθηκε προέρχεται από τις διαγονιδιακές σειρές CMV28B1, CMV28C και CMV28D και εξήχθη από τα φυτά κατά το μήνα Δεκέμβριο, Απρίλιο και Ιούνιο.

1. CMV28B1 – Δεκέμβριος
2. CMV28C – Δεκέμβριος
3. CMV28D – Δεκέμβριος
4. CMV28B1 – Απρίλιος
5. CMV28C – Απρίλιος
6. CMV28D – Απρίλιος
7. CMV28B1 – Ιούνιος
8. CMV28C – Ιούνιος
9. CMV28D – Ιούνιος

Η ανάλυση έγινε σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 12% και η μεταφορά στη μεμβράνη έγινε τριχοειδώς. Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα. Το ποσό του ολικού RNA που φορτώθηκε ήταν όσο το δυνατόν ισόποσο

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Εικόνα 16. Ανάλυση κατά Northern για την ανίχνευση των siRNAs που προέρχονται από την αποδόμηση του μετάγραφου του διαγονιδίου hp-CMV. Το ολικό RNA που αναλύθηκε προέρχεται από τις διαγονιδιακές σειρές CMV28A1 και CMV28E και εξήχθη από τα φυτά κατά το μήνα Δεκέμβριο, Απρίλιο, Ιούνιο και Αύγουστο.

1. CMV28A1 - Δεκέμβριος
2. CMV28E - Δεκέμβριος
3. CMV28A1 - Απρίλιος
4. CMV28E - Απρίλιος
5. CMV28A1 - Ιούνιος
6. CMV28E - Ιούνιος
7. CMV28A1 - Αύγουστος
8. CMV28E - Αύγουστος
9. WT

Η ανάλυση έγινε σε πήγμα πολυακρυλαμίδης 12% και η μεταφορά στη μεμβράνη έγινε τριχοειδώς. Η υβριδοποίηση έγινε με DNA ανιχνευτή ειδικό για το CMV-CP τμήμα. Το ποσό του ολικού RNA που φορτώθηκε ήταν όσο το δυνατόν ισόποσο.

Όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες 15 και 16 δεν ανιχνεύτηκαν siRNAs στις σειρές CMV28B1 και CMV28C, κάτι που είχε διαπιστωθεί και στην γενιά T2 των εν λόγω σειρών. Μάλιστα δεν ανιχνεύτηκαν σε καμία εποχή. Αντιθέτως ανιχνεύτηκαν τα siRNAs στις σειρές CMV28A1, CMV28D και CMV28E και παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης τους κατά τη μετάβαση από το Χειμώνα στο Καλοκαίρι. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς ο Kalantidis *et al.* (2002) έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των siRNAs είναι μεγαλύτερη στους 32⁰C σε σύγκριση με τους 25⁰C, κάτι μάλιστα που αποδείχτηκε στην T1 γενιά των CMV28 φυτών. Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα από το Szittyá και τους συνεργάτες του (2003), οι οποίοι απέδειξαν ότι οι υψηλές θερμοκρασίες ενεργοποιούν πιο αποτελεσματικά το μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης με συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης των siRNAs. Συνεπώς εάν δεχτούμε την υπόθεση ότι τα siRNAs είναι υπεύθυνα για την μεθυσία των ομόλογων περιοχών του γενόματος, τότε η αυξημένη μεθυσία του διαγονιδίου κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού ενδεχομένως οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση των siRNAs.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε η μεθυλίωση των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων *MspI* και *HpaII* της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου στους T4 απογόνους της διαγονιδιακής σειράς CMV28. Το πρώτο συμπέρασμα που εξάγεται από αυτή την ανάλυση είναι ότι ανιχνεύτηκε μεθυλίωση των κυτοσινών των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων *MspI* και *HpaII* τόσο των CMV-CP τμημάτων όσο και της περιοχής του “spacer”. Με άλλα λόγια ανιχνεύτηκε μεθυλίωση τόσο στην περιοχή που σχηματίζει δίκλωνο RNA κατά την μεταγραφή όσο και στην περιοχή που σχηματίζει λούπα. Συνεπώς είτε υπήρξε διασπορά της μεθυλίωσης από την περιοχή των CMV-CP τμημάτων προς την περιοχή του spacer είτε η μεθυλίωση που ανιχνεύτηκε αποτελεί τυχαίο γεγονός. Η δεύτερη υπόθεση δεν αληθεύει καθώς η μεθυλίωση που ανιχνεύτηκε στις διαγονιδιακές σειρές CMV28 και ιδίως στις σειρές CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E είναι επαναλήψιμη. Ανιχνεύτηκε το ίδιο πρότυπο ζωνών με μικρές διαφορές και στις τρεις σειρές και επαναλήφθηκε σε δυο διαφορετικές αναλύσεις, τις Smet 4/3/04 και Smet 29/6/04. Ενώ και οι σειρές CMV28C και CMV28D στην ανάλυση Smet 7/7/04 παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο ζωνών με μικρές διαφορές σε σύγκριση με τις παραπάνω σειρές. Συνεπώς η μεθυλίωση που ανιχνεύεται δεν αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός καθώς παρουσιάζει επαναληψιμότητα.

Επίσης ένα άλλο στοιχείο που προκύπτει από την παρούσα μελέτη είναι ότι **οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν στην μεθυλίωση**, καθώς παρατηρήθηκε δραματική αύξηση του επιπέδου της μεθυλίωσης στις σειρές CMV28C και CMV28D στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε το καλοκαίρι (Smet 7/7/04) σε σύγκριση με αυτή που πραγματοποιήθηκε το Χειμώνα (Smet 2/12/03). Ενώ και οι σειρές CMV28A1, CMV28B1 και CMV28E παρουσίασαν αύξηση του επιπέδου της εξωτερικής μεθυλίωσης, δηλαδή αυξήθηκε ο αριθμός των αλληλουχιών CCGG που η εξωτερική κυτοσίνη τους είναι μεθυλιωμένη στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε το καλοκαίρι (Smet 29/6/04) σε σύγκριση με αυτή που πραγματοποιήθηκε την Άνοιξη (Smet 4/3/04). Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι ότι εάν τα siRNAs είναι όντως υπεύθυνα για τη μεθυλίωση των ομόλογων περιοχών DNA τότε η αυξημένη παραγωγή τους κατά τη μετάβαση από το χειμώνα προς την άνοιξη είναι υπεύθυνη για την πιο πυκνή μεθυλίωση των ομόλογων περιοχών τους. Ωστόσο στην σειρά CMV28C η οποία παρουσίασε αύξηση του επιπέδου μεθυλίωσης, δεν έχουν ανιχνευτεί siRNAs. Συνεπώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες επιδρούν σε κάποιο άλλο παράγοντα του μηχανισμού της μεθυλίωσης, ο οποίος παραμένει άγνωστος.

Όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας και του επιπέδου της μεθυλίωσης, οι σειρές που μπορούν να συγκριθούν είναι οι CMV28C και CMV28D οι οποίες αναλύθηκαν ταυτόχρονα και οι οποίες έχουν μόνο ένα αντίγραφο του διαγονιδίου, συνεπώς οι ζώνες που ανιχνεύονται προέρχονται μόνο από αυτό το αντίγραφο. Στην ανάλυση Smet 2/12/04 η σειρά CMV28C παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης σε σύγκριση με τη σειρά CMV28D. Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μια περίοδο που τα φυτά της σειράς CMV28C παρουσίαζαν σταθερά ευαισθησία, ενώ τα φυτά της σειράς CMV28D παρουσίαζαν σταθερά ανθεκτικότητα. Επίσης η σειρά CMV28B1 και η σειρά CMV28E εξετάστηκαν μαζί στην ανάλυση Smet 4/3/04 και η CMV28B1 παρουσιάζει υψηλότερο επίπεδο εξωτερικής μεθυλίωσης από την CMV28E. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό των αλληλουχιών CCGG που είναι μεθυλιωμένη η εξωτερική κυτοσίνη είναι υψηλότερο στη σειρά CMV28E σε σύγκριση με τη σειρά CMV28B1. Η παραπάνω ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μια περίοδο που τα φυτά της σειράς CMV28B1 παρουσίαζαν ευαισθησία, ενώ τα φυτά της σειράς CMV28E παρουσίαζαν ανθεκτικότητα. Η σειρά

CMV28B1 έχει ένα αντίγραφο του διαγονιδίου, όμως η σειρά CMV28E έχει τέσσερα αντίγραφα του διαγονιδίου, συνεπώς οι ζώνες που ανιχνεύονται προέρχονται τόσο από τα αντίγραφα που δεν συντελούν στην ανθεκτικότητα του φυτού όσο και από τα αντίγραφα που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα των φυτών. Συνεπώς είναι πιθανόν οι χαμηλές ζώνες που ανιχνεύονται στο CMV28E να προέρχονται από το αντίγραφο που προσδίδει ανθεκτικότητα. **Επομένως παρατηρούμε ότι οι ευαίσθητες σειρές παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό μεθυσίωσης σε σύγκριση με τις ανθεκτικές σειρές. Άρα διαφαίνεται μια συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας και της μεθυσίωσης της κωδικής περιοχής του διαγονιδίου.** Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη.

Το γεγονός ότι οι διαγονιδιακές σειρές προς έκπληξη μας παρουσίασαν άλλη ανταπόκριση έναντι του CMV κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε συμπεράσματα για τη συσχέτιση της μεθυσίωσης και της ανθεκτικότητας από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Ωστόσο κάτι που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι η σειρά CMV28D παρουσίασε δραματική αύξηση του επιπέδου της μεθυσίωσης κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, ενώ και οι υπόλοιπες σειρές παρουσίασαν αύξηση του επιπέδου μεθυσίωσης αλλά σε μικρότερο βαθμό. Αυτό σημειώθηκε σε μια περίοδο που τα φυτά επέδειξαν ευαισθησία έναντι του CMV. Έτσι γεννάται το ερώτημα εάν το αυξημένο επίπεδο μεθυσίωσης συσχετίζεται με η ευαισθησία που επέδειξαν τα φυτά. Αυτό αποτελεί ένα αναπάντητο ερώτημα. Πάντως δεν φαίνεται να συσχετίζεται καθώς ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης ο οποίος συνδέεται με το μηχανισμό της μεθυσίωσης συνεχίζει να είναι λειτουργικός κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού στα ανθεκτικά φυτά και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό καθώς αυξήθηκε η συγκέντρωση των siRNAs, όπως ήταν αναμενόμενο. Επιπλέον η ευαισθησία έναντι του CMV που παρουσίασαν όλες οι διαγονιδιακές σειρές πιθανότατα δεν σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες, γιατί θα αναμενόταν το αντίστροφο, δηλαδή ενίσχυση της ανθεκτικότητας κατά τη διάρκεια των υψηλών θερμοκρασιών του καλοκαιριού. Συνεπώς η αλλαγή που παρουσίασαν οι διαγονιδιακές σειρές στην συμπεριφορά τους κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού οφείλεται σε άγνωστους λόγους.

Επίσης στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι αντίγραφα του ίδιου διαγονιδίου που είχαν εντεθεί σε διαφορετικό γονιδιακό τόπο και που προέρχονται από τον ίδιο αρχικό γονέα, παρουσιάζουν διαφοροποίηση ως προς την έκφραση τους και ως προς το επίπεδο μεθυσίωσής τους. Οι σειρές CMV28C και CMV28D φέρουν ένα αντίγραφο του διαγονιδίου, το οποίο έχει εντεθεί σε διαφορετικό γονιδιακό τόπο και τα οποία προέρχονται από τον ίδιο αρχικό Το γονέα. Στην σειρά CMV28C δεν ανιχνεύτηκε το μετάγραφο του διαγονιδίου ούτε τα siRNAs, ενώ αντιθέτως στη σειρά CMV28D ανιχνεύτηκαν. Επίσης το αντίγραφο της σειράς CMV28C παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδο μεθυσίωσης σε σύγκριση με το αντίγραφο της σειράς CMV28D. Συνεπώς ενώ οι σειρές CMV28C και CMV28D φέρουν το ίδιο διαγονίδιο, εντούτοις διαφέρουν ως προς την έκφραση του διαγονιδίου και ως προς το επίπεδο μεθυσίωσης της κωδικής περιοχής αυτού. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι **ο γονιδιακός τόπος όπου έχει εντεθεί το διαγονίδιο επιδρά στην έκφραση αυτού και στις επιγενετικές τροποποιήσεις που υφίσταται, χωρίς ωστόσο να παραβλέπουμε ότι και άλλοι παράγοντες επιδρούν στους εν λόγω μηχανισμούς.**

Επιπλέον στην παρούσα εργασία αναλύθηκε η μεθυσίωση των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων *MspI* και *HpaII* του εκκινητή του διαγονιδίου. Αυτό που διαπιστώθηκε είναι ότι ο εκκινητής δεν φέρει μεθυσίωση στη θέση *MspI/HpaII* τόσο στις σειρές στις οποίες δεν ανιχνεύεται το μετάγραφο (CMV28B1 και CMV28C) όσο και στις σειρές στις οποίες ανιχνεύεται (CMV28D). Αυτό δημιουργεί προβληματισμό

καθώς θα αναμέναμε ότι στις σειρές όπου δεν ανιχνεύεται το μετάγραφο, το διαγονίδιο να έχει υποστεί μεταγραφική σίγηση (TGS) και επομένως ο εκκινητής να είναι μεθυλιωμένος. Ωστόσο μπορούν να γίνουν ορισμένες υποθέσεις για την εξήγηση αυτής της παρατήρησης. Πρώτον μπορεί ένα υψηλό ποσοστό των κυτοσινών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του εκκινητή να είναι μεθυλιωμένο αλλά να μην είναι μεθυλιωμένη η θέση που μελετάμε. Δεύτερον, μπορεί να πρόκειται για μια από τις λίγες περιπτώσεις TGS που δεν συνοδεύεται από μεθυλίωση του εκκινητή. Τέλος ενδέχεται το διαγονίδιο να μεταγράφεται σε πολύ μικρό βαθμό και να μην ανιχνεύεται το μεταγράφο του. Ωστόσο θεωρώ ότι είναι λίγες οι πιθανότητες η τελευταία υπόθεση να είναι σωστή. Το πιθανότερο είναι να ισχύει μια από τις υπόλοιπες υποθέσεις.

Από την παρούσα ερευνητική εργασία ανέκυψαν τα ακόλουθα: πρώτον, οι συνθήκες του περιβάλλοντος θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την ανάλυση της μεθυλίωσης, καθώς επιδρούν στον μηχανισμό της. Συνεπώς θα πρέπει σε κάθε εποχή να επαναλαμβάνεται η ανάλυση της μεθυλίωσης για 2 ή 3 φορές ώστε να μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα. Δεύτερον, διαφαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της ανθεκτικότητας έναντι ιϊκής μόλυνσης που παρουσιάζουν διαγονιδιακά φυτά που συνθέτουν δίκλωνο RNA που είναι ομόλογο με μέρος του ιϊκού γενώματος, με το επίπεδο της μεθυλίωσης του διαγονιδίου. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη. Τέλος, φαίνεται ότι ο γονιδιακός τόπος όπου εισάγεται το διαγονίδιο επιδρά στην έκφραση αυτού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abel P. P., Nelson R. S., De B., Hoffmann N., Rogers S. G., Fraley R. T., Beachy R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein virus. *Science* 232: 738-743.
2. Akhtar A., Zink D. and Becker P. 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 407: 405-409.
3. Anandalakshmi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe R., Mallory A. C., Smith T. H. and Vance V. B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13079-13084.
4. Angell S. M. and Baulcombe D. C. 1997. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J.* 16: 3675-3684.
5. Aufsatz W., Mette M. F., Winden J., Matzke M. and Matzke J. M. 2002a. RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *PNAS* 99: 16499-16506.
6. Aufsatz W., Mette M. F., Winden J., Matzke M. and Matzke J. M. 2002b. HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J.* 21(24): 6832-6841.
7. Bartee L., Malagnac F. and Bender J. 2001. Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & Development* 15: 1753-1758.
8. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. and Hannon, G. J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
9. Bucher E., Hemmes H., de Haan P., Goldbach R. and Prins M. 2004. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *Journal of General Virology* 85: 983-991.
10. Ding S.-W., Li H., Lu R., Li F. and Li W.-X. 2004. RNA-silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus research* 102: 109-115.
11. Elbashir S. M., Lendeckel W. and Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
12. Faugeron G. 2000. Diversity of homology-dependent gene silencing strategies in fungi. *Current Opinion in Microbiology* 3: 144-148.
13. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
14. Guo H. S. and Ding S. W. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.* 21(3): 398-407.

15. Hamilton A. J. and Baulcombe D. C. 1999. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. *Science* 286: 950-952.
16. Hamilton A., Voinnet O., Chappel L. and Baulcombe D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21: 1671-1679.
17. 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.
18. Hannon G. J. 2002. RNA-interference. *Nature* 418:244-251.
19. He S., Abad A. R., Gelvin S. B. and Mackenzie S. A. 1996. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *PNAS* 93:11763-11768.
20. Ingelbrecht I., Houdt H. V., Montagu M. V. and Depicker A. 1994. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10502-10506.
21. 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.
22. 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.
23. Jones L., Ratcliff F. and Baulcombe D. 2001. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology* 11: 747-757.
24. Kalantidis K., Psaradakis S., Tabler M. and Tsagris M. 2002. The occurrence of Specific short RNAs in Transgenic Tobacco Expressing Virus-Derived Double-Stranded RNA is Indicative of Resistance to the Virus. *MPMI* 15(8) : 826-833.
25. Kawasaki H. and Taira K. 2004. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 431: 211-217.
26. Klahre U., Crete P., Leuenberger S. A., Inglesias V. A. and Meins F. Jr. 2002. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 : 11981-11986.
27. Lewin B. 2000. *Genes VII*, Oxford University Press. pg. 680.
28. Lindbo J. A. and Dougherty W. G. 1992. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189: 725-733.
29. Lindroth A. M., Cao X., Jackson J. P., Zilberman D., McCallium C. M., Henikoff S.

- and Jacobson S. E. 2001. Requirement of chromomethylase3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077-2080.
30. 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.
 31. Mallory A. C., Ely L., Smith T. H., Mrathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L. and Vance V. B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13: 571-583.
 32. Mallory A. C., Mlotshwa S., Bowman L. H. and Vance V. B. 2003. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant Journal* 35: 82-92.
 33. Mallory A. C., Reinhart B. J., Bartel D., Vance V. B. and Bowman L. H. 2002. From the cover: a viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15228-15233.
 34. Mallory C. M. and Vaucheret H. 2004. MicroRNAs: something important between the genes. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 120-125.
 35. Matzke M., Matzke A. J. M. and Kooter J. M. 2001. RNA: Guiding gene silencing. *Science* 293: 1080-1083.
 36. Mette M. F., Aufsatz W., Winden J., Matzke M. A. and Matzke A. J. M. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19:5194-5201.
 37. Mette M. F., Winden J., Matzke M. A. and Matzke A. J. M. 1999. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous in trans. *EMBO J.* 18: 241-248.
 38. Mlotshwa S., Voinnet O., Mette M. F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S. W., Pruss G. and Vance V. B. 2002. RNA silencing and the mobile Silencing Signal. *Plant Cell suppl.* S289-S301.
 39. Moissiard G. and Voinnet O. 2004. Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology* 5(1): 71-82.
 40. Morel J.-B., Mourrain P., Beclin C. and Vaucheret H. 2000. DNA-methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Current Biology* 10: 1591-1594.
 41. Ni M., Cui D., Einstein J., Narasimhulu S., Vergera C. E. and Gelvin S. 1995. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. *Plant Journal* 7(4): 661-676.

42. Papp I., Mette M. F., Aufsatz W., Daxinger L., Schauer S. E., Ray A., Winden J., Matzke M. and Matzke A. J. M. 2003. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiology* 132: 1382-1390.
43. Pelissier T. and Wassenegger M. 2000. A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* 6: 55-65.
44. Pelssier T., Thalmeir S., Kempe D., Sanger H.-L. and Wassenegger M. 1999. Heavy *de novo* methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 27(7): 1625-1634.
45. Roth B. M., Pruss G. J. and Vance V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus research* 102: 97-108.
46. Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K. L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R. H. A. and Fire A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-Triggered gene silencing. *Cell* 107(4): 465-476.
47. Sijen T., Vijn I., Rebocho A., Blokland R., Roelofs D., Mol J. N. M. and Kooter J. M. 2001. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* 11: 436-440.
48. Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittya G., Hornyik C., Tavazza M. and Burgyan J. 2002. A viral protein suppresses RNA-silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21: 3070-3080.
49. Smith N. A., Singh S. P., Wang M.-B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G. and Waterhouse P. M. 2000. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.
50. Susi P., Hohkuri M., Wahlroos T. and Kilby N. J. 2004. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology* 54: 157-174.
51. Szittya G., Silhavy D., Molnar A., Havelda Z., Lovas A., Lakatos L., Banfalvi Z. and Burgyan J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO Journal* 22 (3):633-640.
52. Tang G., Reinhart B. J., Bartel D. P. and Zamore P. D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development* 17: 49-63.
53. Tijsterman M., Ketting R. F. and Plasterk R. H. A. 2002. The genetics of RNAsilencing. *Annu. Rev. Genet.* 36: 489-519.
54. Vaistij F. E., Jones L. and Baulcombe D. C. 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14: 857-867.
55. Van Blokland R., van der Geest N., Mol J., Kooter J. 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal* 6: 861-877.

56. Van der Krol A. R., Mur L. A., de Lange P., Mol J. N. & Stuitje A. R. 1990. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol. Biol.* 14: 457-466.
57. Vance V. and Vaucheret H. 2001. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science* 292: 2277-2280.
58. Voinnet O. 2002. RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 444-451.
59. 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.
60. Volpe T., Kidner C., Hall I. M., Teng G., Grewal S. I. S. and Martienssen R. A. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 Lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833-1837.
61. Wada Y., Ohya H., Yamaguchi Y., Koizumi N. and Sanot H. 2003. Preferential *de novo* methylation of cytosine residues in non-CpG sequences by a Domains Rearranged DNA Methyltransferase from tobacco plants. *Journal of Biological Chemistry* 278(43): 42386-42393.
62. Wassenegger M. 2000. RNA-directed DNA methylation. *Plant Molecular Biology* 43: 203-220.
63. Wassenegger M., Heimes S., Riedel L. and Sanger H. L. 1994. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576
64. 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. USA* 95: 13959-13964.
65. 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.
66. Wolfe A. P. and Matzke M. A. Epigenetics: Regulation through repression. *Science* 286: 481-486.
67. Xie Z., Johansen L. K., Gustafson A. M., Kasschau K. D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S. E. and Carrington J. C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA Pathways in plants. *PLOS Biology* 2: 642-652
68. Zilberman D., Cao X. and Jacobsen S. E. 2003. Argonaute 4 control of locus-specific siRNAs accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299: 716-719.

