

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης
Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών

Τίτλος:

**«Αλληλεπίδραση του ιοειδούς *Potato spindle tuber viroid* με πρωτεΐνες
της ντοματας (*Solanum lycopersicum*)»**

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης: Τσαγρή Ευθυμία
Κοκκινίδης Μιχαήλ
Καραγωγέως Δόμνα

UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF APPLIED AND TECHNOLOGICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY



**Master Thesis for the postgraduate program of
Plant Molecular Biology and Biotechnology**

Title:

**“Interactions of the viroid *Potato spindle tuber viroid* with tomato
(*Solanum lycopersicum*) proteins”**

**Evaluation committee: Tsagris Efthimia
Kikkinidis Mihail
Karagogeos Domna**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη.....	3
2. Εισαγωγή.....	5
I. Το ιοειδές PSTVd	5
A. Τι είναι τα ιοειδή.....	5
B. Οικογένειες ιοειδών.....	5
Γ. Ο κύκλος ζωής των ιοειδών.....	7
Δ. Αλληλεπιδράσεις ιοειδών- ξενιστών.....	8
E. RNA σίγηση και ιοειδή	8
ΣΤ. Προοπτικές και ερωτήματα.....	11
II. Η πρωτεΐνη της τομάτας Virp2	12
A. Η αρχική μελέτη- η πρωτεΐνη της τομάτας Virp1	12
B. Η πρωτεΐνη Virp2	12
Γ. Ο ρόλος του GABA	14
III. Ο σκοπός της εργασίας	15
3. Μέθοδοι και Υλικά	16
A. Πειραματικές διαδικασίες	16
B. Βακτηριακά στελέχη	35
Γ. Φυτικά δείγματα	36
Δ. Πλασμιδιακές κατασκευές	36
E. Εργαστηριακός εξοπλισμός	43
4. Αποτελέσματα	44
A. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης της τομάτας Virp2 σε RNA.....	44
B. Ηλεκτροφορητική ανάλυση εκχυλισμάτων φυτικού ιστού σε πηκτές αγαρόζης και ακρυλαμίδης.....	71
5. Συμπεράσματα- Συζήτηση.....	80
6. Βιβλιογραφία	88
7. Παράρτημα.....	96

1. Περίληψη

Τα ιοειδή είναι μικρά, μονόκλωνα, κυκλικά, μόρια RNA, που αν και δεν κωδικεύουν πρωτεΐνες, αποτελούν οικονομικά σημαντικά παθογόνα για μια σειρά φυτών-ξενιστών. Το *Potato spindle tuber viroid* ήταν το πρώτο ιοειδές που ανακαλύφθηκε και παραμένει μοντέλο για την μελέτη των ιοειδών.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας, εξετάζεται η δυνατότητα αλληλεπίδρασης αλληλεπίδραση της Virp2, μίας πρωτεΐνης της τομάτας, με το PSTVd. Στα πειράματα που διεξήχθησαν φάνηκε με *in vitro* αναλύσεις ότι η Virp2 προσδένει ασθενώς και μη ειδικά το PSTVd, καθώς και άλλους στόχους RNA και DNA.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος που στην ουσία είναι συνδυασμός μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε αгарόζη και αποδιατακτικής SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση νουκλεοπρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φυτά τόσο μολυσμένα με PSTVd όσο και υγιή. Η πρωτότυπη αυτή μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων του εκχυλίσματος, καθώς και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών τόσο σύμφωνα με το φορτίο τους, όσο και με το βάρος τους.

Λέξεις-κλειδιά: Ιοειδή, PSTVd, αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος, EMSA, dot blot, μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, SDS-PAGE

Summary

Viroids are small, single-stranded circular RNA molecules not known to code for any proteins. They are pathogens for a series of plant hosts. *Potato spindle tuber viroid* was the first viroid to be discovered and remains a model for the study of viroids. In previous work, a plant protein was isolated during a cDNA screen, using PSTVd RNA as a ligand. This protein, provisionally called Virp2, is further investigated in this thesis. We used electrophoretic mobility shift assays (EMSA), Northwestern blotting assays and dot blots in order to investigate the binding of the tomato protein Virp2 with PSTVd RNA transcripts in vitro.

In the in vitro assays that were performed, affinity chromatography purified Virp2 was shown to bind weakly and unspecifically to PSTVd of both polarities, as well as to other DNA and RNA nucleic acids in a dot blot assay test. No interaction could be observed in EMSA or denaturing Northwestern assays.

In the second part of this thesis a method was developed that is essentially a combination of native agarose electrophoresis and denaturing SDS-PAGE electrophoresis of crude plant nucleoprotein extracts. Comparison of non infected and infected nucleoprotein extracts by this method showed some differences in the viroid containing fractions, which can be further investigated. This novel, technically simple method allows the resolution of the nucleic acids of the extract, as well as the separation of proteins both according to their charge and their molecular weight and may therefore be used for the identification of RNA binding proteins in such extracts.

Keywords: Viroids, PSTVd, protein-nucleic acid interaction, EMSA, dot blot, native agarose electrophoresis, SDS-PAGE

2. Εισαγωγή

I. Το ιοειδές PSTVd

A. Τι είναι τα ιοειδή

Τα ιοειδή είναι οι μικρότερες γνωστές υποϊικές μονάδες. Δεν έχουν δικό τους μεταβολισμό, ούτε καν πρωτεϊνό περίβλημα (καψίδιο). Πρόκειται για μικρά, μονόκλωνα, κυκλικά μόρια RNA που δεν κωδικεύουν για καμία πρωτεΐνη. Το μόριο RNA από το οποίο αποτελούνται έχει μικρό μέγεθος, είναι κυκλικό και ανάλογα με το είδος ποικίλλει από 250 έως 400 περίπου νουκλεοτίδια (Flores, 2005). Πολλαπλασιάζονται παρασιτώντας στον μεταγραφικό μηχανισμό φυτικών κυττάρων. Έχοντας, κατά κανόνα, ένα σχετικά στενό εύρος ξενιστών, η μόλυνση με ιοειδές μπορεί να προκαλέσει σοβαρά, ή και καθόλου συμπτώματα, ανάλογα με την ποικιλία του ξενιστή, το στέλεχος του ιοειδούς και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

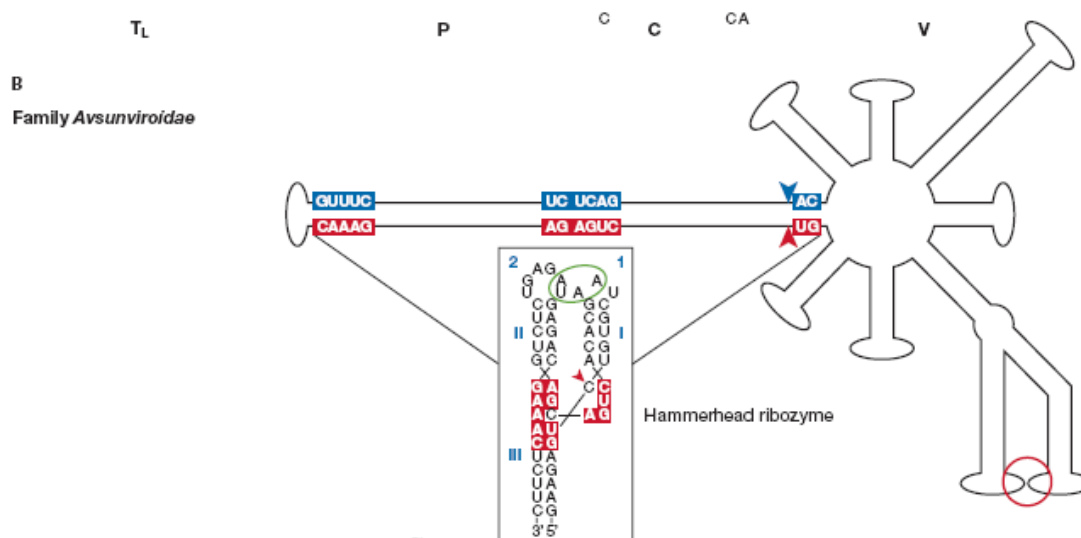
Πρέπει να διευκρινιστεί, ότι παρά το ίσως παραπλανητικό τους όνομα, τα ιοειδή δεν έχουν απαραίτητα κάποια εξελικτική σχέση με τους ιούς (Daros et al. 2006). Οι ιοί, αν και είναι και αυτοί υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και, όπως και τα ιοειδή έχουν κατά κανόνα αρκετά στενό εύρος ξενιστών, εκμεταλλεύονται τον μεταφραστικό μηχανισμό των ξενιστών τους. Μία ενδιαφέρουσα περίπτωση ιικού παθογόνου εκτός του βασιλείου των φυτών που μοιάζει με τα ιοειδή είναι ο ιός της ηπατίτιδας Δ (Hepatitis delta virus, HDV), ο οποίος δρα ως δορυφόρος του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) (Taylor et al. 2006). Έχει μονόκλωνο RNA με μήκος περίπου 1700 νουκλεοτίδια, το οποίο παίρνει ραβδόμορφη διαμόρφωση λόγω του ζευγαρώματος μεταξύ των βάσεων του. Για να αναπαραχθεί επιτυχώς, έχει ανάγκη να μολύνει κύτταρα ήδη μολυσμένα με HBV. Καθώς ο HDV δεν κωδικεύει καψιδιακές πρωτεΐνες στο RNA του, αλλά μόνο δύο άλλες πρωτεΐνες που έχουν σχέση με τον πολλαπλασιασμό του, έχει ανάγκη από τις καψιδιακές πρωτεΐνες του HBV, για να παράγει ολοκληρωμένα ιικά σωματίδια και να μετακινηθεί στα επόμενα κύτταρα.

B. Οικογένειες ιοειδών

Τα περίπου τριάντα μέχρι σήμερα γνωστά ιοειδή χωρίζονται σε δύο οικογένειες: τα *Pospiviroidae* και τα *Avsunviroidae* (Flores 2005, Daros et al. 2006) με βάση τα δομικά στοιχεία του μορίου RNA από το οποίο αποτελούνται, αλλά και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της αναπαραγωγής τους.

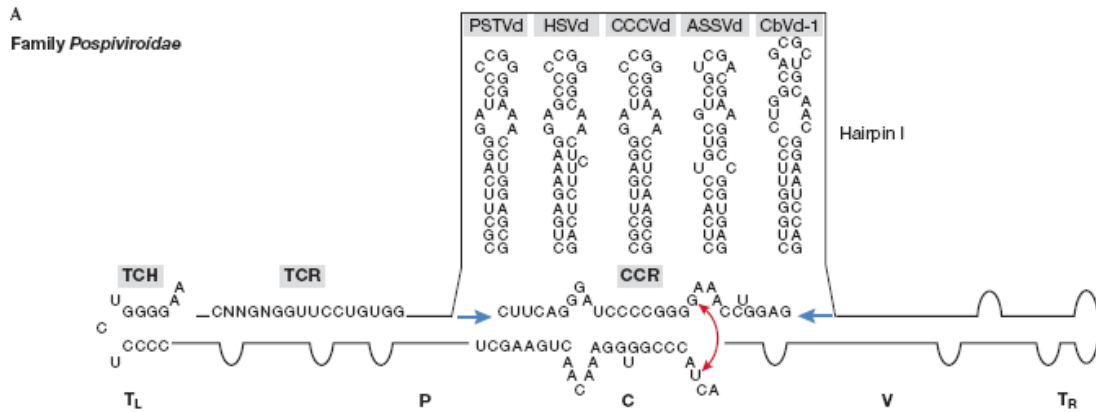
Τα *Avsunviroidae*, με πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε και τυπικό παράδειγμα το *Avocado sun blotch viroid* (ASBVd), έχουν περίπλοκη

δευτεροταγή δομή, ενώ έχουν και μια περιοχή ριβοενζύμου τύπου «σφυριού» (“hammerhead”) η οποία, ακόμα και απουσία πρωτεϊνών, μπορεί να κόψει το RNA, βοηθώντας έτσι στην ορθή διαμόρφωση των μεταγράφων που προκύπτουν από αντιγραφή με τον μηχανισμό του συμμετρικού κυλιόμενου κύκλου, που λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες. (Daros et al. 2006).



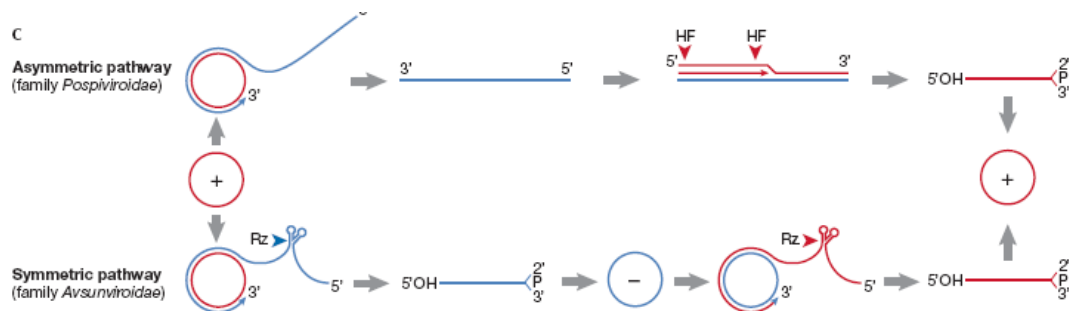
Εικόνα 1 Διάγραμμα της δομής του ASBVd. (Daros et al, 2006) Στα αριστερά, σημειωμένη, είναι η περιοχή του ριβοενζύμου.

Το πρώτο ιοειδές που ανακαλύφθηκε (Diener, 1971) ήταν το *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), το ιοειδές των ατρακτοειδών κονδύλων της πατάτας. Είναι το πλέον χαρακτηριστικό μέλος της οικογένειας των *Psorivirioidea* και χρησιμοποιείται εκτεταμένα ως μοντέλο για τα ιοειδή γενικότερα. Τα *Psorivirioidea* έχουν ραβδοειδή δευτεροταγή δομή, με περιοχές τόσο μονόκλωνες όσο και δίκλωνες. Εδώ και δεκαετίες είχαν προταθεί συγκεκριμένες περιοχές στο γονιδίωμα- (αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτός ο όρος)- του PSTVd, ενώ κάποιες από αυτές είχαν συνδεθεί και με συγκεκριμένη λειτουργία (Keese & Symons, 1985). Έτσι, έχουν αναγνωριστεί η περιοχή της παθογένειας (P), που, όπως φανερώνει η ονομασία της, παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση συμπτωμάτων, η μεταβλητή περιοχή (V), η κεντρική περιοχή (C) και ο κεντρικός συντηρημένος πυρήνας (CCR) που είναι σημαντικός για τον ορθό διαχωρισμό των αντιγράφων του PSTVd που προκύπτουν από την αντιγραφή με τον μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου, και οι περιοχές στο αριστερό και δεξί άκρο (TL) και (TR) αντίστοιχα.



Εικόνα 2 Διάγραμμα του PSTVd (Daros et al. 2006). Διακρίνονται οι συγκεκριμένες περιοχές του ιοειδούς

Το PSTVd, όπως και τα υπόλοιπα μέλη των *Pospiviroidae*, πολλαπλασιάζεται στον πυρήνα, με τον μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου. Τα αντίγραφα του χωρίζονται με την βοήθεια πρωτεϊνών του ξενιστή.



Εικόνα 3 Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών πολλαπλασιασμού των *Pospiviroidae* *Avsunviroidae* (Daro et al. 2006) HF είναι πρωτεϊνικοί παράγοντες του ξενιστή και Rz το ριβοένζυμο των ιοειδών

Γ. Ο κύκλος ζωής των ιοειδών

Ο κύκλος ζωής των ιοειδών προκαλεί ενδιαφέρον, καθώς ξεκινά με την μόλυνση ενός κυττάρου και ενδέχεται να εξελιχθεί σε συστηματική μόλυνση. Όπως είναι λογικό, όλα ξεκινούν από την είσοδο του ιοειδούς σε ένα κύτταρο. Για να γίνει αυτό, θα πρέπει να περάσει το κυτταρικό τοίχωμα, εκμεταλλευόμενο κάποιο τραυματισμό, πιθανόν μάλιστα μεταφερόμενο και από έντομα, αν και μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί έντομα που να αποτελούν αποτελεσματικούς φορείς. Στην συνέχεια, πρέπει να εισέλθει στο κατάλληλο οργανίδιο- πυρήνα ή χλωροπλάστες για *Pospiviroidae* και *Avsunviroidae* αντίστοιχα- και εκεί να αντιγραφεί, με την βοήθεια

του μεταγραφικού μηχανισμού του ξενιστή. Τα πολυάριθμα αντίγραφα του εν συνεχεία εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα και από εκεί, μέσω των πλασμοδεσμάτων, προσβάλλουν γειτονικά κύτταρα. Εάν η μόλυνση δεν περιοριστεί, μπορεί στην συνέχεια να επεκταθεί στο φλοιώμα του φυτού και από εκεί να επεκταθεί προς ιστούς-αποδέκτες μεταβολιτών (sink tissues), κυρίως προς τις ρίζες και τα νεαρά, υψηλότερα φύλλα (Tsagris & Tabler 2004).

Δ. Αλληλεπιδράσεις ιοειδών-ξενιστών

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι τα ιοειδή έχουν ανάγκη τις πρωτεΐνες του ξενιστή σε παραπάνω από ένα στάδια του κύκλου τους. Ο πολλαπλασιασμός τους εξαρτάται αποκλειστικά από τις πολυμεράσες που βρίσκονται στα οργανίδια τα οποία προσβάλλουν. Το PSTVd έχει δείχθει ότι μπορεί και πολλαπλασιάζεται με την βοήθεια της DNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης 2 (Tsagris & Tabler 2004), ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ιοειδή που πολλαπλασιάζονται στους χλωροπλάστες χρησιμοποιούν άλλες DNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (Navarro, 2000). Επίσης, τα *Pospiviroidae*, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, εξαρτώνται από πρωτεϊνικούς παράγοντες του ξενιστή για το μάτισμα των αντιγράφων τους που προκύπτουν από τον μηχανισμό του ασύμμετρου κυλιόμενου κύκλου. Πρωτεϊνικοί παράγοντες πρέπει να είναι και εκείνοι που αλληλεπιδρούν με ιοειδή, επιτρέποντάς τους να εισέλθουν στα κυτταρικά οργανίδια που θα πολλαπλασιαστούν, ενώ μόλις πρόσφατα άρχισε να εξηγείται πως μετακινούνται μέσω των πλασμοδεσμάτων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, καθώς και μέσω του φλοιώματος (Takeda et al. 2011, Harries & Ding. 2011).

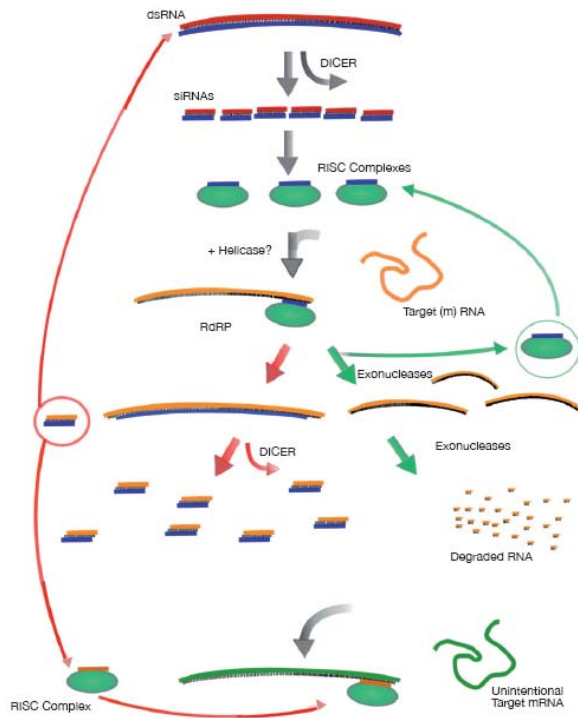
Τα συμπτώματα που προκαλούν τα ιοειδή εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, από από τον συγκεκριμένο γεότυπο του ιοειδούς, μέχρι τον ξενιστή και το περιβάλλον. Συνηθισμένα συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν την μειωμένη ανάπτυξη (μείωση του υψους και των μεσογονάτιων αποστάσεων), προβληματική ανάπτυξη ή χλώρωση ή και νέκρωση στα φύλλα, μειωμένη ανάπτυξη των ριζών, αλλοιώσεις στην δομή των κυττάρων, ακόμα και των καρπών (Singh et al, 2003, Gomez et al. 2009).

Ε. RNA σίγηση και ιοειδή

Τα φυτά δεν έχουν συμβατικό ανοσοποιητικό σύστημα, βασισμένο σε πρωτεΐνες, όπως τα ζώα. Αν' αυτού, χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της RNA σίγησης, που βασίζεται στην αναγνώριση αλληλουχιών στόχων και μπορεί να προσφέρει ακόμα και συστημική ανοσία απέναντι σε παθογόνα. (Llave, 2010)

Όλα τα μονοπάτια της RNA σίγησης έχουν κάποια κοινά στοιχεία. Πρώτον, η απόκριση αυτή επάγεται από την παρουσία δίκλωνου RNA. Δεύτερον, ένα ένζυμο της οικογένειας Dicer κόβει το δίκλωνο RNA δίνοντας κομμάτια 21-25 νουκλεοτιδίων. Τρίτον, αυτά τα μικρά κομμάτια μεθυλιώνονται ώστε να προστατευτούν από την αποδόμηση και ακολούθως, φορτώνονται σε ενεργά σύμπλοκα, στα οποία δρουν ως μηχανισμός αναγνώρισης στόχου, δηλαδή, το σύμπλοκο αυτό θα στοχεύει και θα αποδομεί αλληλουχίες RNA συμπληρωματικές προς αυτήν που έχει το sRNA που φέρει. Στην καρδιά τέτοιων συμπλόκων (RISC-RNA Induced Silencing Complex) βρίσκεται μια πρωτεΐνη AGO, η οποία φέρει μία επικράτεια PAZ η οποία προσδένει τα sRNA και μία επικράτεια PIWI, η οποία έχει ενεργότητα νουκλεάσης και κόβει το RNA-στόχο (Ruiz-Ferrer & Voinnet 2009).

Ένας κεντρικός διαχωρισμός της RNA σίγησης, η οποία διαχωρίζεται σε PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) και TGS (transcriptional gene silencing) και εφαρμογές αυτών (RNAi) {Kalantidis, 2008} {Huisinga, 2009} είναι αν η προέλευση της αλληλουχίας-στόχου είναι ενδογενής ή όχι. (Ruiz-Ferrer & Voinnet 2009). Όπως είναι λογικό, στην άμυνα κατά των διαφόρων παθογόνων, παίζουν ρόλο κυρίως τα siRNA που προέρχονται από ίδιο το γενομα των παθογόνων. Το θέμα της RNA σίγησης είναι εξαιρετικά περίπλοκο και εν πολλοίς, αρκετά σημεία του παραμένουν αδιευκρίνιστα, ιδιαίτερα αυτά που διαφέρουν από οργανισμό σε οργανισμό. Ένα σημαντικό σημείο το οποίο θα ήταν σκόπιμο να τονιστεί για τους σκοπούς αυτής της εργασίας, είναι ότι κομβικό ρόλο σε μονοπάτια σίγησης στα φυτά έχουν RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες, όπως η RDR6 {Wassenegger, 2006 #24} και οι DCLs {Ruiz-Ferrer, 2009 #20} (Ruiz-Ferrer & Voinnet 2009).



Εικόνα 4 Σύνοψη της αποικοδόμησης RNA επαγόμενη από δίκλωνο RNA (Parisi et al, 2010)

Το γεγονός ότι η εμφάνιση συμπτωμάτων σε κάποια ιοειδή, όπως ειπώθηκε παραπάνω, εξαρτώνται από την RDR6, η και ότι ίσως ένζυμα του μονοπατιού της σίγησης συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των ιοειδών {Carbonell et al., 2007}, δίνει μία ιδέα για το πόσο πολύπλοκη είναι η σχέση ανάμεσα στα ιοειδή και την RNA σίγηση. Συνολικά, όπως και σε πολλές άλλες παρόμοιες περιπτώσεις, η φυσική επιλογή οδηγεί σε μια «κούρσα εξοπλισμών» ανάμεσα σε ξενιστές και παθογόνα, όπου κάθε οργανισμός υφίσταται εξελικτικές πιέσεις να μείνει ένα βήμα μπροστά από τον ανταγωνισμό (Ruiz-Ferrer & Voinnet 2009). Για τα ιοειδή αυτό είναι πιο περίπλοκη υπόθεση, αφού δεν έχουν κανέναν πρωτεϊνικό παράγοντα με τον οποίο θα μπορούσαν να εκτροχιάσουν τα σύστημα σίγησης του ξενιστή τους. Η εικόνα γίνεται ακόμα πιο περίπλοκη, αν αναλογιστεί κανείς ότι υπάρχουν θεωρίες που υπέδειξαν {Flores et al., 2004, Tabler & Tsagris, 2004, Parisi et al. 2011}, η απέδειξαν {Wang et al., 2004} ότι πιθανόν τα συμπτώματα των ιοειδών εν πολλοίς να προκαλούνται επειδή κομμάτια του RNA τους χρησιμοποιούνται από τον ξενιστή ως siRNA, όμως καταλήγουν να στοχεύουν και να καταστέλλουν ενδογενή γονίδια. . Κάποιες πιθανές εξηγήσεις για το πώς αποφεύγουν τα ιοειδή την καταστολή τους μέσω της RNA σίγησης είναι ότι οι απαραίτητες πρωτεΐνες δεν έχουν πρόσβαση στον πυρήνα και τους χλωροπλάστες όπου και πολλαπλασιάζονται, ή ότι η πολύπλοκη δευτεροταγής

δομή τους δεν επιτρέπει στο σύμπλοκο RISC να τα προσδέσει και να τα αναγνωρίσει {Gómez & Pallas , 2007}.

ΣΤ. Προοπτικές και ερωτήματα

Τα ιοειδή προξενούν ερευνητικό ενδιαφέρον όχι μόνο επειδή προκαλούν οικονομικά σημαντικές ασθένειες σε καλλιέργειες, αλλά και επειδή συνδυάζουν πολλές διαφορετικές ιδιότητες που τα καθιστούν ενδιαφέροντα μοντέλα. Η ιδιότητά τους, για παράδειγμα, να μετακινούνται μέσω των πλασμοδεσμάτων και του φλοιώματος τα καθιστά χρήσιμα εργαλεία στην διακυτταρική επικοινωνία (Wang & Ding, 2010). Επιπλέον, οι δευτεροταγείς δομές τους είναι ένα παράθυρο κατανόησης της σχέσης αλληλουχίας-δομής-λειτουργίας του RNA, ενώ η ικανότητά τους να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων του ξενιστή, τα καθιστά εργαλεία και για την μελέτη της RNA σίγησης.

Κομβικά ερωτήματα σε σχέση με τα ιοειδή, από τα πιο απλά, όπως, πως είναι δυνατόν, όταν το RNA θεωρείται εξαιρετικά ευπαθές μόριο, και εργαστηριακά εγχειρίδια (πχ. Russel & Sambrook 2001) αφιερώνουν ολόκληρα κεφάλαια στο «πώς να κερδηθεί η μάχη με τις RNases», τα ιοειδή, που είναι γυμνό RNA να επιβιώνουν και να διαδίδονται, μέχρι και τα πιο περίπλοκα, όπως, αν τα ιοειδή είναι πράγματι ένα απομεινάρι του πρωτόγονου «κόσμου του RNA», παραμένουν μέχρι σήμερα αναπάντητα. Κύρια ζητήματα που μένουν να απαντηθούν, είναι ποιες πρωτεΐνες των ξενιστών αλληλεπιδρούν με το κάθε ιοειδές και πως ακριβώς μεταφέρονται ενδοκυτταρικά αλλά και διακυτταρικά. Πως ακριβώς αποφεύγουν την RNA σίγηση και αν, πράγματι, μέσω της RNA σίγησης προκαλούν κάτι σαν αυτοάνοση απόκριση στον ξενιστή τους.

II. Η πρωτεΐνη της τομάτας Virp2

A. Η αρχική μελέτη- η πρωτεΐνη Virp1

Μελέτες με αντικείμενο την αναζήτηση πρωτεϊνών του ξενιστή που αλληλεπιδρούν με το PSTVd έδωσαν ως αποτέλεσμα τον χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης Virp1 της τομάτας (Martinez de Alba et al. 2003), η οποία είναι μία πρωτεΐνη που περιέχει μια επικράτεια bromodomain και πειράματα έδειξαν ότι αλληλεπιδρά τόσο in vivo όσο και in vitro με το RNA PSTVd. Αυτή η αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε με Plaque Lift Assays, ανάλυση Northwestern, με EMSA και, τέλος, με ανοσοκατακρήμνιση συμπλόκων της πρωτεΐνης με το RNA του ιοειδούς (Kalantidis et al, 2007). Ακόμα, αυτή η πρόσδεση φάνηκε να είναι ειδική, καθώς η Virp1 δεν έδειξε να προσδένει άλλα RNA εκτός των ιοειδών της οικογένειας των *Pospiviroidae* που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (Martinez de Alba et al., 2003).

Επιπλέον πειράματα (Gozmanova et al, 2003, 2005) προσδιόρισαν με ακρίβεια την περιοχή στην οποία προσδένεται η Virp1, δύο βρόγχους με αλληλουχία 5'-ACAGG και CUCUCC-5', που ονομάστηκαν μοτίβο RY. Το μοτίβο RY που βρίσκεται κοντά στην δεξιά τεματική περιοχή του ιοειδούς έδειξε ισχυρότερη συγγένεια για την Virp1 σε σχέση με ένα άλλο μοτίβο RY που εντοπίζεται κεντρικά (Gozmanova et al. 2003). Η σημασία αυτών των περιοχών, καθώς και της αλληλεπίδρασης του PSTVd με την Virp1 για την μολυσματικότητα του ιοειδούς επιβεβαιώθηκε και με πειράματα μεταλλαξιγένεσης, όπου στελέχη του PSTVd με μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία στα δύο μοτίβα RY δεν ήταν μολυσματικά (Gozmanova et al, 2003).

B. Η πρωτεΐνη Virp2

Στα πλαίσια της ίδιας διδακτορικής διατριβής, (Martinez de Alba 2003) και με την ίδια μέθοδο σαρώματος φαγικής cDNA βιβλιοθήκης, εντοπίστηκε κι ένας δευτερος κλώνος που έδειχνε in vitro αλληλεπίδραση με το ιοειδές.

Αυτός ο κλώνος ονομάστηκε Virp2 (viroid-binding-protein 2, EMBL-Bank: AJ420798.1). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που κωδικεύεται από ένα γονίδιο μεγαλύτερο των 1344 νουκλεοτιδίων και απαρτίζεται από τουλάχιστον 448 αμινοξέα (Martinez de Alba, PhD thesis), με βάρος 50.494,1 Dalton (Acc No AF247819 (November 2003), AY240230 (April 2005), NP_001234340.1 (October 2011). (πλήρης αλληλουχία στο παράρτημα). Η έλλειψη κωδικωνίου έναρξης στην αρχή του

κλωνοποιημένου γονιδίου οδήγησε αρχικά σε συμπέρασμα ότι ίσως αυτός ο κλώνος να μην ήταν ολόκληρος ωστόσο εάν η εναρξη της μεταφρασης γίνεται από την πρωτη μεθιονίνη αυτής της αλληλουχίας, στο φυτο θα παραχθει μια πρωτείνη με μεγεθος 49.270kD. In silico αναλύσεις έδειξαν πιθανή ύπαρξη περιοχών φωσφορυλίωσης, θέσεις γλυκοζυλίωσης και μυριστιλίωσης, καθώς και μία δομική περιοχή αμινοτρανσφεράσης. Βρέθηκε 92% ομοιότητα με μια αμινοτρανσφεράση του *Capsicum chinense*, ενός είδος πιπεριάς, καθώς και με αρκετά EST's στην βάση δεδομένων του EMBL, τα περισσότερα από τα οποία προέρχονταν επίσης από αμινοτρανσφεράσες. Η πρωτείνη ανήκει στην υπεροικογένεια των αμινοτρανσφερασών του ασπαρτικού οξέως (fold I) που εξαρτώνται από πυριδοξαλ-φωσφορικό οξύ, (pyridoxal phosphate (PLP)-dependent aspartate aminotransferase superfamily (fold I) στην οποία ανηκουν μια σειρά από αμινοτρανσφεράσες όπως, αμινοτρανσφεράση της ακετυλο-ορνιθίνης, αμινοτρανσφεραση της β-αλανινης-πυροσταφυλικου κλπ. Όλα αυτά τα ένζυμα είναι αμινοτρανσφερασες που δρουν σε βασικά αμινοξέα και τα παραγωγάτους και ενεργουν σαν τρανσαμινάσες ή αποκαρβοξυλάσες. .

Στην ίδια μελέτη φάνηκε μετά από ανάλυση Northwestern ότι η παρουσία της *Virp2* ίσως εστιάζεται στα φύλλα της τομάτας, και μάλιστα ότι η έκφραση του γονιδίου της μειώνεται σε φυτά μολυσμένα με PSTVd σε σχέση με υγιή φυτά. Ανάλυση με Northwestern και με Plaque Lift Assay, μέθοδο η οποία κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται για το σάρωμα φαγικών βιβλιοθηκών, έδειξαν ότι η *Virp2* προσέδενε το RNA PSTVd, καθώς και άλλους ανιχνευτές, όπως τα HSVd, CEVd, ASSVd, GYSVd αλλά και τα LSTV. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι υπήρχε σήμα και στα δείγματα χωρίς επαγωγή στις αναλύσεις κατά Northwestern σε βακτήρια που υπερπαράγουν την πρωτείνη, πράγμα το οποίο θεωρήθηκε φυσιολογικό, καθώς ο υποκινητής της T7 RNA πολυμεράσης, υπό τον έλεγχο του οποίου βρισκόταν το γονίδιο δεν είναι υπό αυστηρή ρύθμιση στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν.

Περαιτέρω αναλύσεις έγιναν (Karantemiris, Master thesis, 2005), οι οποίες για αρχή έδειξαν ότι πιθανότατα υπάρχουν τουλάχιστον τρεις γενετικοί τόποι (τρία ισοένζυμα) της *Virp2* στο γονιδίωμα της τομάτας. Στην ίδια μελέτη δημιουργήθηκε και η πλασμιδιακή κατασκευή για την υπερέκφραση της *Virp2* η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

Άλλες in silico αναλύσεις έδειξαν ότι η *Virp2* έχει υψηλή ομολογία με αμινοτρανσφεράσες του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), κυρίως με τρία

πρόδρομα ισοένζυμα της τομάτας, (Unigene SGN-U570910, SGN-U570902, SGN-U570903) (Karantemiris, Master thesis, 2005) .

Γ. Ο ρόλος του GABA

Το GABA είναι ένας αρκετά ενδιαφέρον δευτερογενής μεταβολίτης. Όπως φαίνεται από την πλήρη επιστημονική του ονομασία, πρόκειται για ένα αμινοξύ, αν και δεν χρησιμοποιείται στην πρωτεϊνοσύνθεση. Στα σπονδυλωτά έχει επικρατήσει εξελικτικά στον ρόλο του ως «φρένο του εγκεφάλου», καθώς έχει ανασταλτική δράση στα Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Το GABA προσδένεται σε υποδοχείς τόσο προσυναπτικά όσο και μετασυναπτικά, και οδηγεί στην υπερπόλωση ή την επαναπόλωση της μεμβράνης του νευρώνα (Kandell et al, Βασικές αρχές νευροβιολογίας, 2003). Ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι ψυχότροπες ουσίες, όπως το αλκοόλ, αλλά και φάρμακα που στοχεύουν στην καταπολέμηση του άγχους, δρουν προσδένοντας στους υποδοχείς του GABA στον εγκέφαλο.

Ο ρόλος του GABA στα φυτά είναι αρκετά διαφορετικός. Παράγεται με την αποκαρβοξυλίωση του L-γλουταμικού (Bown & Shelp, 1997), και αν και αρχικά θεωρούταν ότι απλά έπαιζε κάποιο ρόλο σαν αποθήκη αζώτου, πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο του pH καθώς η παραγωγή GABA καταναλώνει H⁺ (Tsushida & Murray 1987), τον έλεγχο του κύκλου του Krebs (Melo-Oliveira et al. 1996), σε αποκρίσεις σε ακραίες θερμοκρασίες, τόσο ψυχρές, όσο και θερμές (Wallace 1984, Mayer, 1990), όσο και σε άλλες καταπονήσεις, από την υποξία μέχρι τον τραυματισμό (Aurisano et al. 1995, Ramputh & Brown 1996), ενώ μελέτες έχουν δείξει στοιχεία ότι το GABA ενδέχεται να δρα και ως παράγοντας άμυνας απέναντι σε φυτοφάγα, μειώνοντας την ανάπτυξη των προνυμφών (Ramputh & Bown, 1996). Ακόμα, έχει φανεί ότι παίζει ρόλο στην απόκριση σε φυτοορμόνες (Ford et al 1996) και κατ' επέκταση την ανάπτυξη των φυτών, ενώ μελέτες δείχνουν ότι ένα κλεινές αυξανόμενης συγκέντρωσης του GABA παίζει ρόλο στην καθοδήγηση του γυρεοσωλήνα για την ολοκλήρωση της διπλής γονιμοποίησης. (Ma, 2003) (Ma, 2003). Επιπλέον ενδιαφέρον για την προκειμένη μελέτη έχει το γεγονός ότι μια τρανσαμινάση του GABA, η POP2 έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την σωστή ρύθμιση αυτής της κλεινούς συγκέντρωσης στην *Arabidopsis thaliana*, και ότι μεταλλάγματα του POP2 είναι στείρα (Palanivelu et al., 2003) (Palanivelu et al. 2003).

Έχει παρατηρηθεί επιδραση της μόλυνσης με ιοειδες στον αριθμο και βάρος των καρπων στις μολυσμένες ντοματες. Η αλληλεπιδραση του με την πρωτεινη

Virp2, θα ήταν ένα πιθανό μονοπάτι που οδηγεί στα συγκεκριμένα συμπτώματα, εάν η αλληλεπίδραση του με την GABA τρανσαμιναση επηρεάζει αρνητικά την γονιμοποίηση

III. Ο σκοπός της εργασίας

Πρώτος στόχος της εργασίας αυτής ήταν η επιβεβαίωση των ευρημάτων της αρχικής μελέτης (Martinez de Alba, 2003) και η απόδειξη της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Virp2 με το ιοειδές PSTVd. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες in vitro μέθοδοι, όπως η EMSA, η ανάλυση με Northwestern και τα dot blot.

Εφ' όσον επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το ιοειδές, θα ήταν δυνατόν να ξεκινήσει η μελέτη των ακριβών συνθηκών που την επιτρέπουν, η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης, οι δομικές περιοχές που συμμετέχουν και από την πλευρά της πρωτεΐνης, και από την πλευρά του RNA. Τέτοια πειράματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιούν διαφορετικές συγκεντρώσεις αλάτων στα ρυθμιστικά διαλύματα ή διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης των δειγμάτων. Μία άλλη προσέγγιση θα ήταν να αναζητηθεί ακριβώς ποια περιοχή της πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με ποια περιοχή του ιοειδούς, είτε με την χρήση μεταλλαγμάτων, είτε, πιο απλά, κόβοντας με περιοριστικές ενδονουκλεάσες τα επιθυμητά γονίδια στα κατάλληλα σημεία και εκφράζοντας τα ακολούθως με την βοήθεια ενός πλασμιδιακού φορέα. Στόχος της εργασίας είναι να διευκρινιστεί αν η πρωτεΐνη προσδένει το ιοειδές εξειδικευμένα, και υπό ποιες συνθήκες, ή, όπως είχε υποδειχθεί από τα προηγούμενα πειράματα, γενικότερα προσδένει νουκλεϊκά οξέα.

Στο δεύτερο σκέλος των πειραμάτων, ήταν να εντοπιστούν και άλλα συμπλοκα ιοειδούς και πρωτεϊνών, με βιοχημικές μεθόδους, από τα συμπλοκα που μπορεί να υπάρχουν στα μολυσμένα φυτά. Εναλλακτικά των μεθόδων που έχουν ήδη δημοσιευτεί, (Tsagris, 2008), προτάθηκε να χρησιμοποιηθεί ένας συνδυασμός μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης και σε δεύτερο στάδιο, ανάλυσης των συμπλόκων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, και να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα των συνδυασμένων μεθόδων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν. Θα αξιολογηθεί η σταθερότητα, η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και θα κριθεί αν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να απαντήσουν στα προκείμενα ερωτήματα.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Τα πρωτόκολλα προέρχονται από το βιβλίο “Molecular cloning” των Russel & Sambrook, εκτός από αυτά που υπάρχει σχετική διευκρίνιση. Στις αντιδράσεις που χρησιμοποιούνταν κάποιο ένζυμο, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του εκάστοτε προμηθευτή.

A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

1. Alkaline lysis Miniprep

Πειραματική διαδικασία:

Υπό ασηπτικές συνθήκες- είτε υπό την φλόγα λυχνίας μπόουνσεν είτε σε απαγωγό μεταφέρεται 1,5ml από υγρή καλλιέργεια σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην μέγιστη δυνατή ταχύτητα (12.000rpm) για 2'. Κατόπιν, το υπερκείμενο αδειάζεται και προστίθενται άλλα 1,5ml καλλιέργεια και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Είναι σημαντικό το ίζημα να είναι καθαρό από κάθε ίχνος θρεπτικού μέσου, καθώς αυτό θα μπορούσε να δράσει ανασταλτικά στα επόμενα βήματα της διαδικασίας. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 100μl από το alkaline lysis solution 1 (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0) και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Ακολουθώντας, άλλα 200μl από το alkaline lysis solution 2 (0,2N NaOH, 1% w/v SDS, παρασκευάζεται επί τόπου,) και ο δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται ήπια και επώαζεται σε πάγο για 2'. Προστίθενται 150μl alkaline lysis solution 3 (για 100 ml: 60 ml από 5M οξικό κάλιο, 11,5 ml οξικό οξύ (απόλυτο), τελική συγκέντρωση: 3M οξικό κάλιο, 5M ιξικό οξύ) και μετά από ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5' ακολουθεί φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 15'. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται ίσως όγκος φαινόλης. Μετά από ανάδευση, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 1' και η υδατική φάση μεταφέρεται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και ακολουθεί η ίδια διαδικασία. Τέλος, στην υδατική φάση που έχει μεταφερθεί σε καθαρό erpendorf προστίθεται 1ml καθαρής αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15' στην μέγιστη ταχύτητα. Στο τέλος της, το DNA

φαίνεται ως αχνό λευκό ίζημα στο πάτο του δοκιμαστικού σωλήνα. Με προσοχή απομακρύνεται το υπερκείμενο, και το ίζημα ξεπλένεται με 1ml αιθανόλη 70% και φυγοκεντρείται για 5'. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει, πριν διαλυθεί σε 50μl ddH₂O ή TE.

2. Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την New England Biolabs. Για τις διαγνωστικές πέψεις χρησιμοποιούνταν 0,5-3μg DNA και 5-10u ενζύμου. Η επώαση ήταν 90'. Για τις προπαρασκευαστικές πέψεις χρησιμοποιούνταν 10μg DNA και 20u ενζύμου και επωάζονταν για τρεις ώρες. Σε όλες τις αντιδράσεις προστέθηκαν και 2u RNase I. Αν για την πέψη χρησιμοποιούνται δύο ένζυμα και μπορούν να κόψουν στις ίδιες συνθήκες, ακολουθείται η διαδικασία ακριβώς όπως αναφέρθηκε. Αν απαιτούν διαφορετική θερμοκρασία, η αντίδραση επωάζεται πρώτα στην χαμηλότερη από τις δύο. Αν τα ένζυμα απαιτούν διαφορετικά ρυθμιστικά, τότε πρώτα γίνεται πέψη με το ένζυμο που χρησιμοποιεί μικρότερες συγκεντρώσεις αλάτων στο ρυθμιστικό του, ακολούθως του DNA κατακρημνίζεται με έναν όγκο καθαρής αιθανόλη και 1/10 όγκου οξικό νάτριο. Αφήνεται να επωαστεί για 1 έως 2 ώρες στους -20C και ακολούθως φυγοκεντρείται για 30' στις 12.000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με προσοχή και το ίζημα είναι έτοιμο για την πέψη με το δεύτερο ένζυμο. Αναλυτικά, τα ρυθμιστικά διαλύματα της NEB περιέχουν:

NEB 1: 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH7.0 στους 25C

NEB 2: 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT, pH 7.9 στους 25C

NEB 3: 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100NaCl, 1mM DTT pH 7.9 στους 25C

NEB 4: 20mM Tris- οξικό, 10mM οξικό μαγνήσιο, 50mM οξικό κάλιο, 1mM DTT pH 7.9 στους 25C

Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες αντίδρασης.

Πίνακας 1 Πίνακας με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τις συνθήκες στις οποίες χρησιμοποιούνται

Ένζυμο	Αλληλουχία	Ρυθμιστικό διάλυμα	Θερμοκρασία (σε C)
BamH I	G [^] GATCC	2,3,4	37

BstX I	CCANNNNN [^] NTGG	2,3	55
Eag I	C [^] GGCCG	3	37
Ecor I	G [^] AATTC	1,2,3,4	37
Hind III	A [^] AGCTT	2	37
Kpn I	GGTAC [^] C	1	37
Not I	GC [^] GGCCGC	3	37
Pst I	CTGCA [^] G	3	37
Sac I			
(SstI)	GAGCT [^] C	1,4	37
Xba I	T [^] CTAGA	2,3,4	37
Xho I	C [^] TCGAG	2	37

3. Καθαρισμός τμήματος DNA από πηκτική αγαρόζης (Macherey-Nagel NucleoSpin®Extract II κιτ)

Πειραματική διαδικασία:

Το DNA που πρέπει να καθαριστεί ηλεκτροφορεύεται σε τζελ αγαρόζης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, με την βοήθεια υπεριώδους φωτός, κόβονται τα κομμάτια του τζελ που περιέχουν τα επιθυμητά τμήματα DNA. Αυτά στην συνέχεια ζυγίζονται και για κάθε 100μg αγαρόζης, προστίθενται 200μl NT buffer. Η αγαρόζης θερμαίνεται για λίγα λεπτά στους 50C για να λιώσει. Και ακολούθως το διάλυμα φορτώνεται στην ειδική κολώνα με το φίλτρο. Φυγοκεντρείται για 1' στα 11.000g. Το υγρό που περνάει απορρίπτεται και προστίθενται 700μl NT3 buffer. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και μετά την απόρριψη του υγρού ακολουθεί μία ακόμα, για 2'. Η κολώνα τοποθετείται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 50μl NE buffer. Επιάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1'. Εναλλακτικά, για υψηλότερη απόδοση, μπορεί στο τελευταίο βήμα αντί για NE buffer να χρησιμοποιηθεί χλιαρό αποσταγμένο νερό και ο όγκος της έκλουσης να χωριστεί στα δύο.

4. Αντίδραση λιγοποίησης

Διαδικασία:

Αρχικά, πρέπει να υπολογιστεί πόσο ένθεμα και πόσος φορέας θα χρησιμοποιηθούν. Οι όγκοι εξαρτώνται από την συγκέντρωσή τους, όμως ο συνολικός όγκος της αντίδρασης δεν πρέπει να ξεπερνά τα 20μl. Τυπικά, οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν μπορούν να υπολογιστούν με την ακόλουθη σχέση:

$$3 * \text{Φορέας (σε ng)} * \text{μέγεθος ενθέματος (σε kb)} / \text{μέγεθος φορέα (σε kb)} = 50\text{ng ενθέμα}$$

Ο παράγοντας στην αρχή μπορεί να αλλάξει από 1 έως και 5 ή 10, ανάλογα με τις ανάγκες. Η αντίδραση επώαζεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ή ανάλογα με τις οδηγίες που παρασκευαστή της λιγάσης. Το προϊόν της αντίδρασης χρησιμοποιείται ακολούθως για μετασχηματισμό κυττάρων.

5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμάζεται το ειδικό δοχείο για το τζελ. Μονώνεται με ταινία και τοποθετούνται τα ειδικά χτενάκια. Ανάλογα με την χωρητικότητά του, αραιώνεται TBE (για 2lt 5 x TBE: 108g Tris, 55g βορικό οξύ, 40ml EDTA0,5M pH 8) σε συγκέντρωση 0,5X. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αгарόζης (Seakem® LE Agarose Lonza No. 50004) (από 0,8% μέχρι και 1,5%, ανάλογα με τις ανάγκες) και μετά το διάλυμα TBE και αгарόζης θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αгарόζη να διαλυθεί εντελώς. Το διάλυμα ψύχεται λίγο κάτω από τρεχούμενο νερό και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία 1:10.000. Το διάλυμα εγχέεται στο ειδικό δοχείο με τα χτενάκια και αφήνεται περίπου μισή ώρα μέχρι να πήξει. Κατόπιν, τα χτενάκια αφαιρούνται και τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε διάλυμα TBE 0,5X. Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί με 1:5 loading buffer (30% γλυκερόλη, 0,1% orange G) και ηλεκτροφορούνται, ανάλογα με τις ανάγκες στα 80V έως 100V από 30' μέχρι 90'. Τέλος, το τζελ μεταφέρεται σε ειδικό χώρο, όπου κάτω από υπεριώδες φως το βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει (Herolab UV T-28MP), επιτρέποντας έτσι την φωτογράφιση των δειγμάτων μέσα στο τζελ.

6. Δημιουργία κυττάρων επιδεικτικών για μετασχηματισμό

Πειραματική διαδικασία:

Εμβολιάζεται καλλιέργεια 1ml LB με κύτταρα του κατάλληλου τύπου και αφήνεται να αναπτυχθεί στους 37C για 12-18 ώρες. Με αυτήν εμβολιάζονται 150ml LB και επωάζονται στους 37C μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να φτάσει το 0,6. Τότε μοιράζονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρούνται στις 2500 rpm για 10' στους 4C. Το ίζημα διαλύεται σε 15ml transformation buffer 1 (30mM οξικό κάλιο, 100mM CaCl₂, 10mM MnCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 5,8) και επωάζεται για 30' στον πάγο. Ακολούθως, φυγοκεντρείται στις 2000rpm και στους 4C για 10'. Το ίζημα διαλύεται σε 2ml transformation buffer 2 (10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% γλυκερόλη pH 6,5), χωρίζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε μέρη των 100μl και φυλάσσεται στους -80C.

7. Μετασχηματισμός κυττάρων

Πειραματική διαδικασία:

Ένα aliquot από επιδεκτικών κυττάρων αφήνεται να ξεπαγώσει σε πάγο. Μόλις αυτό γίνει, προστίθεται 1-10ng DNA και επωάζονται στο πάγο για 30'. Ακολούθως, μεταφέρονται στο υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 42C για 90'' και μετά πάλι στον πάγο για 2'. Κατόπιν, προστίθενται 150μl LB (για 1 λίτρο: 10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 10g χλωριούχο νάτριο (0,17M), pH 7.0) και τα κύτταρα επωάζονται με ανάδευση στους 37C για 45'-60'. Τέλος, υπό ασηπτικές συνθήκες στρώνονται σε τρυβλία με στερεό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής σε περιεκτικότητα 1/1000 v/v. Αφήνονται να επωαστούν για 12-18 ώρες.

8. SDS-PAGE

Πειραματική διαδικασία:

Συναρμολογείται προσεκτικά η συσκευή συναρμολόγησης του τζελ. Ακολούθως, προετοιμάζεται το running gel και εγχέεται ανάμεσα στα δύο τζάμια στην συσκευή. Για 10ml πηκτής, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα, χρειάζονται:

Πίνακας 2 Πίνακας με τα συστατικά απαραίτητα για πηκτές SDS-PAGE

5%	10%	12%	15%
----	-----	-----	-----

ddH ₂ O	4,45ml	2,85ml	2,15ml	1,15ml
29+1% ακρυλαμίδη /δισακρυλαμίδη	1,65ml	3,3ml	4ml	5ml
Tris 1,5M pH 8,8	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml
SDS 10%	100μl	100μl	100μl	100μl
APS 10%	100μl	100μl	100μl	100μl
TEMED	5μl	5μl	5μl	5μl

Χρειάζεται τουλάχιστον 30' για να πολυμεριστεί πλήρως. Ακολούθως, ετοιμάζεται το stacking gel (2,7ml ddH₂O, 0,67ml ακρυλαμίδη + δισακρυλαμίδη 29+1%, 0,5ml 0,5M Tris pH 6,8, 40μl APS 10%, 40μl SDS, 5μl TEMED) και εγχέεται πάνω από το running gel και τοποθετούνται τα ειδικά χτενάκια. Αφού πολυμεριστεί εντελώς, τα χτενάκια αφαιρούνται και το τζελ τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που είναι γεμάτη με 1X running buffer (για 1λίτρο 10 x running buffer: 30,3g Tris, 144,2g γλυκίνη, 10g SDS). Τα δείγματα αναμειγνύονται με την κατάλληλη ποσότητα loading buffer (για 40ml: 5ml Tris 0,5M pH 6,8, 20ml SDS 10%, 10ml γλυκερόλη, 0,1g κυανό της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 5ml ddH₂O) και βράζονται για 5'. Κατόπιν φορτώνονται. Η ηλεκτροφόρηση αρχικά γίνεται στα 80V ή 100V και αφού η χρωστική του loading buffer φτάσει στο τέλος του stacking gel η τάση πρέπει να ρυθμιστεί στα 120V έως 160V. Μετά από περίπου 90' η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται και το τζελ μπαίνει για 10' στο staining solution (για 500ml: 225ml μεθανόλη (45%), 50ml (10%) οξικό οξύ, 1,25g (3mM) Coomassie brilliant blue R-250). Ακολούθως, ξεπλένεται με νερό και μεταφέρεται στο destaining solution (για 500ml: 75ml (15%) αιθανόλη, 50ml (10%) οξικό οξύ) για 60', ή και overnight, μέχρι η αντίθεση των ζωνών που θα εμφανιστούν με στο πήκτωμα να είναι ικανοποιητική. Ενδέχεται το destaining solution να πρέπει να αλλαχτεί δύο ή τρεις φορές για καλύτερα αποτελέσματα.

9. Επαγωγή έκφρασης πρωτεΐνης σε βακτηριακή καλλιέργεια

Πειραματική διαδικασία:

Εμβολιάζεται καλλιέργεια 1ml LB και 50 μg αμπικιλίνης με αποικία βακτηρίων με το επιθυμητό γονίδιο. Αφήνεται να επωαστεί 18 ώρες στους 37C. Το επόμενο πρωί, 50μl

από αυτή την καλλιέργεια χρησιμοποιούνται για να εμβολιαστούν 5ml LB με 250 µg αμπικιλίνης (14µM). Μετά από 1-2 ώρες η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας προσδιορίζεται. Ιδανικά θα βρίσκεται πάνω από το 0,5. 1 ml από την καλλιέργεια αφαιρείται και φυγοκεντείται για 2' στις 12.000rpm. το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα καταψύχεται. Στην υπόλοιπη καλλιέργεια προστίθεται 0,1mM IPTG και η καλλιέργεια τοποθετείται πάλι στον επωαστήρα. Κάθε ώρα μετράται η οπτική πυκνότητα και αφαιρείται ίση ποσότητα κυττάρων με το πρώτο δείγμα. Αυτά φυγοκεντρούνται όπως και τα πρώτα και καταψύχονται. Τέλος, βράζονται σε 80µl loading buffer για 10' και φορτώνονται σε SDS-PAGE για να φανεί αν έχει επαχθεί η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης ή όχι. Για να φορτωθεί περίπου ίση ποσότητα κυττάρων από κάθε χρονική στιγμή στην SDS-PAGE, ο όγκος που θα φορτωθεί προσαρμόζεται σε αντιστοιχία με την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε κάθε στιγμή της δειγματοληψίας.

Για την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων πρωτεΐνης, η πρώτη καλλιέργεια είναι 5ml και η δεύτερη 250ml, με αντίστοιχη αύξηση και της ποσότητας αμπικιλίνης. Αφού ολοκληρωθεί η τετράωρη επαγωγή, τα κύτταρα μοιράζονται σε falcons των 50ml και φυγοκεντρούνται για 15' στις 2000rpm. Το ίζημα φυλάσσεται στους -80C.

10.Καθαρισμός πρωτεΐνης σε στήλη Ni-αγαρόζης

Πειραματική διαδικασία:

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Russel & Sambrook, 2001) αποτελεί τροποποίηση μεθόδου των hochuli et al. (1988) για καθαρισμό πρωτεϊνών στις οποίες έχει προστεθεί μία αλληλουχία 6 ιστιδινών στο αμινοτελικό ή το καρβοξυτελικό άκρο. Στο ίδιο εγχειρίδιο προτείνεται η παρεβμολή δύο καταλοίπων γλυκίνης ανάμεσα στην πολύ-ιστιδίνη και την υπόλοιπη αλληλουχία της πρωτεΐνης, ώστε να μένει εκτεθειμένη και ευκίνητη, βελτιώνοντας έτσι την απόδοση του καθαρισμός με στήλη NTA-αγαρόζης εμπλουτισμένης με Ni²⁺

Φορτώνονται 2ml από την ειδική αγαρόζη εμπλουτισμένη με νικέλιο στην στήλη και αφήνονται να συμπυκνωθούν σε ηρεμία. Ακολούθως, επανεμπλουτίζεται η στήλη με 4ml Ni-Agarose regenerating buffer (0,1M NiSO₄). Η στήλη καθαρίζεται με 3 ml ddH₂O και προετοιμάζεται με 3 ml Ni-Agarose protein binding buffer (20mM φωσφορικό νάτριο, 500mM NaCl pH 7,8). Τα κύτταρα με την επιθυμητή πρωτεΐνη

ξεπαγώνουν και διαλύονται σε 4ml Ni-Agarose protein binding buffer, με 2mg λυσοζύμης (0,5mg/ml). Αφήνονται στον πάγο για 30' και ακολούθως, μπαίνουν σε αναδευτήρα σε δωμάτιο-ψυγείο για 10'. Μετά στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται 1% Triton X-100, 10μg RNase, 10μg DNase και 5μg αναστολείς πρωτεασών. Μετά από άλλα δέκα λεπτά ανάδευσης στους 4C ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12.000rpm για 45'. Το υπερκείμενο περνάει από το διηθητικό χαρτί και φορτώνεται στην στήλη. Όλη η υπόλοιπη διαδικασία πρέπει να γίνει στους 4C. Η στήλη ξεπλένεται με 6 ml Ni-Agarose protein binding buffer και με Ni-Agarose protein washing buffer (20mM φωσφορικό νάτριο, 500mM NaCl pH 6,0) μέχρι η οπτική πυκνότητα του υγρού που περνάει από την στήλη να είναι κάτω από 0,1. Τότε η στήλη πλένεται με 6 ml από κάθε διάλυμα ιμιδαζόλης (20mM φωσφορικό νάτριο, 500mM NaCl pH 6,0 και 10mM, 50mM, 100mM, 150mM ιμιδαζόλη αντίστοιχα), με το υγρό να συλλέγεται σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα για κάθε ml που περνά. Εναλλακτικά, και εάν η εκλούση με ιμιδαζόλη δεν δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα, μπορεί να δοκιμαστεί το πρωτόκολλο οξίνης έκλουσης. Η στήλη ξεπλένεται με 6 ml από τα δύο Ni-Agarose protein acidic extraction buffer (20mM φωσφορικό νάτριο, 500mM NaCl. Το pH ρυθμίζεται στο 5,5 και 4,0 αντίστοιχα με φωσφορικό οξύ και καυστικό νάτριο). Από τα κλάσματα που συλλέχτηκαν, 20 μl χρησιμοποιούνται για SDS-PAGE και τα υπόλοιπα κλείνονται σε κομμάτια ειδικής ημιπερατής μεμβράνης ή και σε δοκιμαστικό σωλήνα 1,5ml με τρύπα στο καπάκι την οποία κλείνει ημιπερατή μεμβράνη και τοποθετούνται μέσα σε Dialysis solution (10% γλυκερόλη, 15mM NaCl, 50mM Tris pH 7,5), για 18 ώρες στους 4C σε αναδευτήρα.. Η στήλη καθαρίζεται με 4 ml διαλύματος 0,2M οξικού οξέος και 30% κατ' όγκο γλυκερόλη και 3ml ddH₂O πριν αναγεννηθεί εκ νέου. Η στήλη μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί μόνο για τον καθαρισμό της ίδιας πρωτεΐνης.

11. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή ακρυλαμίδης-ουρίας

Διαδικασία:

Προετοιμάζεται το διάλυμα ακρυλαμίδης με 8M ουρίας. Για πηκτή 10ml:

Πίνακας 3 Οι αναλογίες των συστατικών για πηκτή 10ml

3,50%	5%
-------	----

	ως 10	ως 10
ddH ₂ O	ml	ml
29+1% ακρυλαμίδη		
/δισακρυλαμίδη	1,15ml	1,65ml
TBE 5x	0,5ml	0,5ml
APS	100μl	100μl
TEMED	5μl	5μl
Ουρία	4,8g	4,8g

Για πηκτική 60 ml:

Πίνακας 4 Οι αναλογίες των συστατικών για πηκτική 60ml

	3,50%	5%
	ως 60	ως 60
ddH ₂ O	ml	ml
29+1% ακρυλαμίδη/ δισακρυλαμίδη	6,9ml	9,9ml
TBE 5x	3ml	3ml
APS	500μl	500μl
TEMED	50μl	50μl
Ουρία	28,8g	28,8g

Είναι σημαντικό να διαλυθεί η ουρία πριν συμπληρωθεί ο τελικός όγκος του διαλύματος με νερό, καθώς αυτός αυξάνει σημαντικά με την προσθήκη της. Για να διαλυθεί η ουρία είναι χρήσιμο το διάλυμα να θερμανθεί στους 50C. Όταν η ουρία διαλυθεί και αφού το διάλυμα κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται το APS και το TEMED. Το διάλυμα εγχέεται γρήγορα αλλά προσεκτικά ανάμεσα στα τζάμια της συσκευής συναρμολόγησης. Είναι πιθανόν να πρέπει να έχει μονωθεί εκ των προτέρων με αгарόζη 5% προκειμένου να μην παρουσιάσει καμία διαρροή. Αφού το διάλυμα της ακρυλαμίδης χυθεί ανάμεσα στα τζάμια, τοποθετούνται και τα ειδικά χτενάκια και το τζελ αφήνεται να πολυμεριστεί για τουλάχιστον μία ώρα. Αφού έχει πήξει εντελώς, αφαιρείται, όπου υπάρχει, το κάτω spacer και τα χτενάκια και τα πηγαδάκια πλένονται διεξοδικά με TBE 0,25X για να απομακρυνθεί τυχόν απολυμέριστη ακρυλαμίδη. Το τζελ μπαίνει στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προθερμαίνεται στην τάση όπου θα ηλεκτροφορηθούν και τα δείγματα για 30'-60'.

Τα δείγματα των νουκλεϊκών οξέων, ενώ το μεταξύ, αναμειγνύονται με αναλογία 4:1 με το loading buffer (0,1% κυανό βρωμοφαινόλης, 0,1% κυανό ξυλενίου, 3ml απιονισμένη φορμαμίδη, 80ml EDTA 0,5M pH 8,0, 4ml MOPS buffer 10 x) και βράζονται για 1'-3', αναλόγως του όγκου. Φορτώνονται στο τζελ και ηλεκτροφορούνται ανάλογα με τις ανάγκες από μία έως τρεις ώρες. Τυπικά, στα μικρά πηκτώματα (8cm ύψος) εφαρμόζεται τάση 200V και στα μεγάλα (20cm ύψος), 800V, με μισή ώρα προθέρμανση.

12. Μη αποδιατακτική PAGE νουκλεϊκών οξέων

Πειραματική διαδικασία :

Όπως και στις αποδιατακτικές πηκτές, οι εκάστοτε ανάγκες υπαγορεύουν τον όγκο και την πυκνότητα της πηκτής που θα χρησιμοποιηθεί. Η διαδικασία είναι η ίδια με τις αποδιατακτικές πηκτές, όμως η συγκέντρωση TBE είναι 0,5X, και, προφανώς, δεν χρειάζεται να προστεθεί ουρία, ούτε να θερμανθεί το διάλυμα.

Πίνακας 5 Οι αναλογίες των συστατικών για πηκτή 60ml

	3,50%	5%
ddH ₂ O	47,1ml	44,1ml
29+1% ακρυλαμίδη/		
δισακρυλαμίδη	6,9ml	9,9ml
TBE 5x	6ml	6ml
APS	500μl	500μl
TEMED	50μl	50μl

Αφού πήξει το πηκτώμα, τα πηγαδάκια καθαρίζονται και φορτώνονται τα δείγματα που έχουν αναμειχθεί 4:1 με το native loading buffer (0,1% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0,1% κυανό ξυλενίου, 10% γλυκερόλη). Δεν πρέπει να βραστούν ή να θερμανθούν, για να μην αποδιαταχθούν τα νουκλεϊκά οξέα. Η ηλεκτροφόρηση πρέπει να γίνει υπό ήπιες συνθήκες- ενδεικτικά, εφαρμόζεται τάση 10V ανά εκατοστό. Επίσης, είναι σκόπιμο να γίνει μέσα σε δωμάτιο-ψυγείο (4-6C), ώστε να μην αποδιαταχθούν ευαίσθητες δομές των νουκλεϊκών οξέων από την ατμοσφαιρική θερμοκρασία. Ανάλογα με τις ανάγκες, καθορίζεται και πόση ώρα θα τρέξει η ηλεκτροφόρηση.

13.Ραδιενεργή σήμανση μετάγραφου με κινάση και γ - ^{32}P -ATP

Πειραματική διαδικασία:

Σε 0,1nMRNA, που έχει ήδη αποφοσφορυλιωθεί με CIP (calf intestinal phosphatase), προστίθενται 2μl από την κινάση, το ATP και buffer κινάσης ίσο με το 1/10 του τελικού όγκου, που συμπληρώνεται με ddH₂O. Η αντίδραση επωάζεται για 60' στους 37C και ύστερα περνάει από στήλη αγαρόζης. Ξεπλένεται διαδοχικά με δόσεις 100μl TE (10mM Tris, 100mM EDTA) που συλλέγονται σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Με τον μετρητή Γκάιγκερ προσδιορίζονται ποια κλάσματα έχουν την μεγαλύτερη ενεργότητα και συλλέγονται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Από αυτόν, ένα μικρό μέρος, (<10μl) χρησιμοποιείται στο ειδικό όργανο (Beckman LS 1701 Scintillation counter) για να προσδιοριστεί με ακρίβεια πόσα cpm (counts per minute) περιέχει το μετάγραφο.

14. Παραγωγή ραδιενεργού μεταγράφου με *in vitro* transcription

Πειραματική διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1μg DNA, 2μl DTT 0,1M (τελική συγκέντρωση 100mM) , 1μl A-C-G mix 10mM (τελική συγκέντρωση 0,5mM), 1μl RNase inhibitors, 1μl UTP 200μM (τελική συγκέντρωση 10μM), 3μl UTP με ραδιενεργά σημασμένο φώσφορο (3000Ci/mmol), 1μl από την πολυμεράση και το ρυθμιστικό της διάλυμα σε ποσότητα ανάλογα με το αν είναι 5X ή 10X (T7 pol. Buffer: 40 mM Tris-HCl (pH8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, Sp 6pol. Buffer: 40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM spermidine, pH 7.9 στους 25°C).

Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται μέχρι τα 20μl με ddH₂O. Η αντίδραση επωάζεται για 90' στους 37C και κατόπιν προστίθενται 10u DNase και η αντίδραση αφήνεται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται TE μέχρι το 0,1ml και ίσος όγκος φαινόλης. Ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινείται και κατόπιν φυγοκεντρείται για 2'. Η υδατική φάση φορτώνεται σε στήλη αγαρόζης (Biorad Biogel A0.5 η παρομοια). Ξεπλένεται διαδοχικά με δόσεις 100μl TE που συλλέγονται σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Με τον μετρητή Γκάιγκερ προσδιορίζονται ποια κλάσματα έχουν την μεγαλύτερη ενεργότητα και συλλέγονται στον ίδιο

δοκιμαστικό σωλήνα. Από αυτόν, ένα μικρό μέρος, (<10μl) χρησιμοποιείται στο ειδικό όργανο για να προσδιοριστεί με ακρίβεια πόσο ενεργό είναι το μετάγραφο.

15. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποσκοπεί στον *in vitro* εντοπισμό αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Είναι δυνατόν να δοκιμαστεί μια πολύ πλατιά γκάμα διαφορετικών συνθηκών υπό τις οποίες ενδέχεται να υπάρχει μια τέτοια πρόσδεση, αναφορικά με το διάλυμα στο οποίο θα επωαστούν τα δείγματα, ή την θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η επώαση. Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να υπάρχει και ένα δείγμα ελέγχου με το εκάστοτε νουκλεϊκό οξύ επωασμένο στην κάθε συνθήκη χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Αν υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στο νουκλεϊκό οξύ και την πρωτεΐνη, αυτό θα επηρεάζει τις ηλεκτροφορητικές του ιδιότητες, και έτσι στο πηγαδάκι όπου έχει φορτωθεί νουκλεϊκό οξύ μαζί με πρωτεΐνη, η ζώνη θα φαίνεται μετατοπισμένη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Πειραματική διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμειγνύονται όγκοι από τα διαλύματα του μεταγράφου και της πρωτεΐνης, ώστε η αναλογία των συγκεντρώσεων των δύο να βρίσκεται στον προκαθορισμένο στόχο. Αυτός μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα κάθε πείραμα, από 1:1 μέχρι και 500:1. Ακόμα, προστίθενται 1μl από το *torula yeast full RNA* 10μg/μl, 5μl binding buffer (15% γλυκερόλη, 250mM HEPES, 500μM EDTA) και ο όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τα 30μl. Οι συνθήκες επώασης μπορούν επίσης να ποικίλουν ανάλογα με τις ανάγκες, από 20C, μέχρι βράσιμο, ή φύλαξη στους 4C, όπως και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, στο οποίο μπορούν να δοκιμαστούν διαφορετικές συγκεντρώσεις EDTA, αλάτων Νατρίου/Καλίου, μαγνησίου, διαφορετικά pH κα. Όταν είναι έτοιμα, τα δείγματα φορτώνονται στο τζελ με 4:1 αναλογία με το loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πρέπει να είναι υπό ήπιες συνθήκες, στους 4C και σε χαμηλή τάση- ενδεικτικά 200V. Όταν κριθεί ότι οι χρωστικές έχουν προχωρήσει αρκετά, το πήκτωμα μπαίνει για 15' σε fixing solution (10% αιθανόλη, 1% οξικό οξύ) και κατόπιν κλείνεται σε ειδική σακούλα και στον σκοτεινό θάλαμο, μπαίνει στην κασέτα μαζί με φιλμ για αυτοραδιογραφία. Εναλλακτικά, πριν την αυτοραδιογραφία, η πηκτή μπορεί να αποξηρανθεί.

16.Ανάλυση κατά Northwestern

Η ανάλυση κατά Northwestern ξεκινά με μία SDS-PAGE, όπου οι πρωτεΐνες του δείγματος αποδιατάσσονται και διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Στην συνέχεια, μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για Western, και αφού προηγηθεί μία διαδικασία επαναδιάταξής τους, επωάζονται με τον κατάλληλο RNA ανιχνευτή.

Πειραματική διαδικασία:

Σε αυτή την ανάλυση διάλυμα SB περιέχει 50mM KCl, 0,1% w/v φικόλη, 0,1% Nonidet P-40, 0,1% w/v MnCl₂ 0,1, w/v ZnCl₂ (επίσης, δοκιμάστηκε με 0,1mM και MnCl₂ 0,1mM ZnCl₂). Αυτό το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο και αφού κρυώσει, προστίθενται 15mM HEPES 0,1mM και EDTA pH 8,0. Πριν την χρήση προστίθεται και DTT σε συγκέντρωση 0,5mM. Αρχικά, οι επιθυμητές πρωτεΐνες υποβάλλονται κανονικά σε SDS-PAGE. Κατόπιν, το τζελ τοποθετείται με την μεμβράνη στην συσκευή μεταφοράς σύμφωνα με τις εκάστοτε οδηγίες του κατασκευαστή, που είναι γεμάτη με Transfer buffer (25mM Tris, 200mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Εφαρμόζεται τάση 100V για μία ώρα και κατόπιν η μεμβράνη βάφεται για 10' με Ponceau staining solution (1% w/v Ponceau Red, 1% v.v οξικό οξύ) για να φανεί αν πέτυχε η μεταφορά. Η μεμβράνη μπορεί να ξεβαφτεί απλά με νερό. Ξεπλένεται δύο φορές με SB και επωάζεται για μισή ώρα σε SB με 100μl (1mg) torula yeast full RNA. Κατόπιν, ξεπλένεται δύο φορές με SB και επωάζεται για δύο ώρες σε SB με $1,4 \times 10^7$ crpm από το μετάγραφο. Η μεμβράνη πλένεται τρεις φορές για 15' με SB, κλείνεται σε ειδική σακούλα και εκτίθεται σε κασέτα με φιλμ για αυτοραδιογραφία.

17.Χρώση νιτρικού αργύρου για πρωτεΐνες (Russel & Sambrook, τροποποίηση πρωτοκόλλου Simmons et al. 1981)

Πειραματική διαδικασία:

Το τζελ εμβαπτίζεται για τρεις ώρες (ή όλο το βράδυ) στο fixing solution (30% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ). Κατόπιν, δύο φορές για 30' σε διάλυμα αιθανόλης 30%

και ακολούθως πλένεται τρεις φορές για 10' σε απιονισμένο νερό. Βάφεται για 60' με το staining solution (0,1% AgNO₃) και μετά από ένα ξέπλυμα με απιονισμένο νερό, εμβαπτίζεται στο developing solution (2,5% ανθρακικό νάτριο, 0,2% φορμαλδεΰδη) . Όταν εμφανιστούν οι ζώνες με την επιθυμητή ευκρίνεια, η αντίδραση μπορεί να σταματήσει, απλά ξεπλένοντας το τζελ με περίσσεια απιονισμένου νερού.

18.Χρώση νιτρικού αργύρου για νουκλεϊκά οξέα (Schumacher et al. 1983)

Πειραματική διαδικασία:

Το τζελ μπαίνει πρώτα για μία ώρα στο fixing solution(10% αιθανόλη, 0,5% οξικό οξύ). Ακολούθως, για άλλη μία ώρα στο staining solution (0,2% νιτρικός άργυρος). Ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και εμβαπτίζεται για 10'-15' στο developing solution (1,5% καυστικό νάτριο, 0,15% φορμαλδεΰδη, προαιρετικά NaBH₄ 0,00875%). Αφού το χρώμα του σταθεροποιηθεί, μπαίνει για λίγα λεπτά και στο enhancing solution (ανθρακικό νάτριο 0,75%) που μπορεί να βοηθήσει να εμφανιστούν ζώνες οι οποίες ως τότε δεν φαίνονταν.

19.Χρώση νιτρικού αργύρου για μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Su, 1987)

Πειραματική διαδικασία:

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, εμβαπτίζεται για 5' σε διάλυμα οξικού οξέος 5% v/v. Κατόπιν, για άλλα 5' σε διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1% w/v και τέλος για άλλα 5' σε διάλυμα 1% w/v οξικό νάτριο και 0,02% v/v φορμαλδεΰδη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με 30'' σε κάθε διάλυμα όσο αυτό κρίνεται αναγκαίο.

20.Dot blot

Διαδικασία:

Τοποθετείται η κατάλληλη ποσότητα (3-5 μg) από την επιθυμητή πρωτεΐνη, καθώς και από την πρωτεΐνη ελέγχου σε ένα μικρό κομμάτι μεμβράνης για Western blot ή για ανάλυση Plaque Lift Assay- αρκετά μικρό για να χωρά σε δοκιμαστικό σωλήνα 1,5 ml. Όλες οι επώσεις πρέπει να γίνονται στους 4C. Επώάζεται για 30' σε 1,5 ml SB με 7 μl Torula yeast full RNA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και ακολούθως προστίθεται το ραδιενεργά σημασμένο RNA. Για ένα κομμάτι μεμβράνης 3-4 cm^2 φτάνουν περίπου 500.000cpm. Μετά από επώαση 2 ωρών, το διάλυμα απορρίπτεται σε κατάλληλο δοχείο και ακολουθούν τέσσερα πεντάλεπτα πλυσίματα με SB. Τέλος, η μεμβράνη στεγνώνεται και εκτίθεται σε κασέτα αυτοραδιογραφίας με φιλμ.

21. Γλυοξυλίωση νουκλεϊκού οξέος

Διαδικασία:

Σε 8 μl του διαλύματος του νουκλεϊκού οξέος προστίθενται 22 μl του διαλύματος της αντίδρασης γλυοξάλης (50% DMSO, 10mM φωσφορικό νάτριο pH 6,5, 0,2% SDS, 1M απιονισμένη γλυοξάλη) και επωάζονται στους 55C για 15'.

22. Χημική τροποποίηση βάσεων νουκλεϊκών οξέων με υδραζίνη και πιπεριδίνη (Maxam & Gilbert, 1977)

Διαδικασία:

Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε δημοσίευση των Maxam & Gilbert το 1977, όπου χρησιμοποιούσαν την χημική τροποποίηση των βάσεων του DNA για να αλληλουχίσουν κομμάτια νουκλεϊκού οξέος. Σε δοκιμαστικό σωλήνα, προστίθενται 10 μl απιονισμένο νερό, 8 μl από το επιθυμητό νουκλεϊκό οξύ και 4 μl υδραζίνη ή 30 μl φορμική πιπεριδίνη. Το διάλυμα της υδραζίνης επωάζεται στους 37C για 15' και της πιπεριδίνης στους 20C για 7'. Σε αυτό το διάστημα έχουν σπάσει οι δακτύλιοι των μισών, περίπου βάσεων- κυτοσίνης και θυμίνης με την υδραζίνη και αντίστοιχο ποσοστό της αδενίνης και της γουανίνης με την πιπεριδίνη. Μετά την επώαση, προστίθενται 200 μl κρύο διάλυμα αναστολής δράσης (0,3M οξικό νάτριο, 0,1mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast tRNA) και 750 μl καθαρής αιθανόλης. Τα διαλύματα επωάζονται για 5' στους -70C για να κατακρημνιστούν τα νουκλεϊκά οξέα και τέλος φυγοκεντρώνονται στα 12.000g για 15'. Εναλλακτικά, μπορεί να παραταθεί ο

χρόνος επώασης με πιπεριδίνη και υδραζίνη, για πλήρη καταστροφή των δακτυλίων των βάσεων.

23. Midipreps (Nucleobond Nucleobond® Xtra Midi κιτ)

Διαδικασία:

Εμβολιάζεται καλλιέργεια 100ml LB με αμικικιλίνη με αποικία από τα επιθυμητά βακτήρια και επώάζεται όλο το βράδυ. Το επόμενο πρωί, η καλλιέργεια μοιράζεται σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρείται για 10' στα 6.000g σε ψυχομένη φυγόκεντρο. Τα υπερκείμενα απομακρύνονται και το ίζημα διαλύεται σε 4ml RES buffer. Ακολούθως προστίθενται άλλα 4ml LYS buffer και οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται ήπια. Επώάζονται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Στην ειδική κολώνα περνάνε 12 ml EQU buffer. Στο διάλυμα των κυττάρων, προστίθενται 4ml NEU buffer, αναδεύεται και φορτώνεται στο φίλτρο της στήλης. Εκλούεται με 5ml EQU και απομακρύνεται το πρώτο φίλτρο. Ακολουθούν πλύσεις της κολώνας με 8ml Wash buffer και τέλος, 5ml Elution buffer το οποίο και συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Προστίθενται 3,5ml ισοπροπανόλη και αναδεύονται. Μετά από επώαση 2' το διάλυμα φυγοκεντρείται για 30' στα 7.000g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα καθαρίζεται με 2ml αιθανόλης 70%. Ακολουθεί μία τελευταία φυγοκέντρηση στα 15.000g για 5'. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει πριν διαλυθεί σε 100μl απιονισμένου νερού.

24. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων

Διαδικασία:

Στο διάλυμα του νουκλεϊκού οξέος προστίθενται 2,5-3 όγκοι αιθανόλη και 10%v/v οξικό νάτριο 3M. Το διάλυμα τοποθετείται στους -20C για μία ώρα και κατόπιν φυγοκεντρείται στα 12.000g για 15'. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται στο κατάλληλο διάλυμα στον επιθυμητό όγκο.

25. Απομόνωση RNA με Trizol

Διαδικασία:

Σε 0,2g λειοτριβιμένου παρούσια υγρού αζώτου ιστού προστίθενται 2 ml Trizol (38% όξινη φαινόλη, 0,8M θειοκυανιούχα γουανιδίνη, 0,4M θειοκυανιούχο αμμώνιο, 0,1M οξικό νάτριο, 5% γλυκερόλη). Το διάλυμα ομογενοποιείται με ανακίνηση και φυγοκεντρείται στις 3.500 rpm για 15'. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα, και προστίθενται 400μl χλωροφόρμιο. Επωάζεται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται στις 3.500rpm για 20'. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 500μl ισοπροπανόλη και 500μl διάλυμα αλάτων (0,5M κιτρικό νάτριο, 1,2M χλωριούχο νάτριο). Το διάλυμα επωάζεται για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και για 5' στους -80C ή για 30' στους -20C. Κατόπιν, φυγοκεντρείται για μία ώρα στις 3.500rpm. Το ίζημα ξεπλένεται με 500μl αιθανόλη 70% και φυγοκεντρείται στις 3.500rpm για 15'. Τέλος, το ίζημα διαλύεται σε 100μl απιονισμένο νερό.

26. Απομόνωση RNA με TEMS

Διαδικασία:

Σε 0,1g ιστού που έχει κονιορτοποιηθεί παρούσια υγρού αζώτου προστίθενται 500μl φαινόλης-εκχύλισης (extraction phenol: 100ml φαινόλη pH8.0 : 30 ml TEMS : 25 ml χλωροφόρμιο v/v) και 700μl TEMS . (100mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA pH 8.0). Το διάλυμα ανακινείται και κατόπιν φυγοκεντρείται στις 11.500 rpm για 15'. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε άλλον δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται άλλα 500μl φαινόλης-TEMS. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 11.500 rpm για 15'. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 500μl χλωροφόρμιο. Το διάλυμα ανακινείται και φυγοκεντρείται για 15' στις 11.500rpm. Στην υδατική φάση προστίθενται 1ml αιθανόλη 100% και 150μl οξικό νάτριο 3M. Το διάλυμα επωάζεται για μία ώρα στους -20C και φυγοκεντρείται για 30' στις 11.500 rpm. Το ίζημα ξεπλένεται με 500μl 70% αιθανόλη και φυγοκεντρείται στις 11.500 rpm για 10'. Το ίζημα στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε 100μl αποσταγμένο νερό.

27. Ανάλυση κατά Northern

Διαδικασία:

Τα επιθυμητά δείγματα ηλεκτροφορούνται σε αгарόζη υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Το κομμάτι της πηκτής τοποθετείται σε συσκευή για τριχοειδή μεταφορά νουκλεϊκών οξέων. Στην δεξαμενή υπάρχει διάλυμα 10 x SSC (20 x SSC stock: 3M χλωριούχο νάτριο και 300mM κιτρικό νάτριο) Πάνω στην πηκτή τοποθετούνται, διαδοχικά, μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45μm), τρία απορροφητικά χαρτιά (Whatman) ου έχουν εμβαπτιστεί σε 2 x SSC, στεγνές χαρτοπετσέτες αρκετού πάχους χαρτοπετσέτες και τέλος επιπρόσθετο βάρος. Η μεταφορά διαρκεί 16-20 ώρες. Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλένεται με 2x SSC και αφήνεται να στεγνώσει σε απαγωγό και το RNA μονιμοποιείται στην μεμβράνη με την χρήση υπεριάδους ακτινοβολίας 1200J στο καταλληλο μηχανημα (Stratalinker, Stratagene) . Το πήκτωμα κατόπιν βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο και ελέγχεται ότι το RNA έχει μεταφερθεί στην μεμβράνη.

Εν συνεχεία, η μεμβράνη υφίσταται προ-υβριδοποίηση (5 x SSC, 1 x Denhardts, 1% SDS, 50μg/ml carrier DNA) για δύο ώρες στους 65C.. Κατόπιν, προστίθεται ο ραδιενεργός ανιχνευτής στην κατάλληλη ποσότητα- τυπικά, για μία μεμβράνη (40 cm²), περίπου 2.000.000-3.000.000 cpm. και ακολουθεί επώαση για 18 ώρες. Μετά, το υγρό απορρίπτεται στο κατάλληλο δοχείο και ακολουθούν δύο πλυσίματα με 2 x SSC για πέντε λεπτά το καθένα, δύο πλυσίματα με 2 x SSC και 0,2% SDS για 30' το καθένα και ένα πλύσιμο με 0,2 x SSC και 0,2% SDS για 15'. Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει, κλείνεται σε ειδική μεμβράνη και εκτίθεται σε κασέτα αυτοραδιογραφίας με φιλμ.

28. In vitro αντιγραφή για παρασκευή ανιχνευτή DNA

Διαδικασία:

Το ένθεμα του PSTVd απομονώθηκε από τον φορέα pH106 με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII. Ακολούθως, το εκμαγείο του DNA αποδιατάσσεται με βρασμό και τοποθετείται σε πάγο. Σε τελικό όγκο 50μl προστείνονται 1μl 0,5M TTP, 1μl 0,5M GTP, 20μl ρυθμιστικό διάλυμα τμήματος Klenow 2,5x (τελική συγκέντρωση 1x), 3μl ραδιοσημασμένο ATP (3000Ci/mmol), 3μl ραδιοσημασμένο CTP (3000Ci/mmol) και 1μl (5 u) τμήμα πολυμεράσης Klenow. Στην συνέχεια, το διάλυμα επωαζόταν για 60' στους 37C και κατόπιν, ο ανιχνευτή διαχωριζόταν με στήλη σφαιριδίων αгарόζης.

29. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση εκχυλίσματος φυτικού ιστού (Manousopoulos & Tsagris, 2009)

Διαδικασία:

100mg φυτικού ιστού που έχουν κονιορτοποιηθεί παρουσία υγρού αζώτου ζυγίζονται και διαλύονται σε 0,5 x TBE. Το διάλυμα ομογενοποιείται και φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 5' στις 5.000rpm. Στο υπερκείμενο προστίθεται γλυκερόλη 30% v/v και το δείγμα φορτώνεται σε πηκτή αγαρόζης 0,8%. Ηλεκτροφορεύεται για 6 ώρες στα 30V (εναλλακτικά, 8 ώρες στα 20V) σε δωμάτιο-ψυγείο. Ως δείγμα ελέγχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκχύλισμα, στο οποίο το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης εκχυλίζεται με φαινόλη. Τα δείγματα στο τζελ φορτώνονται δύο φορές συμμετρικά, ώστε ένα κομμάτι του τζελ να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση κατά Northern, για να φανεί η θέση του επιθυμητού RNA και το άλλο να χρησιμοποιηθεί για να ανακτηθούν οι πρωτεΐνες και νουκλεοπρωτεΐνες. Η μεμβράνη ακολούθως επωάζεται σε ειδικό κύλινδρο με διάλυμα πρωτεΐνάσης K (5mm EDTA, 0,5% SDS, 50ng/ml πρωτεΐνάση K) για 30' στους 55C σε φούρνο υβριδοποίησης. Μετά ακολουθεί η διαδικασία προ- και υβριδοποίησης όπως περιγράφηκε παρα πάνω

30. Ανάκτηση μακρομορίων από πηκτή αγαρόζης και ανάλυση με SDS-PAGE (Fragkoulis & Tsagris, 2011)

Διαδικασία:

Η διαδικασία αυτή γίνεται στο δευτερο μισο του πηκτώματος αγαρόζης, που έχει φορτωθεί με τον ίδιο τρόπο με το μέρος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση κατά Northern, με στοχο να αναλυθούν τα μακρομόρια (νουκλεινικά, πρωτεϊνες, νουκλεοπρωτεϊνες) όπως έχουν μετακινηθεί μετά την ηλεκτροφόρηση.

Η πηκτή αγαρόζης κόβεται πρώτα σε λωρίδες, ανά πηγαδάκι και κατόπιν σε κομμάτια μήκους 0,5cm. Τα κομμάτια μπορούν να καταψυχθούν με υγρό άζωτο και να διατηρηθούν στους -80C. Για να ανακτηθούν τα μακρομόρια- RNA, DNA και πρωτεΐνες, τοποθετούνται σε ακρορύγχιο με φίλτρο μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα

του 1,5ml και φυγοκεντρώνονται για 15' στις 12.000 rpm. Το φίλτρο συγκρατεί την αгарόζη, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα του τζελ, μαζί με τα μακρομόρια, περνούν και συλλέγονται στο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθως, προστίθενται 40μl SDS-PAGE loading buffer και τα δείγματα φορτώνονται σε SDS-PAGE.

31. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με ακετόνη (Pierce- Technical Resource)

Διαδικασία:

Το πρωτόκολλο προέρχεται από την ιστοσελίδα της Pierce. Σε διάλυμα που περιέχει τις επιθυμητές πρωτεΐνες, όπως περιγράφηκε παραπάνω, προστίθενται τέσσερις όγκοι παγωμένη (-20C) ακετόνη. Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται για μία ώρα στους -20C. Κατόπιν, φυγοκεντρείται για 10' στις 15.000g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει, πριν επαναδιαλυθεί στο επιθυμητό μέσο και όγκο, για περαιτέρω ανάλυση με SDS-PAGE.

B. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

1. DH5A (ϕ 80dlacZΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA* 96, *thi* -1, *hsdR17* (rK-, mK+), *supE44*, *relA* 1, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*) U169, *phoA*)

Στέλεχος που χρησιμοποιείται για την διατήρηση πλασμιδίων. Επιτρέπει τον διαχωρισμό λευκών-κυανών αποικιών, από φορείς όπως ο pBluescript (Hanahan, 1983)

2. DH10B (F-, *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80lacZΔM15, Δ*lac* X74, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ(*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, λ-, *rpsL*(strr), *nupG*)

Όπως και τα DH5A, χρησιμοποιούνται για την διατήρηση πλασμιδίων. Δεν παρουσιάζουν ανασυνδυασμό, οπότε είναι καλύτερα για την διατήρηση ασταθών κατασκευών ή μεγάλων BAC's.

3. BL21 (F-, *ompT*, *hsdSB* (rB-, mB-), *dcm*, *gal*, λ(DE3), pLysS (Cmr))

Στέλεχος που χρησιμοποιείται για υπερέκφραση πρωτεϊνών, που το γονίδιο τους έχει κλωνοποιηθεί σε φορέα που φέρει υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης έχει εισαχθεί στο βακτηριακό χρωμόσωμα (Studier & Moffalt, 1986)

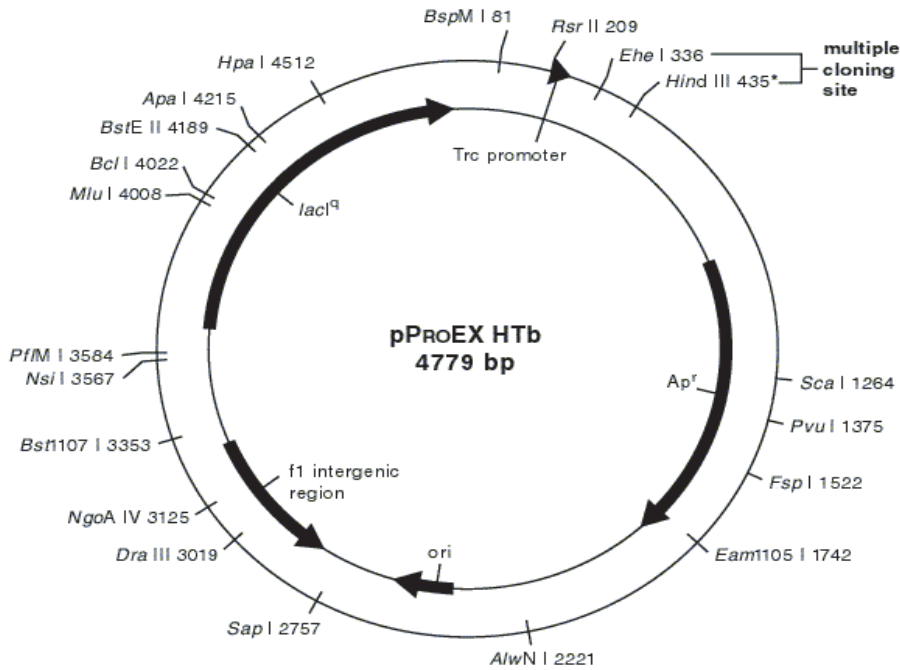
Γ. ΦΥΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα φυτικά δείγματα προέρχονται από φυτά ντομάτας, (*Lycopersicon esculentum* η *Solanum lycopersicum* cv. Rentita Τα δείγματα των μολυσμένων φυτών είχαν μολυνθεί με το ιοειδές PSTVd στέλεχος PSTVd KF440.2 και αναπτυχθηκαν στο θερμοκήπιο. Τα φυτά που αναφέρεται ότι εκτέθηκαν σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού (high light) είχαν υποβληθεί σε συνεχή φωτισμό $80\mu\text{mole}\cdot\text{m}^2/\text{s}$ ενώ τα φυτά που αναφέρεται ότι εκτέθηκαν σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού (low light), είχαν υποβληθεί σε συνεχή φωτισμό έντασης $10\mu\text{mole}\cdot\text{m}^2/\text{s}$. Τα φυτά σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού διατηρούνταν στους 21-23C ενώ τα φυτά σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού, στους

Δ. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

1. ProEX tC με γονίδιο της Virp2 και His-tag

Η συγκεκριμένη κατασκευή (Κ. Καραντεμίρης- Τσαγρή, 2008) είχε γίνει με ένθεση του γονιδίου της πρωτεΐνης και της έξα-ιστιδίνης (6-His-tag) η οποία είχε προστεθεί με PCR στον πολυσυνδέτη του φορέα με τα ένζυμα Not I και Sac I (Sst I).



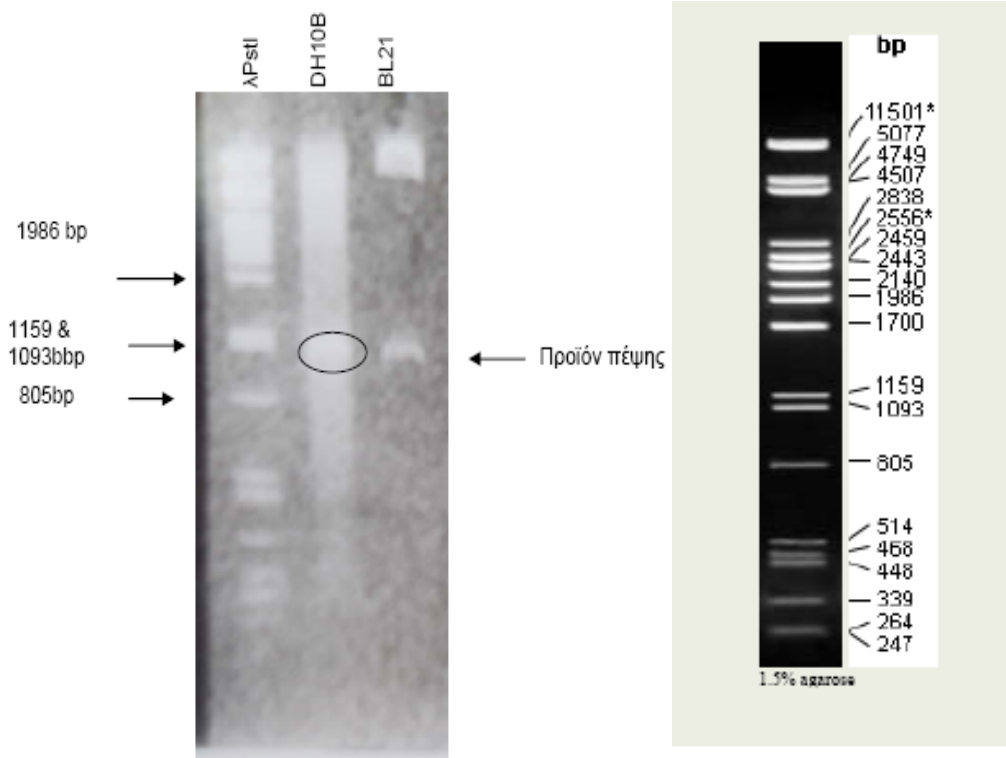
Εικόνα 5 Ο φορέας ProEx

Στον φορέα αυτόν, χρησιμοποιείται η E.coli DNA dep RNA polymerase για την επαγωγή του ενθεματος του γονιδίου, υπο τον E. coli trc υποκινητή



Εικόνα 6 Ο πολυσυνδέτης του φορέα ProEx

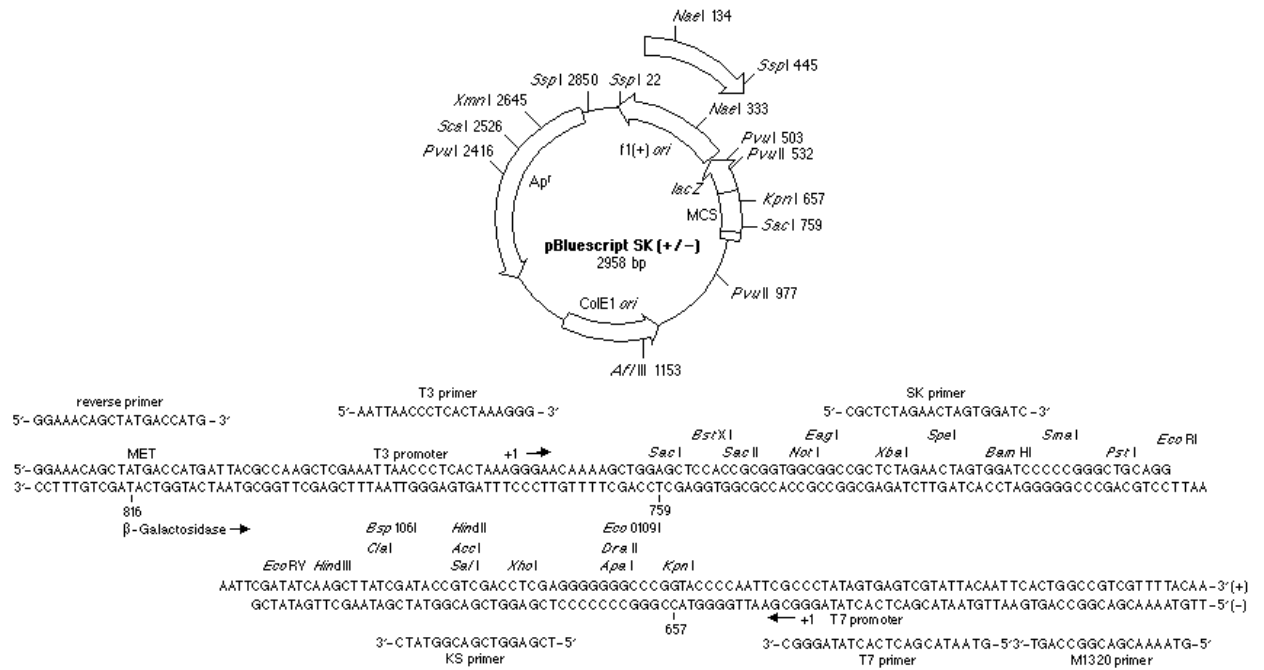
Για να επιβεβαιωθεί ότι το υπάρχον υλικό ήταν το σωστό, αρχικά μετασηματίστηκαν με αυτό βακτήρια τύπων BL21 και DH10B και μετά από mini-preps στις καλλιέργειές τους, έγιναν πέψεις με EcoRI και HindIII.



Εικόνα 7 Πηκτή αγαρόζης 1%. Από αριστερά: λ PstI, πλασμιδιακό DNA με ένθεμα του γονιδίου της Virp2 από κύτταρα DH10B μετά από πέψη με EcoRI και HindIII, πλασμιδιακό DNA με ένθεμα του γονιδίου της Virp2 από κύτταρα από κύτταρα BL21 μετά από πέψη με EcoRI και HindIII. Δεξιά, λ PstI. Η ζώνη από τις πέψεις εμφανίζεται λίγο κάτω από τις 1700 βάσεις

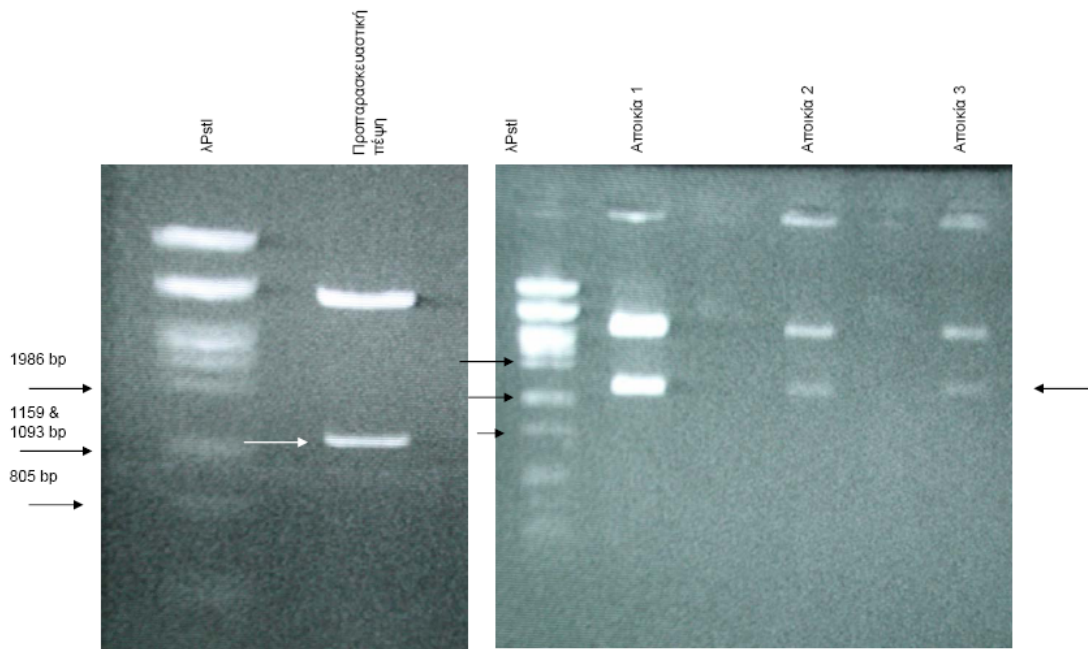
2. pBluescript SK γονίδιο της Virp2 και His-tag

Για να αλληλουχηθεί η υπάρχουσα αλληλουχία, υποκλωνοποιήθηκε σε pBluescript SK με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και EcoRI.



Εικόνα 8 Ο χάρτης του φορέα pBluescript SK και του πολυσυνδέτη του

Για αυτόν τον σκοπό, μετά από miniprep σε καλλιέργειες κυττάρων DH10B που έφεραν το επιθυμητό πλασμίδιο, έγιναν προπαρασκευαστικές πέψεις με τα δύο ένζυμα. Στην συνέχεια το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και καθαρίστηκαν από αυτό με εμπορικό κιτ (Macherey-Nagel). Η αντίδραση λιγοποίησης έγινε με ένζυμο της Promega χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα και τις υποδείξεις του προμηθευτή. Κατόπιν, το προϊόν της λιγοποίησης χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματιστούν κύτταρα DH10B. Από τις αποικίες που υπήρχαν στα τρυβλία, επιλέχτηκαν λευκές και με αυτές εμβολιάστηκαν καλλιέργειες, στις οποίες έγιναν εκ νέου minipreps και στο πλασμιδιακό DNA που ανακτήθηκε έγιναν πέψεις με τα ένζυμα και το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της λιγοποίησης.



Εικόνα 9 Αριστερά: Πηκτή αραρόζης 1%. λ PstI και προϊόν προπαρασκευαστικής πέψης με EcoRI και HindIII. Δεξιά: λ PstI και προϊόντα πέψης DNA διαφορετικών καλλιεργειών κυττάρων DH10B με ένθεμα το γονίδιο της Virp2 με EcoRI και HindIII. Η ζώνες εμφανίζονται στο σωστό ύψος.

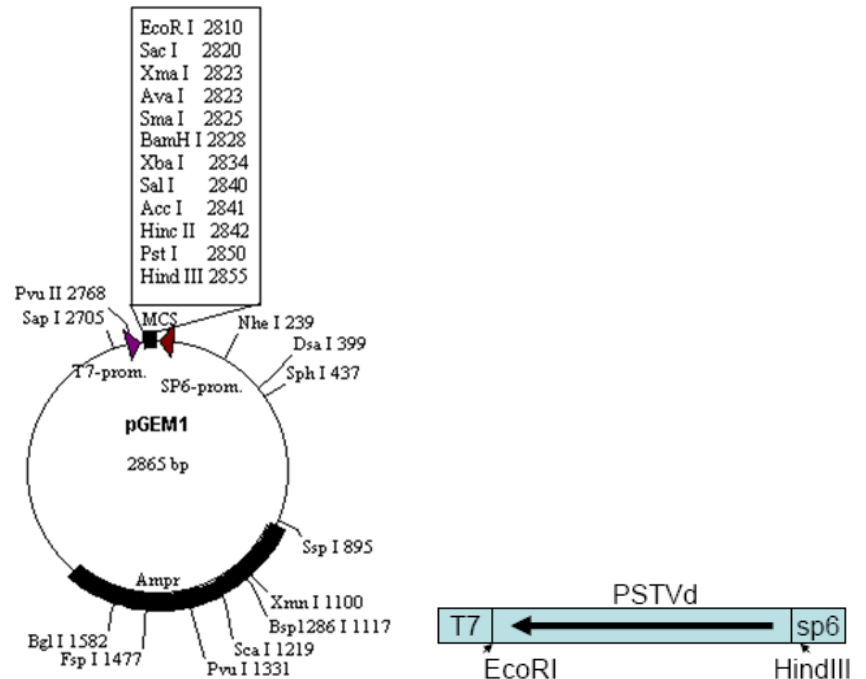
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα.

3. pSP62-PL με 2,2 και 2,8 αντίγραφα του PSTVd αντίστοιχα (Tabler & Saenger, 1985)

Στα πλαίσια μελέτης για την μολυσματικότητα ολιγομερών του PSTVd είχε δημιουργηθεί μία σειρά πλασμιδίων, χρησιμοποιώντας τον φορέα SP62, στα οποία είχαν υποκλωνοποιηθεί προοδευτικά μεγαλύτερες κατασκευές ολιγομερών του PSTVd. Με εκμαγείο εκείνα τα πλασμίδια κομμένα με SalI και χρησιμοποιώντας την RNA πολυμεράση Sp6 δημιουργήθηκαν μετάγραφα 2,2 αντιγράφων του ιοειδούς με αρνητική και 2,8 αντιγράφων του ιοειδούς με θετική πολικότητα του RNA.

4. Πλασμίδιο PH 106 με το PSTVd

Για τις ανάγκες μιας *in vitro* μελέτης της μεταγραφής του PSTVd (Tsagris, Tabler Saenger, 1991) είχε υποκλωνοποιηθεί στον φορέα pGem το ιοειδές, ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού των ενζύμων EcoRI και HindIII.



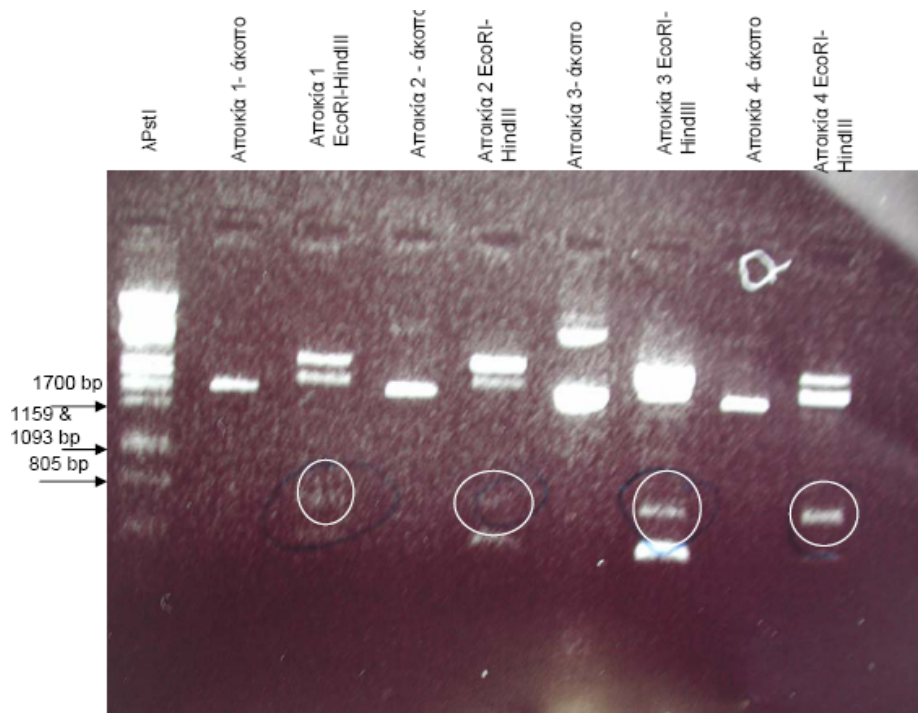
Εικόνα 10 Χάρτης του φορέα pGem και του πολυσυνδέτη του, καθώς και ο προσανατολισμός του ενθέματος ως προς τους υποκινητές

Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο pH106 που είχε γίνει γραμμικό με το ένζυμο EcoRI και μεταγράφοντας με την RNA πολυμεράση Sp6 παράγεται αντίγραφο του PSTVd θετικής πολικότητας, ενώ με το ίδιο εκμαγείο, κομμένο με HindIII και την RNA πολυμεράση T7 παράγεται αντίγραφο αρνητικής πολικότητας. Ακόμα, αυτό το πλασμίδιο, κομμένο με EcoRI/HindIII χρησιμοποιούταν ως εκμαγείο για την παραγωγή ανιχνευτή DNA PSTVd.

5. pBluescript SK με το PSTVd

Χρησιμοποιήθηκε pBluescript SK που είχε ήδη κοπεί και καθαριστεί για την παρασκευή του πλασμιδίου (2). Σε υλικό από το πλασμίδιο (4) έγινε προπαρασκευαστική πέψη με EcoRI και HindIII και το υλικό ηλεκτροφορήθηκε σε αгарόζη 1% και καθαρίστηκε με το κιτ της Macherey & Nagel. Η λιγοποίηση έγινε με αναλογία φορέα : ένθεμα 5:1. το προϊόν χρησιμοποιήθηκε για να μετασηματιστούν επιδεικτικά κύτταρα DH10B. Οι λευκές αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για να εμβολιαστούν υγρές καλλιέργειες από τις οποίες απομονώθηκε πλασμίδιο με miniprep. Σε αυτό το υλικό έγινε πέψη με EcoRI και HindIII.

Καθώς οι ζώνες δεν φαίνονταν πολύ καθαρά, έγινε άλλος ένας κύκλος μετασχηματισμού και καθαρισμού πλασμιδίων. Αυτή την φορά, η εικόνα ήταν πιο καθαρή.



Εικόνα 11 Πηκτή αгарόζης 1%. Από αριστερά: λPstI, και ακολούθως το πλασμιδιακό DNA με ένθεμα το PSTVd από τέσσερις αποικίες που επιλέχθηκαν, πρώτα άκοπο και στην συνέχεια κομμένο με EcoRI και HindIII. Το ένθεμα φαίνεται λίγο κάτω από τις 800 βάσεις, αν και πιο κάτω εμφανίζεται μία επιπλέον ζώνη.

Η μολυσματικότητα του κλώνου ελέγχθηκε, παράγοντας μετάγραφα του PSTVd θετικής πολικότητας, κόβοντας τον κλώνο με EcoRI και μεταγράφοντας τον με T7 RNA πολυμεράση. Από τα 8 φυτά που μολύνθηκαν, μόνο δύο έδειξαν μόλυνση σε ανάλυση κατά Northern. (Vogiatzaki, 2011). Αυτό, σε συνδυασμό με τις δύο ζώνες που εμφανίζονται στην πηκτή αгарόζης υποδεικνύει ότι ίσως η κλωνοποίηση να μην ήταν επιτυχής, ή το ένθεμα να μην ήταν το σωστό.



Εικόνα 12 Αυτοραδιογραφία σε μεμβράνη ανάλυσης κατά Northern σε φυτά τομάτας μολυσμένα με θετικής πολικότητας μετάγραφο του PSTVd που παράχθηκε από τον κλώνο με ένθεμα του ιοειδούς σε pBluescript SK. Έκθεση 7 ημέρες. Από πάνω προς τα κάτω, διαδοχικά, τα εκχυλίσματα TEMS- φαινόλης 8 διαφορετικών φυτών, 15 ημέρες μετά την μόλυνση. Μόνα τα φυτά 3 και 5 δείχνουν να έχουν μολυνθεί.

E. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Φυγόκεντροι: Eppendorf 5417C (ακτίνα 6 cm, για δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5ml και 2ml)

Techne Genofuge 16M (ακτίνα 5cm, για δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5ml)

Eppendorf 5410 (ακτίνα 5cm, για δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5ml, χρησιμοποιούταν αποκλειστικά για ραδιενεργά παρασκευάσματα)

Eppendorf 5810 (ψυχόμενη, για δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 και 50 ml)

Kubota RS-720 Swinging bucket rotor (ακτίνα 16cm, για δοκιμαστικούς σωλήνες 15 ml, ψυχόμενη)

Heaus seratech Biofuge 15R (ακτίνα 5cm, για δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5ml, ψυχόμενη)

Υδατόλουτρα: Lauda A100

Επωαστήρες: Forma Scientific, Orbital Shaker

Μετρητές ραδιενέργειας: Beckman LS 1701 Scintillation counter

Αναδευτήρες: Janke & Kunkel, IKA Labortechnik

Heidolph 54113

Agitateur Magnetique chauffort 94361, Bioblock Scientific

Celloshaker, Renner GBMH D-67125 Dannstadt

Φούρνος Υβριδοποίησης: Shel Lab 1004

Συσκευή υπεριώδους φωτός για φωτογράφιση πηκτής αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο: Herolab UV T-28MP

Συσκευή υπεριώδους φωτός για μονιμοποίηση μακρομορίων σε μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης: UV Stratalinker 1800, Stratagene

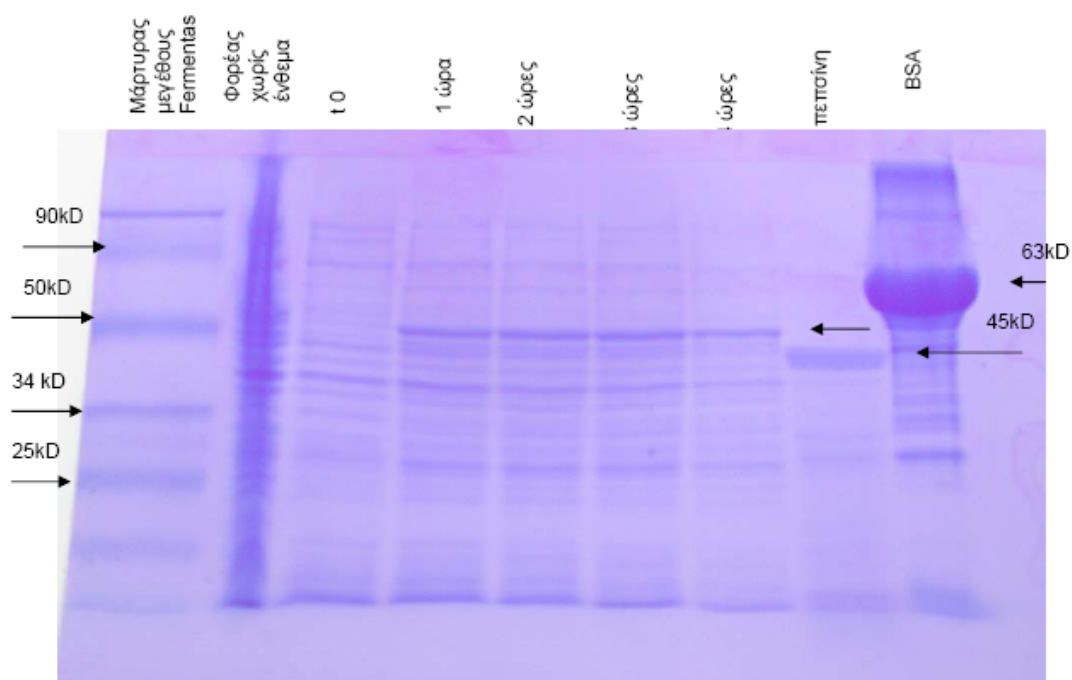
Αντλία κενού και φυγόκεντρος υπό κενό: UniEquip, Unijet refrigerated aspirator

UniEquip, Univapo100H, (ακτίνα 12cm)

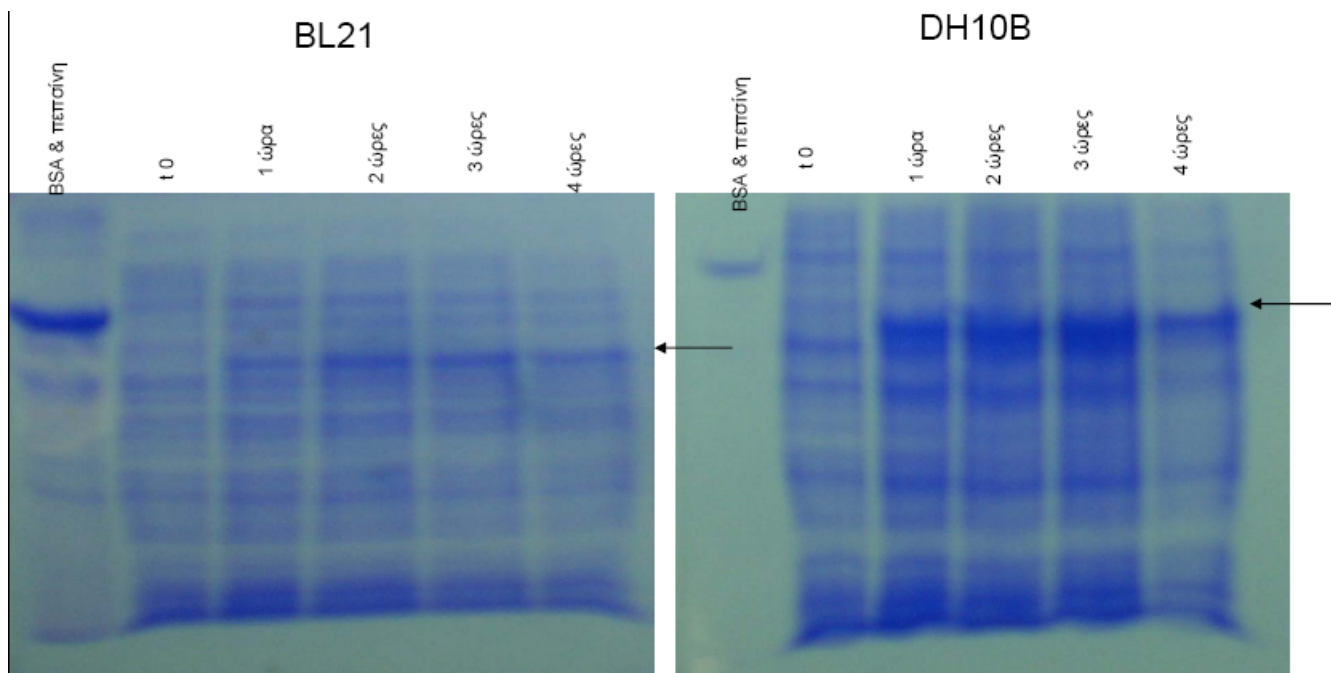
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης της τομάτας Virp2 σε RNA

Πρώτο μέλημα, από την στιγμή που είχε επιβεβαιωθεί ότι το κομμάτι DNA που ήταν κλωνοποιημένο στον ProExC ήταν σωστό, ήταν να γίνει υπερκένωση της Virp2. Για τον σκοπό αυτό μετασχηματίστηκαν με το κατάλληλο πλασμίδιο επιδεικτικά κύτταρα τύπου BL21 αλλά και DH10B. Η επαγωγή της υπερκένωσης του γονιδίου έγινε με IPTG, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο πρωτόκολλο.



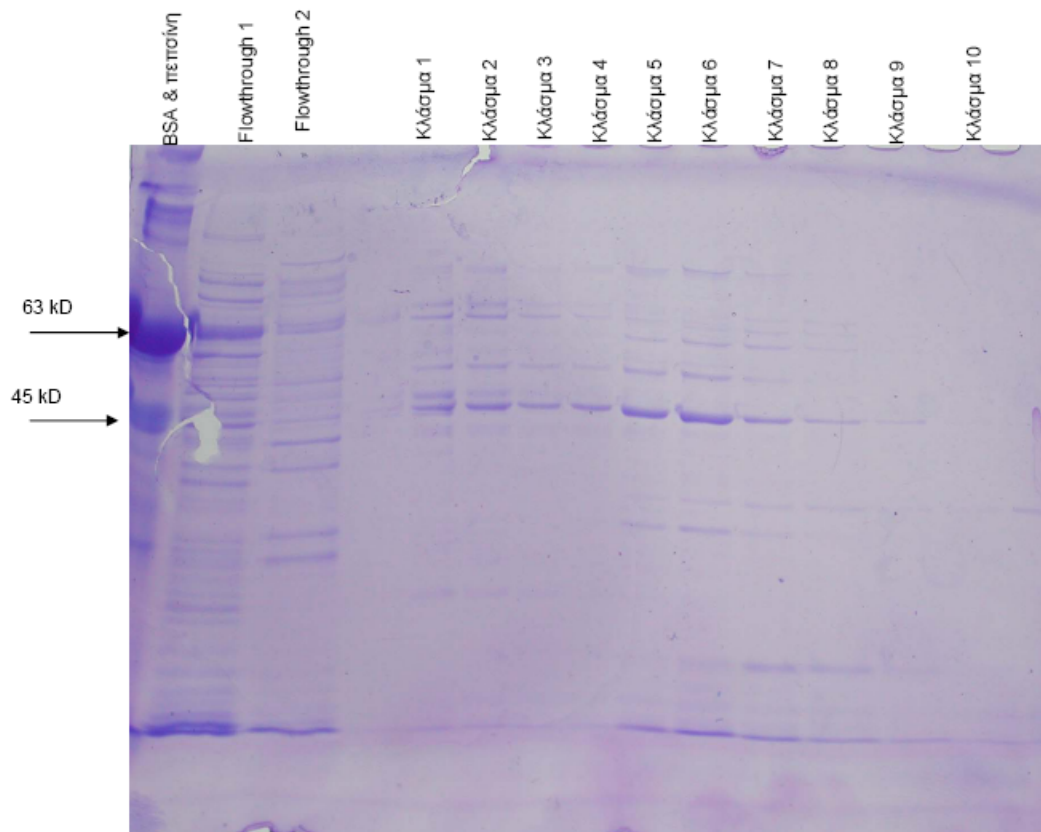
Εικόνα 13 SDS-PAGE 10%. Από αριστερά: Μάρτυρας μοριακού βάρους Fermentas, Κύτταρα με φορέα χωρίς ένθεμα, Κύτταρα χωρίς επαγωγή, κύτταρα 1 ώρα μετά την επαγωγή, κύτταρα δύο ώρες μετά την επαγωγή, κύτταρα 3 ώρες μετά την επαγωγή, κύτταρα τέσσερις ώρες μετά την επαγωγή, πεψίνη, BSA



Εικόνα 14 SDS-PAGE 10% BSA-πεψίνη, t=0, 1 ώρα από επαγωγή, 2 ώρες, 3 ώρες, 4 ώρες. Στην πηκτή αριστερά είναι κύτταρα BL21, στα δεξιά κύτταρα DH10B

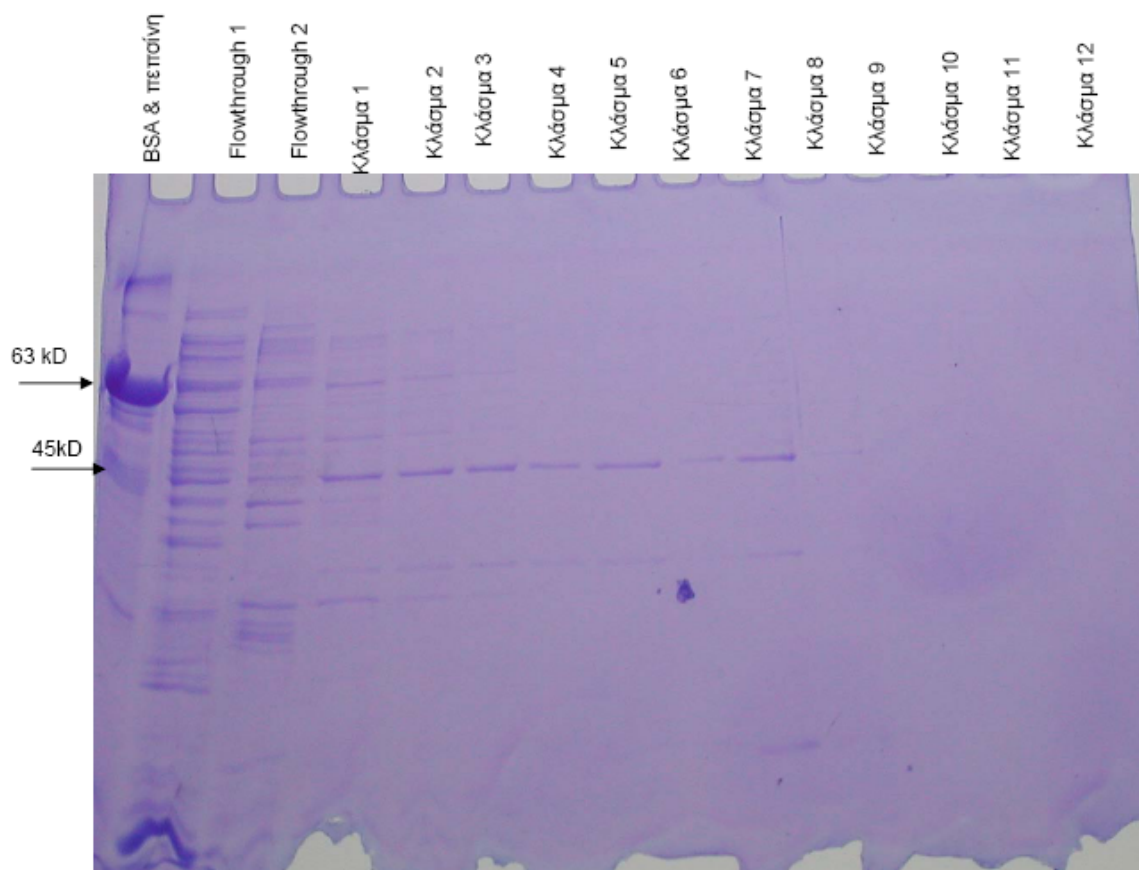
Αποφασίστηκε ότι ήταν προτιμότερο οι υπόλοιποι χειρισμοί να γίνουν με κύτταρα του στελέχους DH10B καθώς τα BL21 ήταν αποτελεσματικότερα στο να δίνουν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης ανά κύτταρο, όμως ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων DH10B ήταν τόσο ταχύτερος που αναπλήρωναν αυτό το μειονέκτημα και με το παραπάνω.

Επόμενο σκέλος ήταν ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με την στήλη NTA-αγαρόζης, εμπλουτισμένης με ιόντα νικελίου. Αρχικά, δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί ιμιδαζόλη για την έκλυση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 15 SDS-PAGE 10%. Από αροστερά: BSA-πεπσίνη, flowthrough1, flowthrough2, κλάσματα 1-4 με 10mM ιμιδαζόλης, κλάσματα 5-8 με 50 mM ιμιδαζόλης, κλάσματα 9-12 με 100mM ιμιδαζόλης. Η πρωτεΐνη δεν είναι καθαρή και κατεβαίνει σε χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζόλης.

Ο εμπλουτισμός της πρωτεΐνης ήταν επιτυχής, αλλά υπήρχαν ακόμα αρκετές προσμίξεις. Ακόμα, το γεγονός ότι όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης εκλουόταν στις χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζόλης υποδεικνυε ότι η αλληλεπίδρασή της με την στήλη NTA-αγαρόζης-νικελίου ήταν ασθενής. Για αυτούς τους λόγους δοκιμάστηκε και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί χαμηλό pH για την έκλουση της πρωτεΐνης.

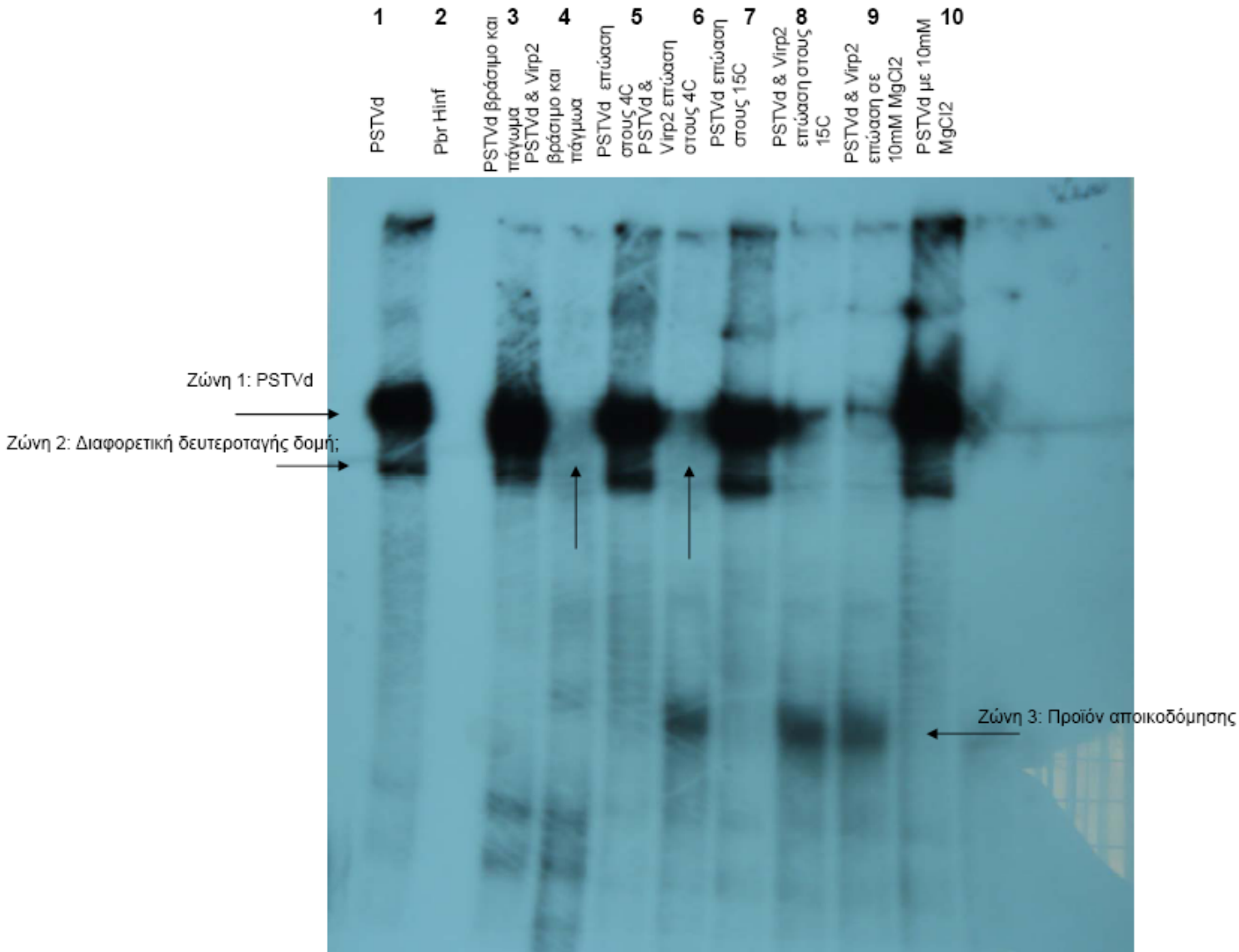


Εικόνα 16 SDS-PAGE 10%. Από αριστερά: BSA-πεψίνη, flowthrough 1, flowthrough 6, κλάσματα 1-6 pH 5.5, κλάσματα 7-12 pH 4.0. Η πρωτεΐνη φαίνεται να είναι πιο καθαρή. Το πρώτο κλάσμα του pH 4.0 έχει ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης και λίγες προσμίξεις

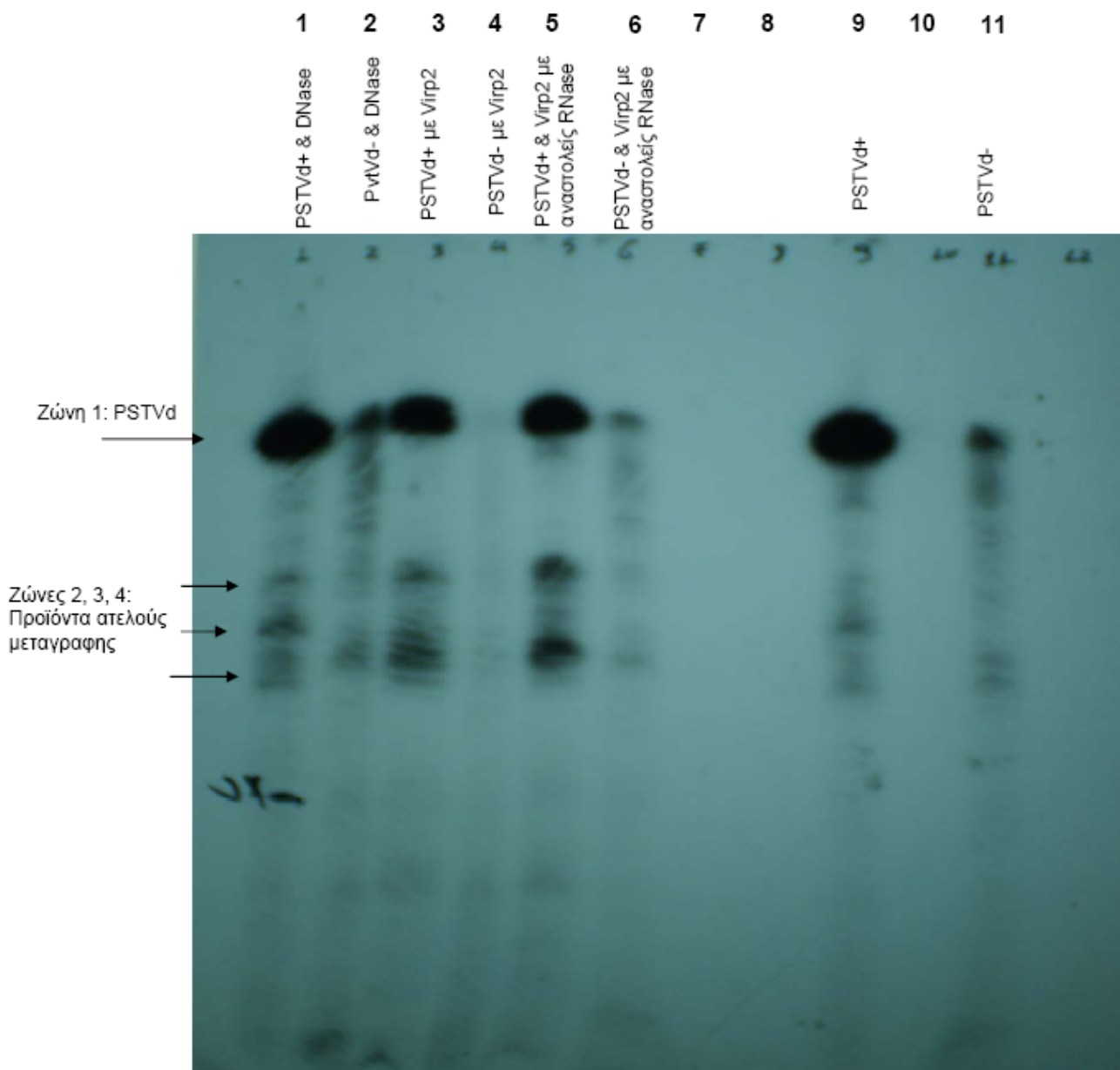
Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που καθαρίζονταν με αυτή την μέθοδο ήταν χαμηλότερες, όμως υπήρχαν λιγότερες προσμίξεις. Για να μην αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες στο όξινο περιβάλλον, αμέσως μετά την απομόνωση ακολουθούσε πρωτόκολλο διαπίδυσης.

Η αρχική σκέψη ήταν ότι, από την στιγμή που η ιμιδαζόλη δρα ανταγωνιστικά συγκεκριμένα για την πολύ-ιστιδίνη που προσδένεται στα ιόντα νικελίου, και οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης ήταν υψηλότερες με αυτό το πρωτόκολλο, ίσως θα ήταν καλύτερα για αρχή να χρησιμοποιηθούν για τα *in vitro* πειράματα αλληλεπίδρασης της Virp2 με το PSTVd παρασκευάσματα πρωτεΐνης απομονωμένα με ιμιδαζόλη. Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων, που έγιναν με μετάγραφα (406nt) σημασμένα ραδιενεργά με αντίδραση κινάσης, θα αξιολογούταν η σημασία των προσμίξεων και θα καθοριζόταν να τελικά θα χρησιμοποιούταν στο εξής το πρωτόκολλο της ιμιδαζόλης ή του όξινου pH για τον καθαρισμό της

πρωτεΐνης. Όλες οι αυτοραδιογραφίες εκτέθηκαν για 14-18 ώρες (overnight) εκτός αν διευκρινίζεται κάτι διαφορετικό κατά περίπτωση.



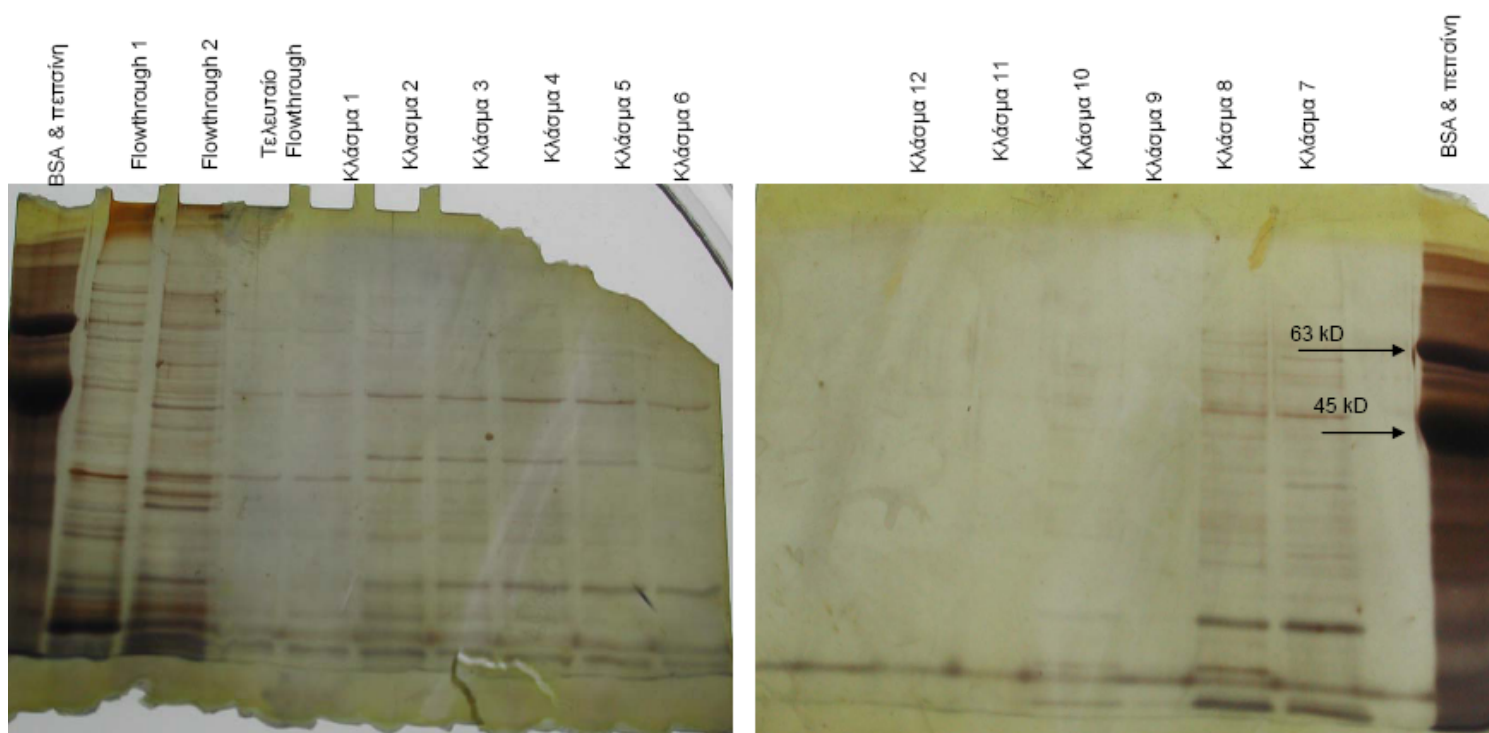
Εικόνα 17 Αυτοραδιογραφία μετά από EMSA 6% με θετικής πολικότητας μετάγραφο του PSTVd σημασμένο με αντίδραση κινάσης. Από αριστερά: RNA, PBR 322 Hinf, RNA βράσιμο & πάγωμα, RNA με Virp2 βράσιμο & πάγωμα, RNA επώαση στους 4C, RNA με Virp2 επώαση στους 4C, RNA επώαση στους 15C, RNA με Virp2 επώαση στους 15C, RNA με Virp2 και 10mM MgCl2, RNA με 10mM MgCl2, RNA με Virp2. Στα δείγματα όπου προστέθηκε παρασκεύασμα Virp2 η ζώνη 1 χάνεται κι εμφανίζεται μια άλλη ζώνη, μικρότερου μοριακού βάρους. Πιθανότατα πρόκειται για προϊόν αποικοδόμησης.



Εικόνα 18 Αποδιατακτικό τζελ 8M ουρίας, 5% ακρυλαμίδης. Από αριστερά: Μετάγραφο PSTVd+ με αναστολείς RNase, μετάγραφο PSTVd+ με DNase, Μετάγραφο PSTVd+ με Virp2 (αναλογία 4:1), Μετάγραφο PSTVd+ με Virp2 αραιωμένη 1/10, Μετάγραφο PSTVd+ με Virp2 αραιωμένη 1/400, Μετάγραφο PSTVd+ με Virp2 αραιωμένη 1/2, Μετάγραφο PSTVd-, Μετάγραφο PSTVd- με Virp2

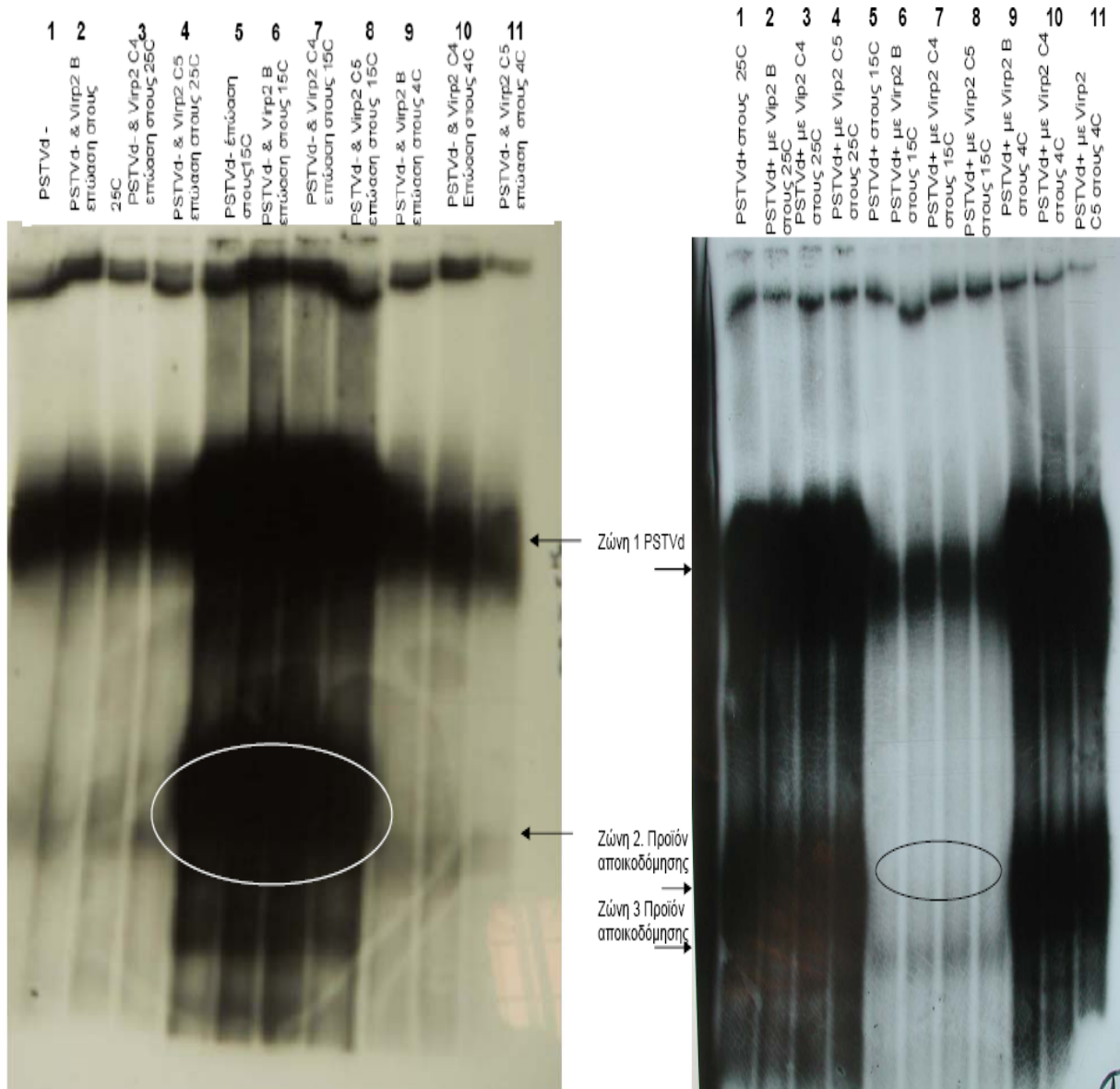
Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, ήταν εμφανές ότι οι προσμίξεις περιείχαν κάποια πρωτεΐνη που κατέστρεφε το RNA ανεξάρτητα από την θερμοκρασία, ή την παρουσία αναστολέων RNασών, ακόμα και αν το δείγμα βραζόταν, οπότε και θεωρητικά οι RNάσες θα αποδιατάσσονταν. Επομένως, στα επόμενα πειράματα, τα οποία έγιναν με προϊόντα ραδιενεργούς μεταγραφής (406 nt), θα έπρεπε να

χρησιμοποιηθούν κλάσματα πρωτεϊνών με έμφαση στην καθαρότητα. Όλα τα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στο εξής έχουν καθαριστεί με το πρωτόκολλο του χαμηλού pH.



Εικόνα 19 SDS-PAGE 10% με χρώση νιτρικού αργύρου. Καθαρισμός πρωτεϊνών με πρωτόκολλο χαμηλού pH από κύτταρα DH10B. Αριστερά, από αριστερά: BSA-πεψίνη, 1-4 flowthrough, κλάσματα 1-5 pH 5.5. Δεξιά, από δεξιά: BSA-πεψίνη, κλάσμα 6 pH 5.5, κλάσματα 7-12, pH 4.0.

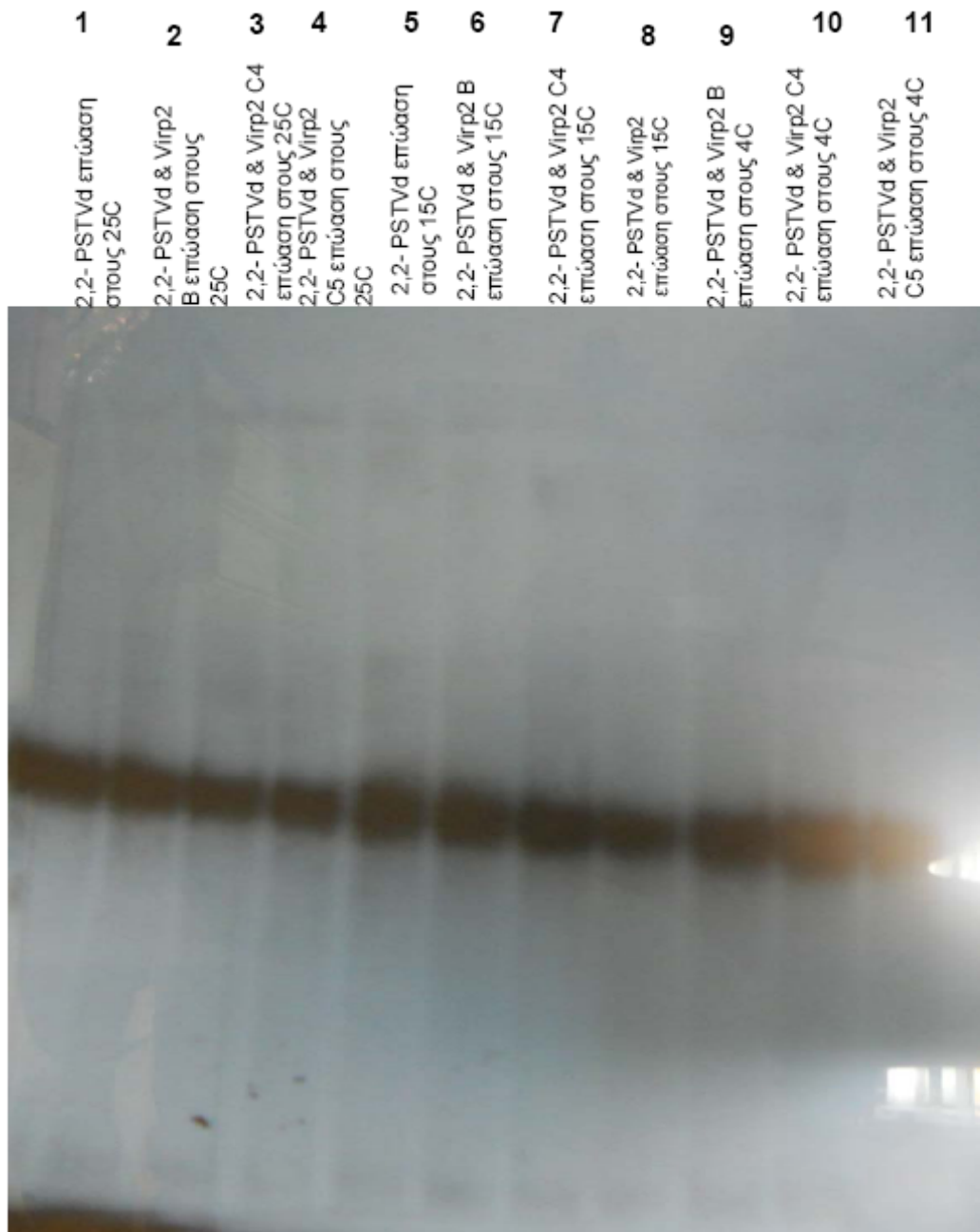
Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης ήταν αρκετά αποτελεσματικός, αφού προσμίξεις φαίνονταν μόνο με την χρώση του νιτρικού αργύρου. Για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκαν τα κλάσματα που εκτός της επιθυμητής, έδειχναν ζώνες σε μικρότερα μοριακά βάρη, οι οποίες πιθανόν να ήταν απλά προϊόντα αποικοδόμησης της Virp2.



Εικόνα 20 Αριστερά: Αυτοραδιογραφία μετά από EMSA 6% με μετάγραφο αρνητικής πολικότητας του PSTVd. Από αριστερά προς δεξιά, RNA, και διαδοχικά σε τριάδες, RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης στους 25C, 15C, 4C. Δεξιά: Αυτοραδιογραφία μετά από EMSA 6% με μετάγραφο θετικής πολικότητας του PSTVd. Από αριστερά προς δεξιά, RNA, και διαδοχικά σε τριάδες, RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης στους 25C, 15C, 4C. Και τα δύο μετάγραφα προέρχονται από το πλασμίδιο PH106 και έχουν μήκος 406 νουκλεοτιδία.



Εικόνα 21 Αυτοραδιογραφία μετά από EMSA 3,5% με ραδιενεργό μετάγραφο, ολιγομερές, 2,8 αντίτυπα του PSTVd θετικής πολικότητας. Από αριστερά: Επώαση στους 25C: RNA, RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης. Επώαση στους 15C: RNA, RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης. Επώαση στους 4C: RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης. Υπάρχει καθολικά και μια δεύτερη ζώνη, πιθανόν προϊόν ατελούς μεταγραφής, ή αποικοδόμησης του μεταγράφου πριν την EMSA.



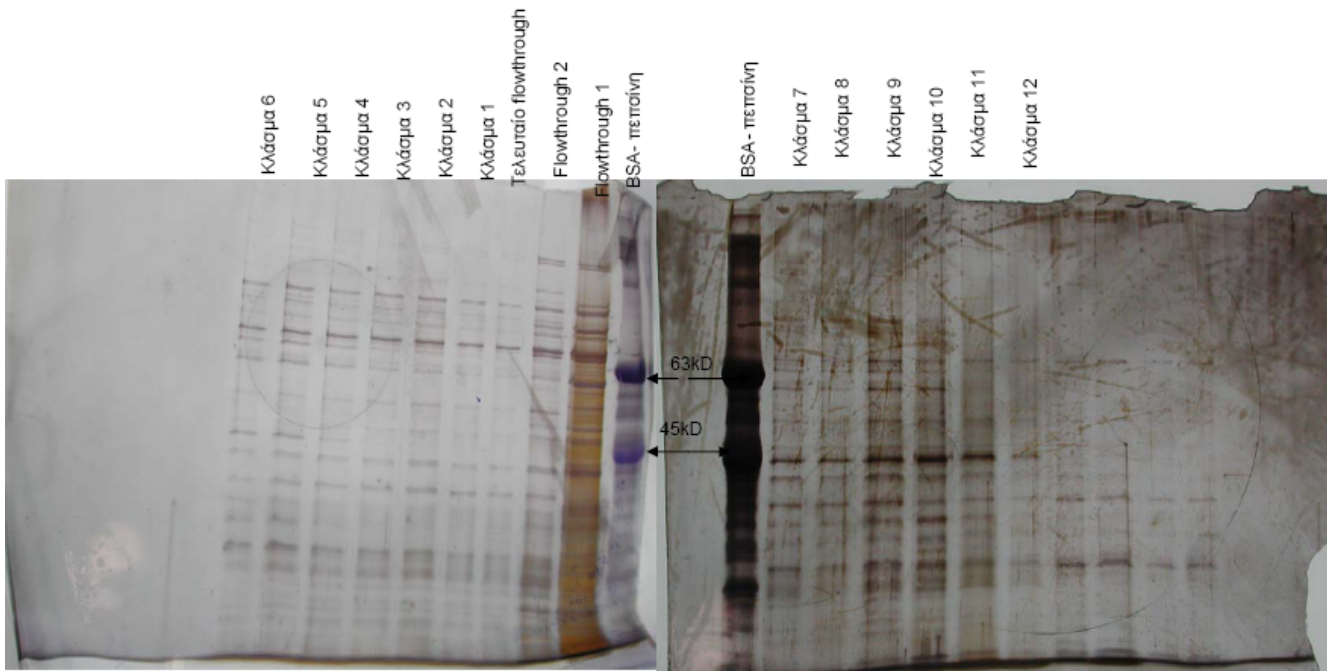
Εικόνα 22 Αυτοραδιογραφία από EMSA 3,5% με ραδιενεργό μετάγραφο ολιγομερές 2,2 αντίγραφα του PSTVd με αρνητική πολικότητα. Από αριστερά: Επώαση στους 25C: RNA, RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης. Επώαση στους 15C: RNA, RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης. Επώαση στους 4C: RNA με τρία διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης.

Στα πειράματα της εικόνας 20 δεν παρουσιάζεται πια πρόβλημα ολοκληρωτικής αποικοδόμησης του RNA, αλλά στο αρνητικής πολικότητας μετάγραφο, υπάρχει μία ζώνη, πιθανότατα από προϊόντα αποικοδόμησης, η οποία είναι πολύ πιο έντονη στα δείγματα που επώαστηκαν στους 15C. Από την άλλη, προϊόντα αποικοδόμησης του θετικού μεταγράφου είναι πιο έντονα στους 4C και στους 25C, ενώ μία ζώνη φαίνεται να μην υπάρχει καθόλου στους 15C. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδιαφέρον, εάν επιβεβαιωθεί, γιατί υποδεικνύει ότι η

διαμόρφωση του RNA διαφέρει στις διαφορετικές συνθήκες, και οδηγεί ίσως σε συγκεκριμένη αυτοκαταλυτική αποδόμηση. Δεν διακρίνεται όμως και το δεύτερο προϊόν της αποικοδόμησης, εάν προκειται για αυτοκαταλυτική διαδικασία. Πρέπει να σημειωθεί, ότι σε παλαιότερες μελέτες, δεν είχε παρατηρηθεί τέτοιο προϊόν σε παρόμοιες συνθήκες, (Tabler and Saenger 1985, Tabler, PhD thesis 1986)

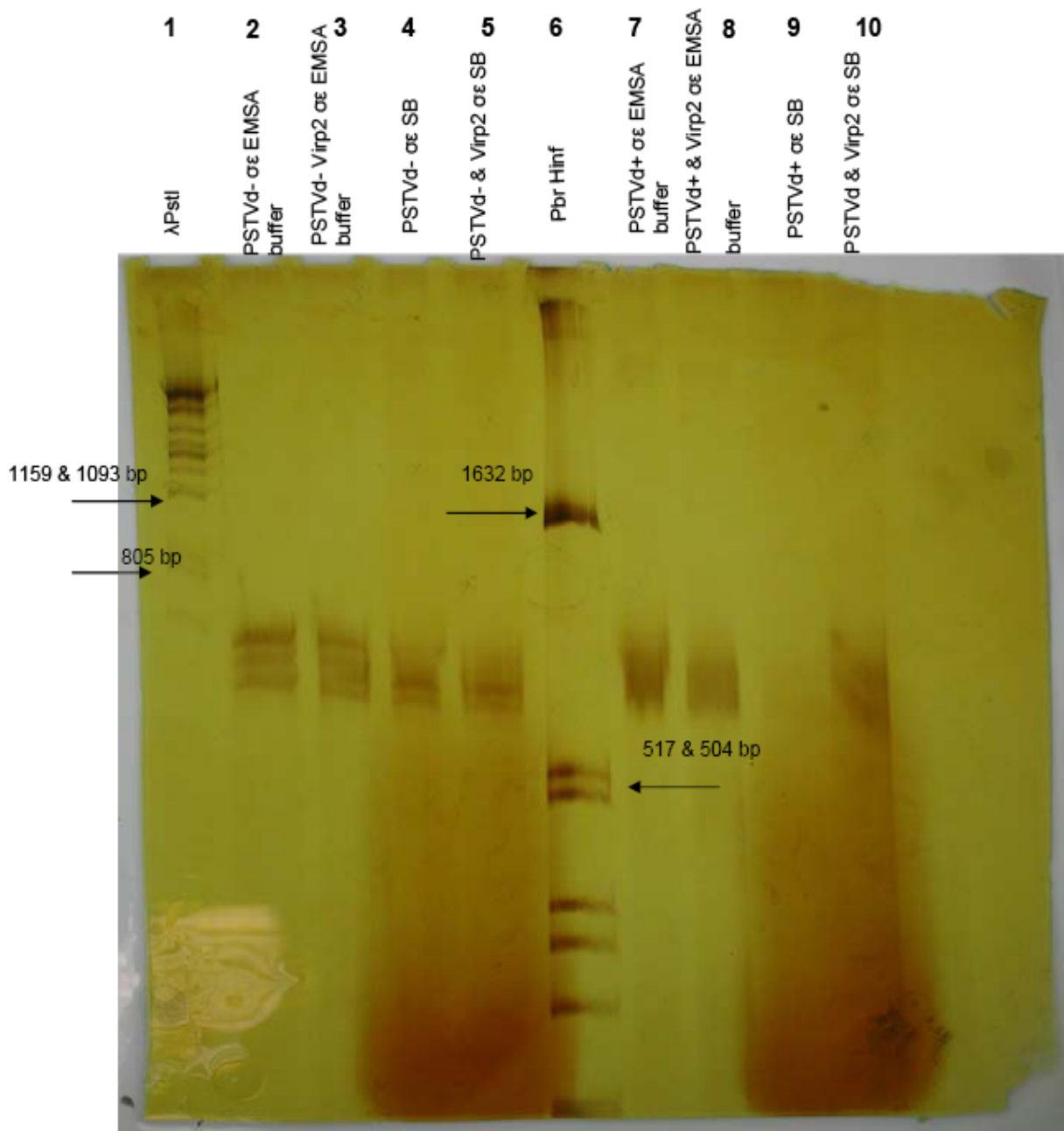
Επίσης στην εικόνα 20, λείπει ο έλεγχος του μεταγράφου χωρίς καμία επώαση. Στις εικόνες 21 και 22, γίνεται η επώαση σε ίδιες συνθήκες μεταγράφων θετικής και αρνητικής πολικότητας. Εδώ παρατηρείται ζώνη συγκεκριμένης αποικοδόμησης μόνο στο θετικής πολικότητας προϊόν, αλλά σε όλες τις συνθήκες θερμοκρασίας. Και εδώ λείπει ο έλεγχος του μεταγράφου χωρίς επώαση, και η δεύτερη ζώνη αυτοκαταλυτικής αποικοδόμησης, εάν πρόκειται για τέτοια. Σε κάθε περίπτωση, δεν διαφαίνεται σε καμία συνθήκη πρόσδεση στην πρωτεΐνη, αλλά η δομή του RNA φαίνεται να επηρεάζεται και από το μήκος, και από τις συνθήκες θερμοκρασίας.

Καθώς τα αρχικά πειράματα δεν είχαν δείξει μετατόπιση σε κάποια ζώνη, που θα υποδείκνυε πρόσδεση της πρωτεΐνης στο RNA, επόμενο βήμα ήταν να δοκιμαστούν διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα για την αντίδραση πρόσδεσης. Για αρχή, έγινε πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mM, 2,5mM, 100mM) EDTA. Ο χρόνος της αντίδρασης παρέμεινε ο ίδιος, ενώ, όλες οι αντιδράσεις έγιναν στους 25C. Δεν εμφανίστηκε καμία μετατόπιση ζώνης, ενώ και τα μετάγραφα έδειχναν αρκετά κατακερματισμένα ή αποικοδομημένα. Τέλος, ερευνήθηκε αν ο τρόπος διατήρησης της πρωτεΐνης, στους -80C μπορεί να επηρέαζε κάπως την διαμόρφωσή της, μειώνοντας την ικανότητά της να προσδένει νουκλεϊκά οξέα. Για αρχή, καθαρίστηκε εκ νέου πρωτεΐνη σε στήλη NTA-αγαρόζης εμπλουτισμένης με νικέλιο.



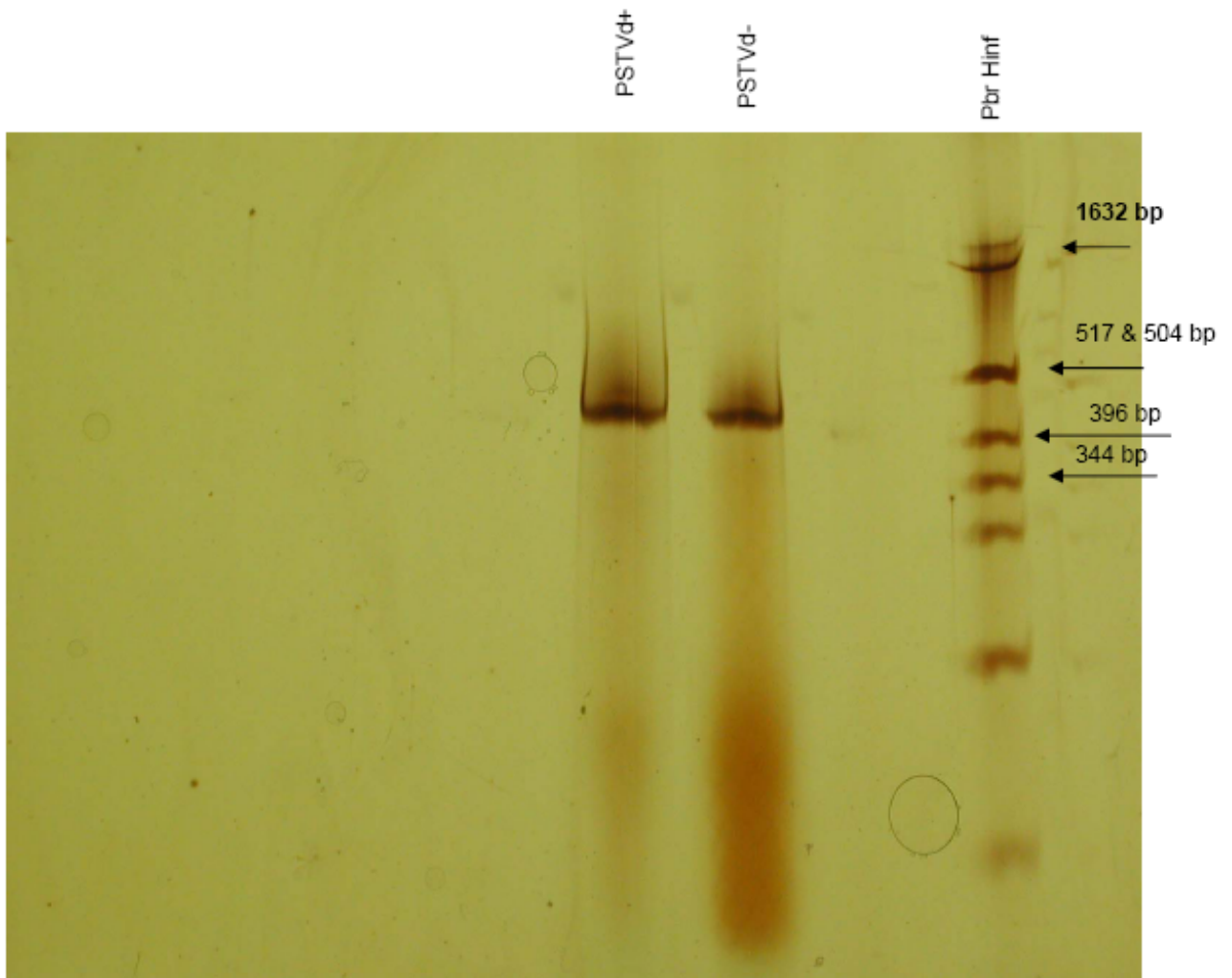
Εικόνα 23 SDS-PAGE 10%, βαμμένη με χρώση νιτρικού αργύρου. Αριστερά, από δεξιά: BSA-οβαλβουμίνη, flowthrough 1, flowthrough 5, flowthrough 6, κλάσματα 1-6, pH 5.5. Δεξιά, από αριστερά: BSA-οβαλβουμίνη, κλάσματα 7-12, pH 4.0

Τα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα υπέστησαν διαπίδυση και διατηρήθηκαν στους 4C. Λόγω έλλειψης ραδιενεργού UTP τα ακόλουθα πειράματα έγιναν με μη σημασμένα μετάγραφα του PSTVd, προϊόντα μεταγραφής του ph106 με μήκος 406 νουκλεοτίδια, και μετά την EMSA τα πηκτώματα, αντί να χρησιμοποιηθούν για αυτοραδιογραφία, βάφονταν με νιτρικό άργυρο.

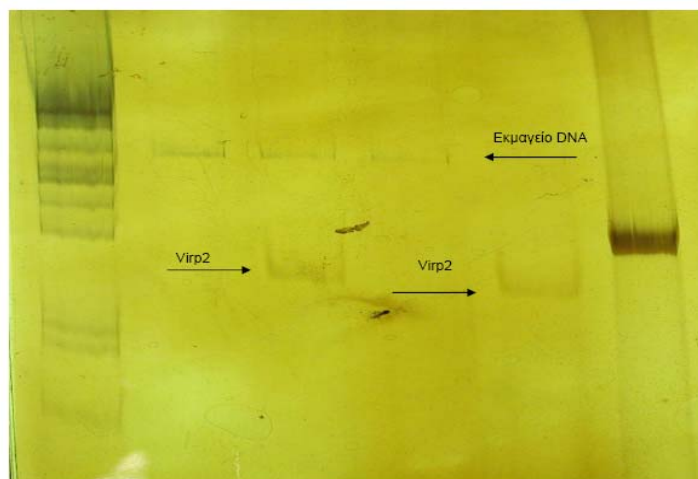
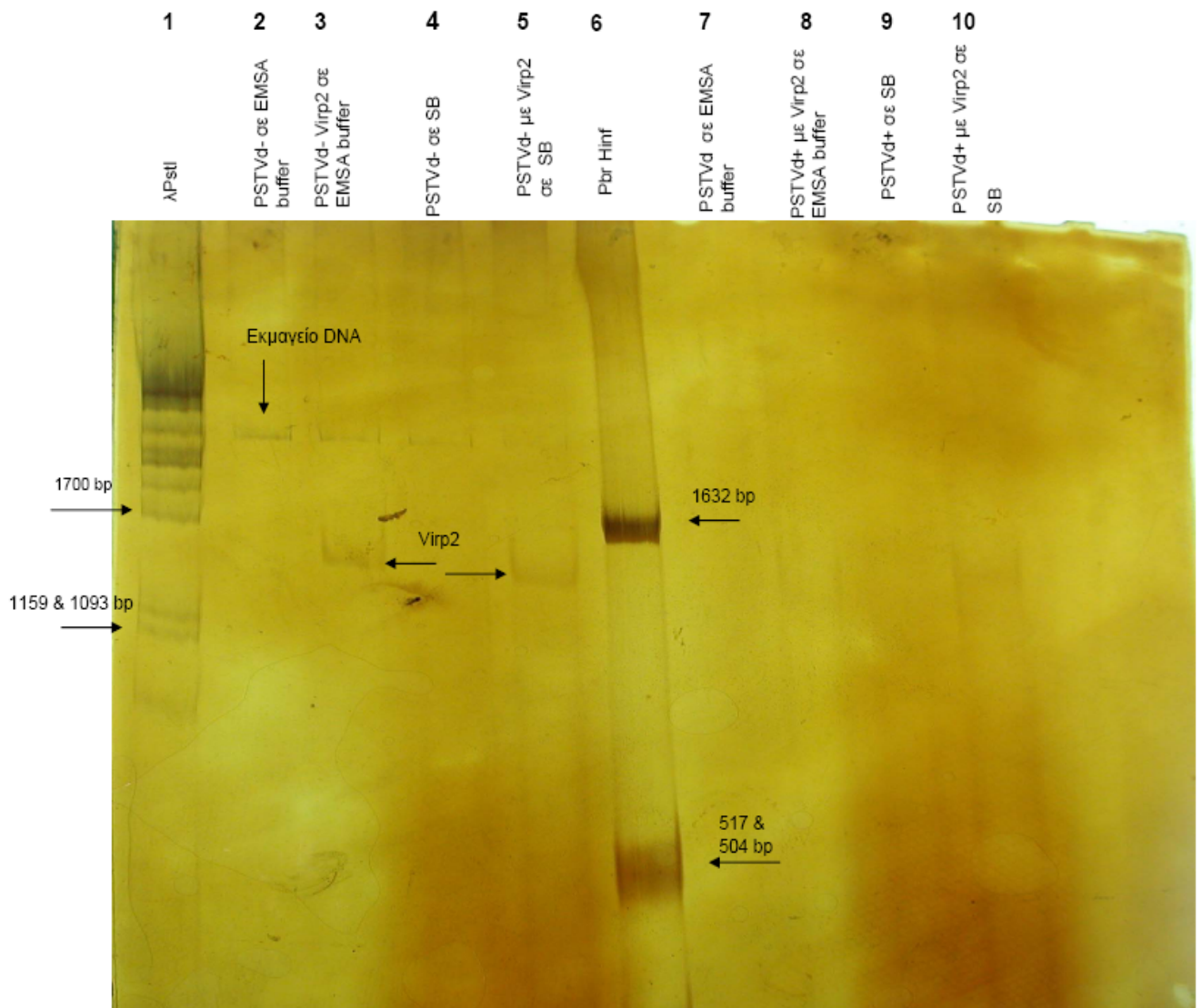


Εικόνα 24 EMSA 5%, με χρώση νιτρικού αργύρου. Από αριστερά: λ PstI, μετάγραφο PSTVd αρνητικής πολικότητας: σε EMSA binding buffer, πρώτα χωρίς και μετά με Virp2, σε SB πρώτα χωρίς και μετά με Virp2. PBR 322 Hinf, μετάγραφο PSTVd θετικής πολικότητας: σε EMSA binding buffer, πρώτα χωρίς και μετά με Virp2, σε SB πρώτα χωρίς και μετά με Virp2.

Μάλλον το πιο ενδιαφέρον στοιχείο από αυτό το πείραμα, ήταν οι πολλαπλές ζώνες που εμφανίζονται στο αρνητικής πολικότητας μετάγραφο, που πιθανότατα μαρτυρούν μόρια RNA με την ίδια αλληλουχία, όμως διαφορετική δευτεροταγή και τριτοταγή δομή. Αυτές οι διαφορές δεν εμφανίζονται σε αποδιατακτικά τζελ ακρυλαμίδης-ουρίας (εικ. 25).



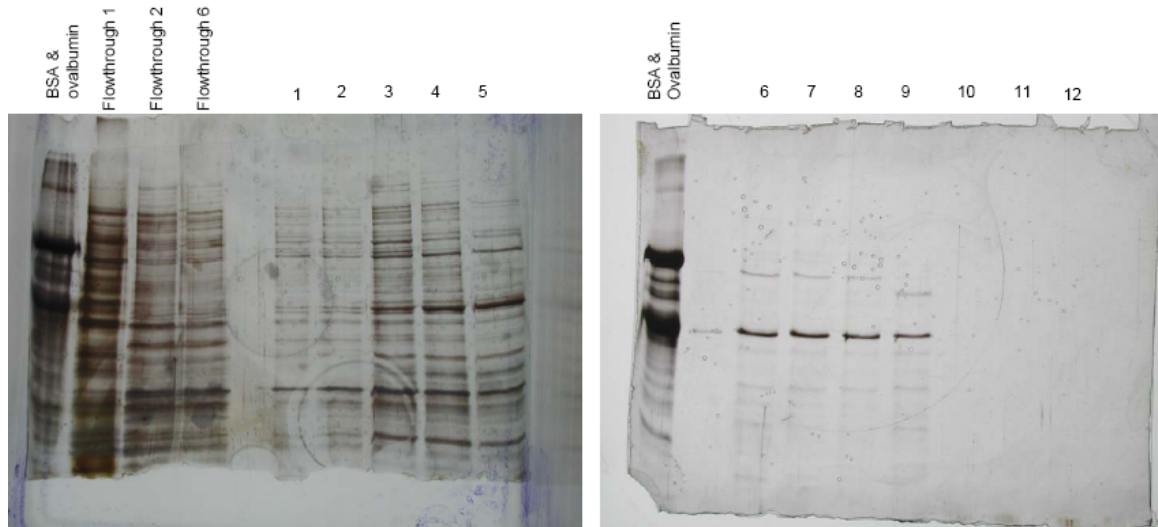
Εικόνα 25 PAGE 5% 8M ουρίας βαμμένη με χρώση νιτρικού αργύρου. Από δεξιά: PBR 322 Hinf, μετάγραφο PSTVd αρνητικής πολικότητας, μετάγραφο PSTVd θετικής πολικότητας



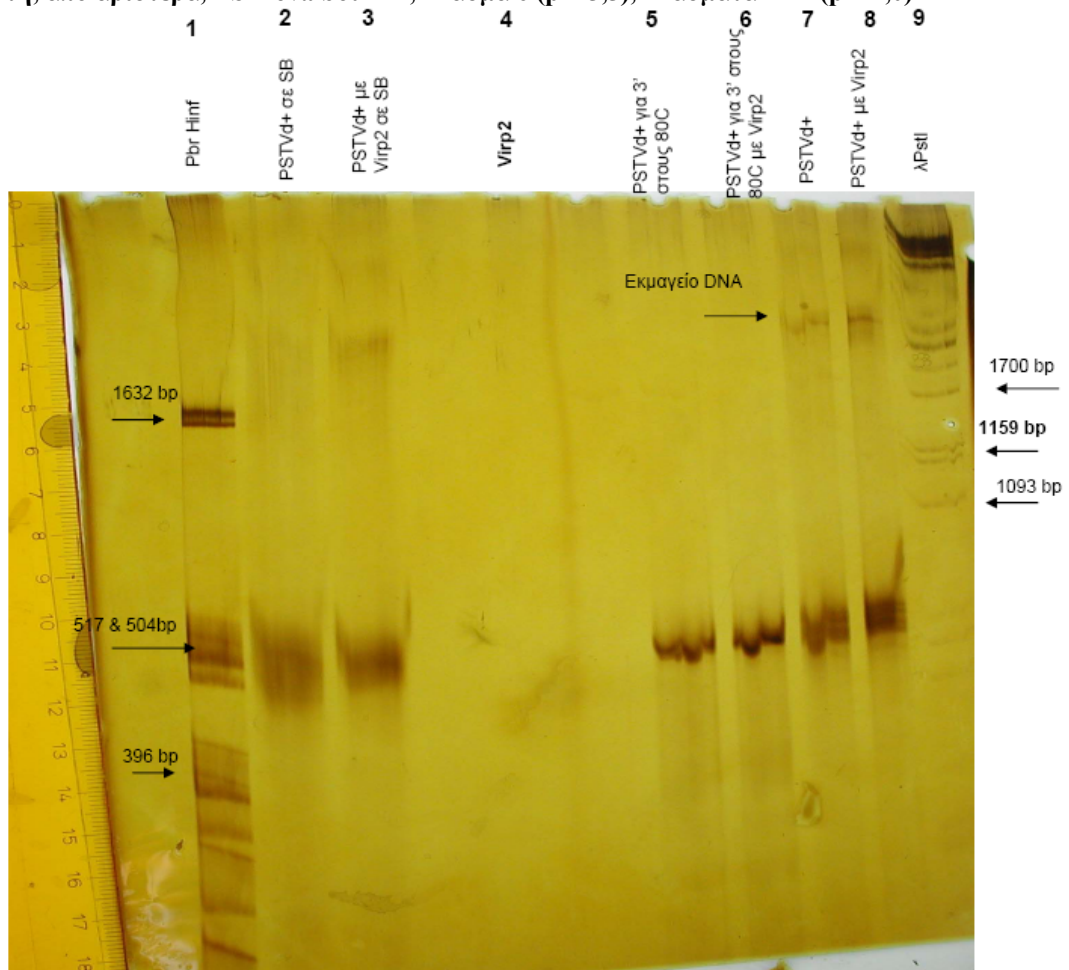
Εικόνα 26 EMSA 5% βαμμένη με χρώση νιτρικού αργύρου. Πάνω εικόνα: Από αριστερά: λ PstI, μετάγραφο PSTVd αρνητικής πολικότητας: σε EMSA binding buffer, πρώτα χωρίς και μετά με Virp2, σε SB πρώτα χωρίς και μετά με Virp2. PBR 322 Hinf, μετάγραφο PSTVd θετικής πολικότητας: σε EMSA binding buffer, πρώτα χωρίς και μετά με Virp2, σε SB πρώτα χωρίς και

μετά με Virp2. Στο SB υπάρχει κάποια αποικοδόμηση του μεταγράφου. Κάτω εικόνα: Ζουμ στο κομμάτι του τζελ όπου φαίνεται καθαρά η ζώνη της πρωτεΐνης.

Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε νέο παρασκεύασμα καθαρισμού πρωτεΐνης Virp2 το οποίο δεν έδινε εμφανή ζώνη στις EMSA.

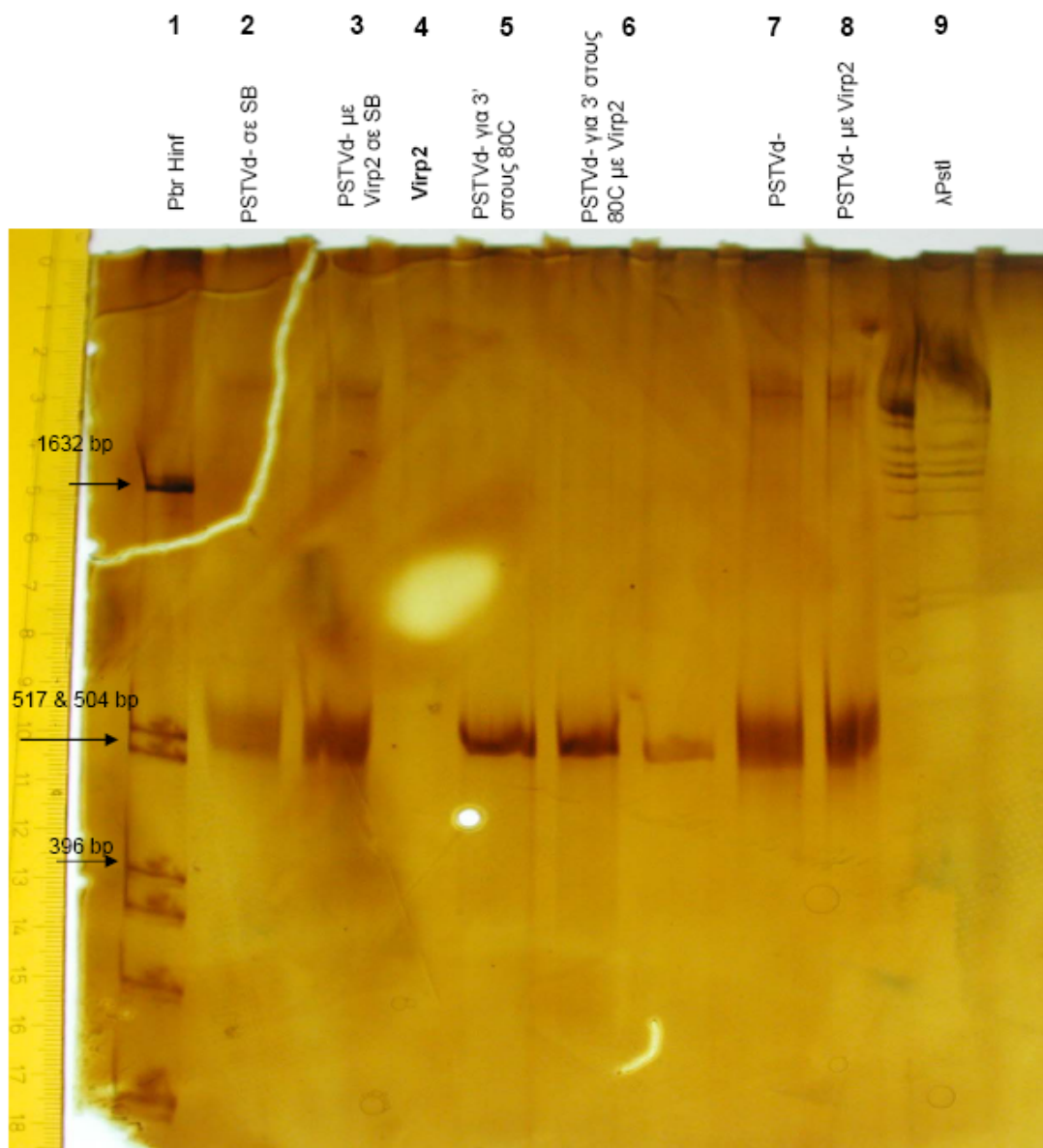


Εικόνα 27 SDS-PAGE 10% με κλάσματα από καθαρισμό πρωτεΐνης σε στήλη NTA-αγαρόζης εμπλουτισμένης με νικέλιο, με όξινο pH. Στην αριστερή πηκτική, από αριστερά, BSA-ovalbumin, flowthrough 1, flowthrough 2, flowthrough 6, κενό, και κλάσματα 1-5 (pH 5,5). Στην δεξιά πηκτική, από αριστερά, BSA-ovalbumin, κλάσμα 6 (pH 5,5), κλάσματα 7-12 (pH 4,0)



Εικόνα 28 EMSA 5% με θετικής πολικότητας μετάγραφο του PSTVd, με χρώση νιτρικού αργύρου. Από αριστερά: PBR 322 Hinf, μετάγραφο σε SB χωρίς πρωτεΐνη, μετάγραφο σε SB με πρωτεΐνη, κενό, Virp2, κενό, μετάγραφο που θερμάνθηκε για 3' στους 80C χωρίς πρωτεΐνη, μετάγραφο που θερμάνθηκε για 3' στους 80C με Virp2, μετάγραφο σε EMSA binding buffer χωρίς πρωτεΐνη, μετάγραφο σε EMSA binding buffer με πρωτεΐνη, λPstI. Η ζώνη που φαίνεται ψηλά είναι το εκμαγείο του DNA που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του μεταγράφου.

Το γεγονός ότι τα δείγματα που είχαν επωαστεί στους 80C δεν δείχνουν τις επιπλέον ζώνες, μάλλον επιβεβαιώνει ότι ήταν κάποια ευαίσθητη διαμόρφωση του RNA.

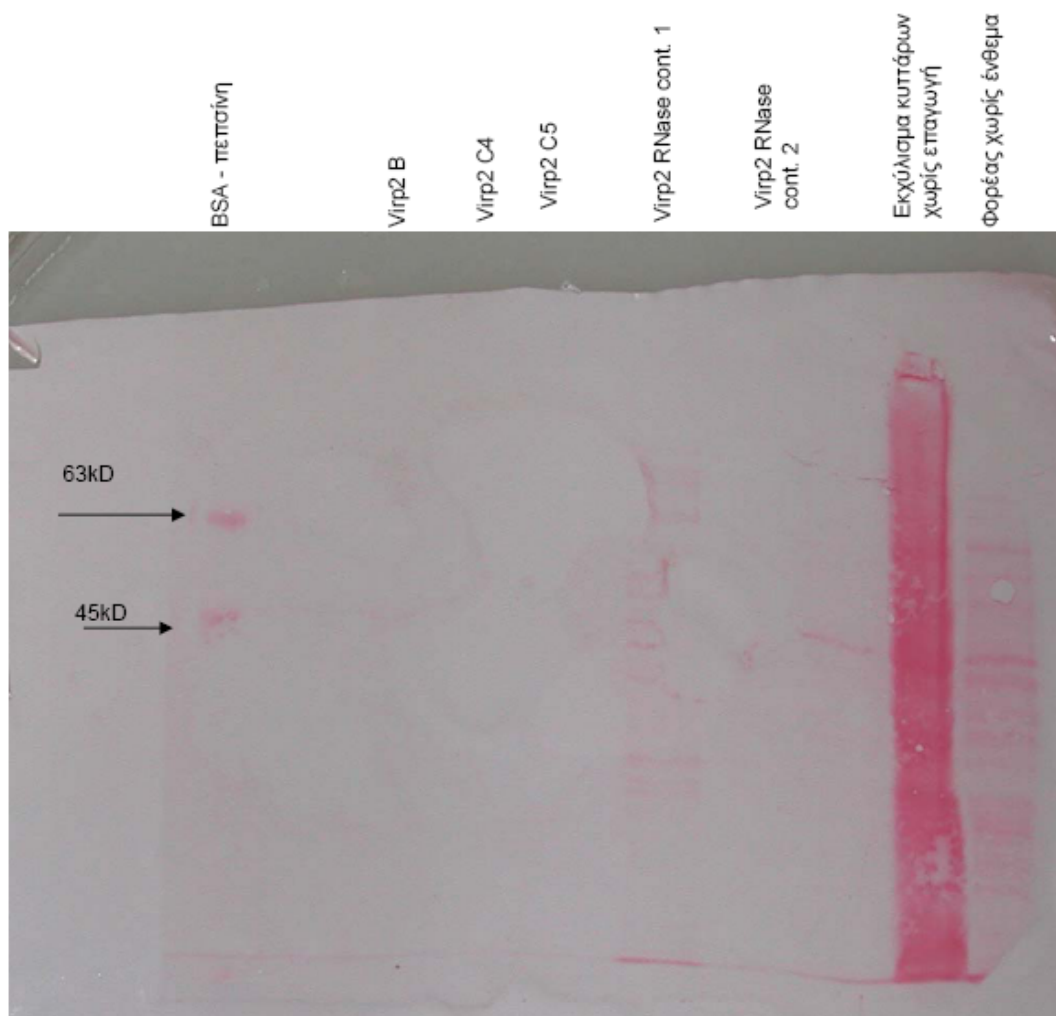


Εικόνα 29 EMSA 5% με μετάγραφο αρνητικής πολικότητας του PSTVd, με χρώση νιτρικού αργύρου. PBR322 Hinf, μετάγραφο σε SB χωρίς πρωτεΐνη, μετάγραφο σε SB με πρωτεΐνη, Virp2, μετάγραφο που θερμάνθηκε για 3' στους 80C χωρίς πρωτεΐνη, μετάγραφο που

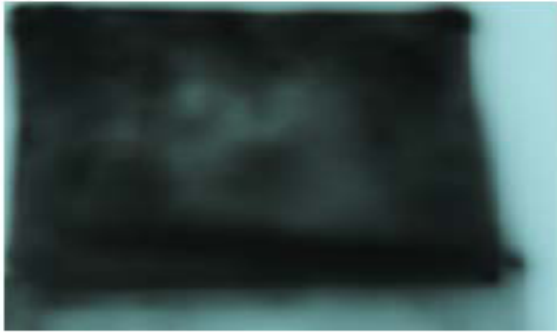
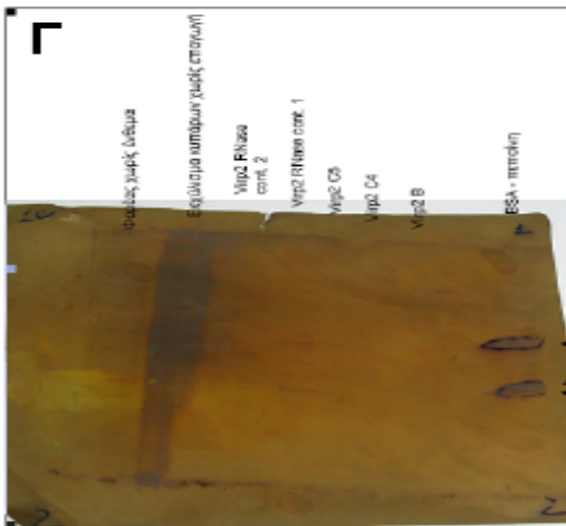
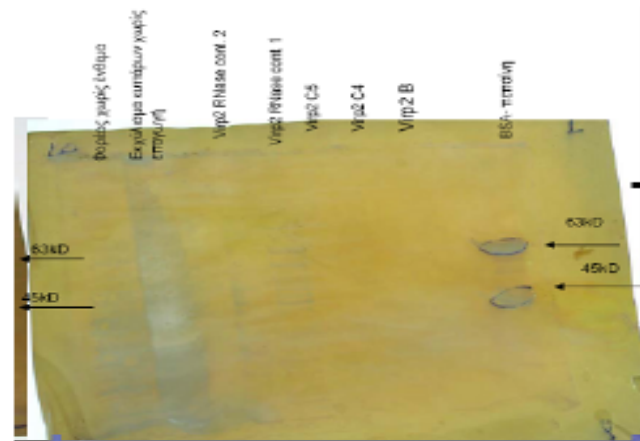
θερμάνθηκε για 3' στους 80C με Virp2, κενό, μετάγραφο σε EMSA binding buffer χωρίς πρωτεΐνη, μετάγραφο σε EMSA binding buffer με πρωτεΐνη, λPstI.

Και σε αυτές τις συνθήκες δεν φαίνεται εμφανής προσδεση του RNA στην πρωτεΐνη. Η ζωνη που εμφανίζεται πανω από τον μαρτυρα των 1632N, υπαρχει και στο RNA χωρίς πρωτεΐνη, αρα δεν προκειται για συμπλοκο

Καθώς δεν είχε καταστεί δυνατό να επιβεβαιωθεί αλληλεπίδραση της Virp2 με το PSTVd με EMSA, έγιναν πειράματα με την μέθοδο Northwestern χρησιμοποιώντας τα ολιγομερή 2,8+ και 2,2- του PSTVd . Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα SB με 0,1% w/v MgCl₂ και 0,1% w/v ZnCl₂.



Εικόνα 30 Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για Western blot μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών. Χρόση με Ponceau. Από αριστερά: BSA-πεπσίνη, 5 παρασκευάσματα πρωτεϊνών, φορέας χωρίς ένθεμα, εκχύλισμα κυττάρων στα οποία δεν είχε γίνει επαγωγή της έκφρασης της Virp2.

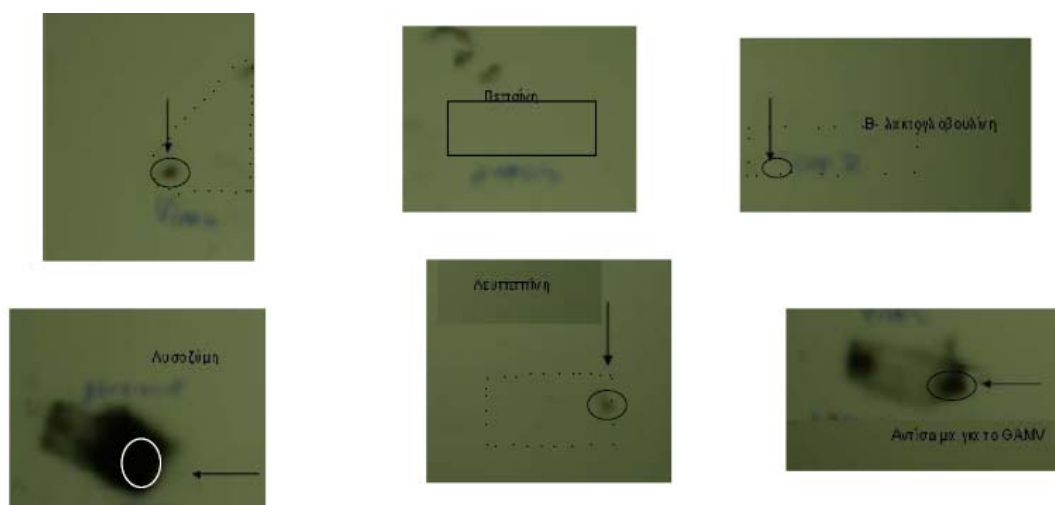
A**(+) PSTVd RNA****B****(-) PSTVd RNA****Δ**

Εικόνα 31 Πάνω: Αυτοραδιογραφία ανάλυσης κατά Northwestern. Η αριστερή μεμβράνη έχει επωαστεί με το ραδιενεργό μετάγραφο, ολιγομερές, 2,8 αντίτυπα του PSTVd θετικής πολικότητας, ενώ η δεξιά μεμβράνη με το ραδιενεργό μετάγραφο, ολιγομερές, 2,2 αντίτυπα του PSTVd αρνητικής πολικότητας. Δεν είναι δυνατόν να διακριθεί κάποιο σήμα. Κάτω, οι ίδιες μεμβράνες, βαμμένες με νιτρικό άργυρο. Αν και, θεωρητικά, η συγκεκριμένη μέθοδος είναι 100 φορές πιο ευαίσθητη για νουκλεϊκά οξέα παρά για πρωτεΐνες, εδώ φαίνονται, και στις δύο περιπτώσεις, μόνο πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνονταν και στην χρώση με Ponceau

Καθώς πιθανά προβλήματα στην επαναδιάταξη των πρωτεϊνών μετά την SDS-PAGE θα μπορούσαν να αναστέλλουν την όποια αλληλεπίδρασή τους με το RNA, κρίθηκε σκόπιμο να γίνουν πειράματα που δεν εμπεριείχαν αυτό το στοιχείο.

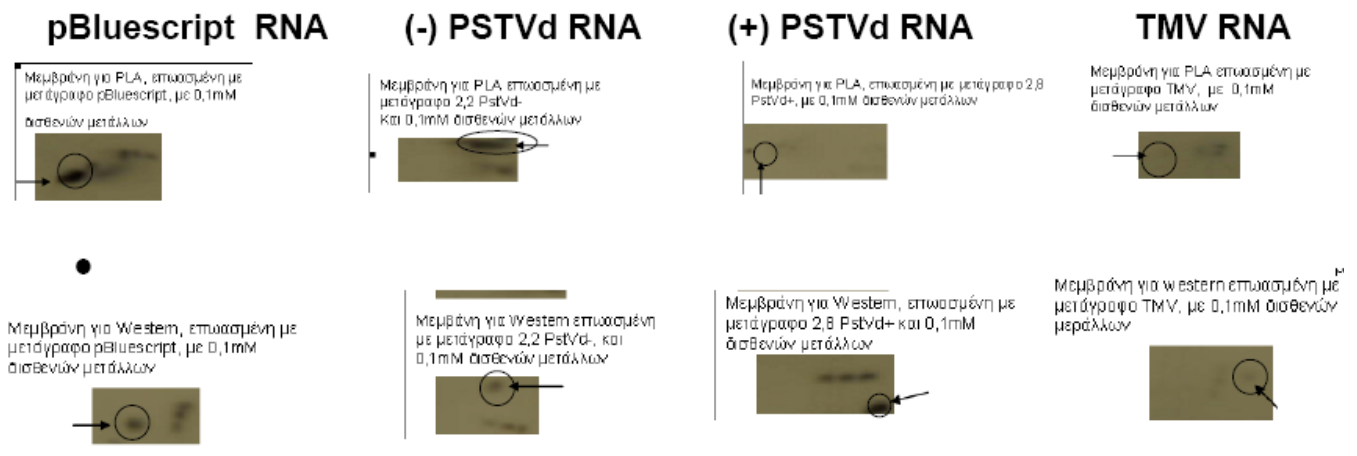
Για τα Dot blot χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί τύποι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης: Τόσο για στύπωμα Western (Schleicher & Schuell, PROTRAN, πόροι 0,45μm), όσο και για στύπωμα φαγικών πλακών (Milipore, HATF 137 50, πόροι 0,45μm). Επίσης, εξετάστηκε η σημασία της μονιμοποίησης της πρωτεΐνης

πάνω στην μεμβράνη με υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς κάποιες μεμβράνες υπέστησαν cross-link στα 1200J, όπως μεμβράνες για ανάλυση Northern. Τέλος, ένας παράγοντας ακόμα που μελετήθηκε ήταν το πώς επηρεάζουν διαφορετικές συγκεντρώσεις δισθενών μετάλλων την ευαισθησία του πειράματος. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 3-5μg πρωτεΐνης τόσο από την Virp2 όσο και από τις διάφορες πρωτεΐνες που επιστρατεύτηκαν ως δείγματα αρνητικού ελέγχου. Για να διαπιστωθεί η βιωσιμότητα της μεθόδου, έγινε dot blot χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το αρνητικής πολικότητας μετάγραφο του PSTVd αλλά εμβολιάζοντας τις μεμβράνες και με άλλες πρωτεΐνες εκτός της Virp2 για να εξακριβωθεί ότι το σήμα που φαινόταν στις αυτοραδιογραφίες δεν ήταν θόρυβος, ή ψευδώς θετικό

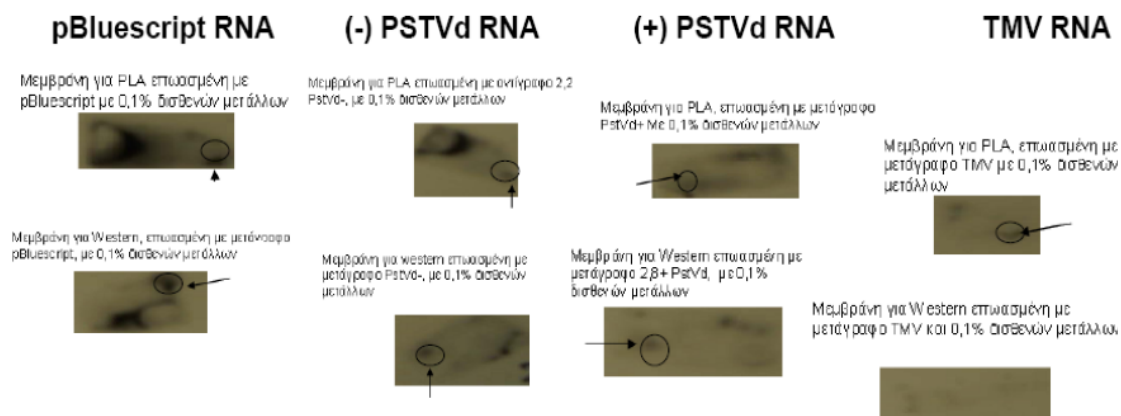


Εικόνα 32 Αυτοραδιογραφία μετά από dot blot με αρνητικής πολικότητας μετάγραφο του PSTVd. 18 ώρες έκθεση. Από πάνω: Virp2, Πεπσίνη, Λυσοζύμη, β- λακτογλοβουλίνη, αντίσωμα λευπεπίνη και αντι-GAMV. Τα βέλη και οι κύκλοι δείχνουν το σημείο όπου είχε εμβολιαστεί η κάθε μεμβράνη με Virp2 ως δείγμα θετικού ελέγχου

Το ακόλουθο πείραμα έγινε χρησιμοποιώντας το ολιγομερές 2,2 αντιγράφων αρνητικής πολικότητας του PSTVd, το ολιγομερές 2,8 θετικής πολικότητας μεταγραφο του PSTVd καθώς μεταγραφο από τον φορα Bluescript και μεταγραφο τμήματος του TMV RNA (περιοχή γονιδίου καψιδιακής πρωτεϊνης από το 3'μερος του γενώματος)



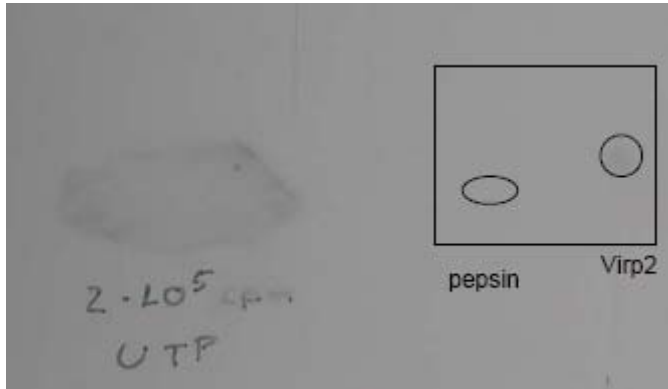
Εικόνα 33 Αυτοραδιογραφία μετά από Dot blot για το οποίο χρησιμοποιήθηκε SB με 0,1mM MgCl₂ και 0,1mM ZnCl₂. Στην πάνω σειρά, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες για PLA, στην κάτω σειρά, μεμβράνες για ανάλυση Western. Από αριστερά, οι RNA ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: pBluescript, 2,2- PSTVd, 2,8+PSTVd, TMV.



Εικόνα 34 Αυτοραδιογραφία μετά από dot blot, για το οποίο χρησιμοποιήθηκε SB 0,1% w/v MgCl₂ και 0,1% w/v ZnCl₂. Στην πάνω σειρά, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες για PLA, στην κάτω σειρά, μεμβράνες για ανάλυση Western. Από αριστερά, οι RNA ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: pBluescript, 2,2- PSTVd, 2,8+PSTVd, TMV

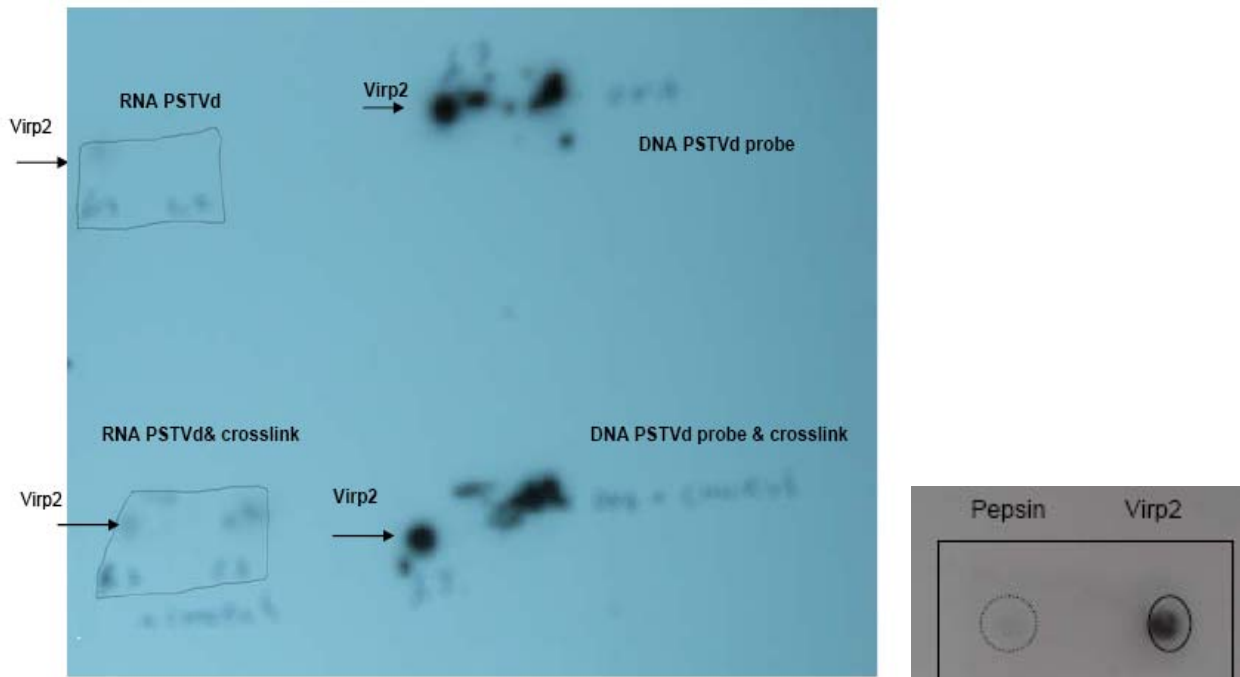
Καθώς στις μεμβράνες με 0,1mM δισθενών μετάλλων υπάρχει σαφώς λιγότερος θόρυβος, έγινε άλλο ένα πείραμα για ανάλυση Northwestern, χρησιμοποιώντας SB με 0,1mM MgCl₂ και 0,1mM ZnCl₂. Αν και το πρόβλημα του θορύβου λύθηκε, ακόμα και μετά από έκθεση αρκετών ημερών δεν ήταν δυνατόν να διακριθεί κάποιο σήμα.

Για να επιβεβαιωθεί ότι το σήμα που εμφανίστηκε στα dot blot δεν ήταν απλά θόρυβος, έγινε επώαση μεμβράνης με την πρωτεΐνη τόσο με ραδιενεργό μεταγράφο του PSTVd αρνητικής πολικότητας, όσο και με πολύ υψηλότερης ειδικής ενεργότητας ραδιενεργό α-32-P-UTP.



Εικόνα 35 Αριστερά: Μembrάνη Western με Virp2 στα αριστερά και πεψίνη στα δεξιά, επωασμένη με UTP $2 \cdot 10^5$ cpm. Δεξιά: Μembrάνη για Western, με Virp2 στα αριστερά και πεψίνη στα δεξιά της, επωασμένη με $1 \cdot 10^4$ cpm ραδιενεργού μεταγράφου αρνητικής πολικότητας του PSTVd. Στην αριστερή μεμβράνη υπάρχει θόρυβος, αλλά όχι σήμα. Στην δεξιά, έστω και αγνά, διακρίνεται το σημείο εμβολιασμού με την Virp2.

Για να εξακριβωθεί αν η διαφαινόμενη πρόσδεση της Virp2 με το PSTVd ήταν ειδική ή όχι, έγιναν dot blot στα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση των μεμβρανών ραδιενεργά μετάγραφα από τυχαίους στόχους, που επιλέχθηκαν με κύριο κριτήριο την διαθεσιμότητά τους. Οι ανιχνευτές αυτοί ήταν μετάγραφα του pBluescript με T7 RNA πολυμεράση, μήκους περίπου 670 νουκλεοτιδίων και του TMV επίσης με T7 RNA πολυμεράση, μήκους περίπου 700 νουκλεοτιδίων.. Όπως και στις μεμβράνες που παρατέθηκαν παραπάνω, όλοι οι ανιχνευτές έδωσαν σήμα.



Εικόνα 36. Αυτοραδιογραφία μετά από Dot blot. δεξιά, μεμβράνες που επώαστηκαν με ραδιενεργό μετάγραφο από το ολιγομερές 2,2 αντιγράφων αρνητικής πολικότητας του PSTVd . Στα αριστερά τους έχουν Virp2 στα δεξιά τους πεπσίνη. Το στυλό με το οποίο σημειώθηκαν προκαλεί θόρυβο. Δεξιά, μεμβράνη που επώαστηκε με ραδιενεργό DNA του PSTVd. Στις πάνω μεμβράνες έγινε μονιμοποίηση της πρωτεΐνης με υπεριώδες φως . Δεξιά, αυτοραδιογραφία από dot blot στο οποίο είχε χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής DNA με την αλληλουχία του γονιδίου της Virp1.

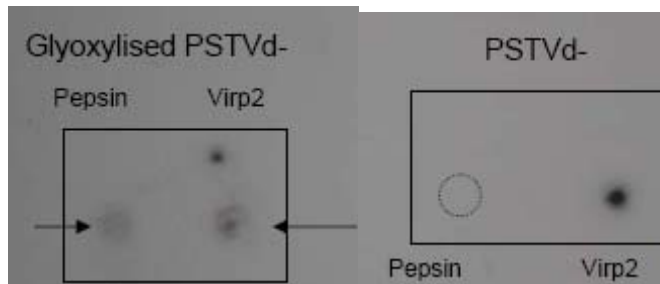
Το σήμα με ραδιενεργό DNA φαίνεται να είναι αρκετά έντονο σε κάθε περίπτωση, ανεξάρτητα της αλληλουχίας του τμήματος. Συμπεραίνουμε ότι η Virp2, σε αυτό το στάδιο καθαρισμού, προσδένει DNA

Καθώς φαινόταν ότι η αλληλουχία του στόχου δεν παίζει μεγάλο ρόλο στην πρόσδεση, έγιναν πειράματα χημικών αντιδράσεων με τις βάσεις του RNA, πρώτα με γλυοξάλη που αντιδρά με την γουανίνη και εν συνεχεία χημικής μετατροπής με υδραζίνη και πιπεριδίνη, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Maxam & Gilbert, 1977, ούτως ώστε να φανεί αν συνεχίζει να υπάρχει αναγνώριση του στόχου, ακόμα και υπό συνθήκες οι οποίες δεν θα επέτρεπαν αναγνώριση κάποιας αλληλουχίας.

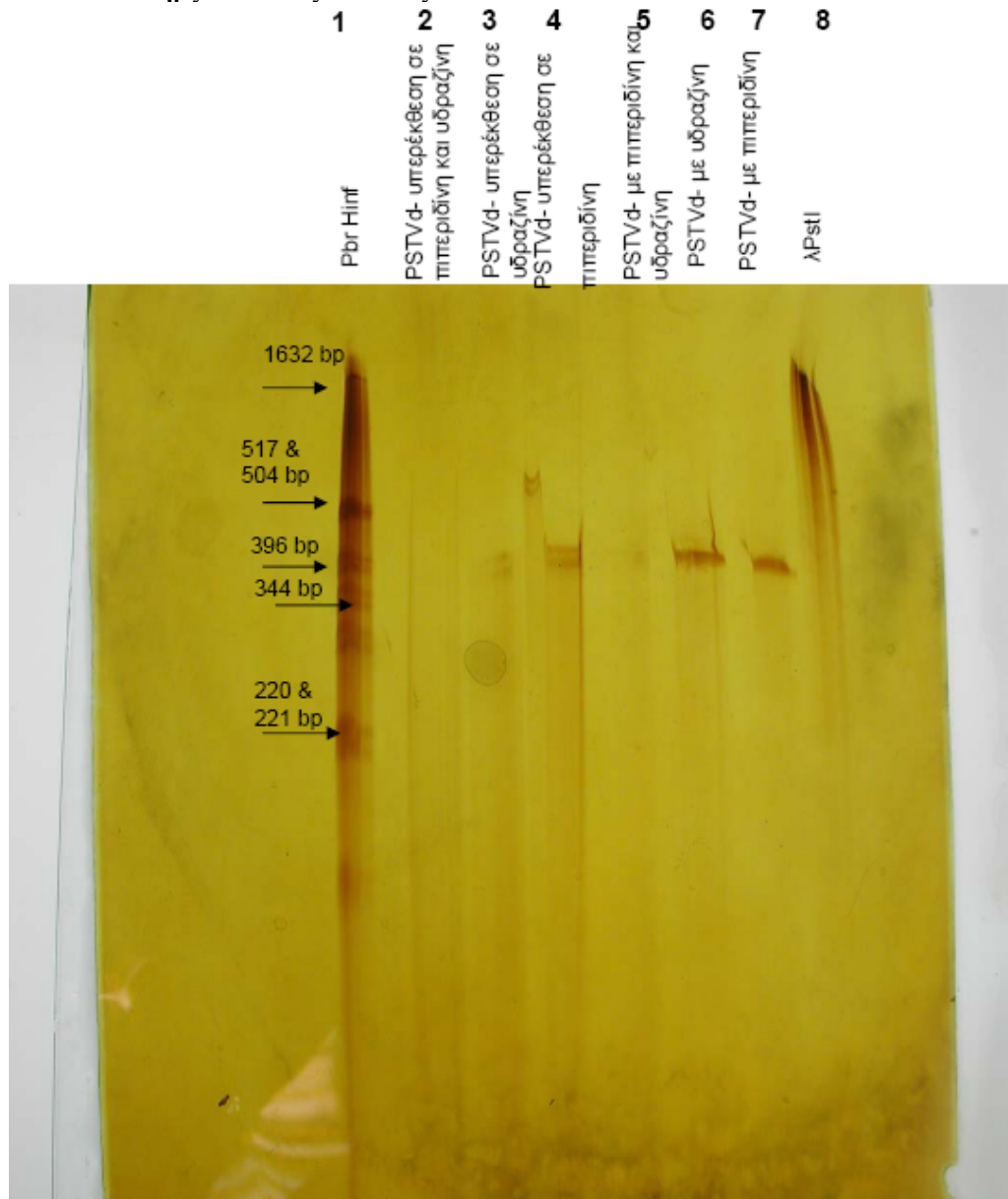


Εικόνα 37 Αυτοραδιογραφία μετά από PAGE 5% ακρυλαμίδα, 8M ουρία. Αριστερά, μετάγραφο αρνητικής πολικότητας του PSTVd, επωασμένο με 1M γλυοξάλη. Δεξιά, το ίδιο μετάγραφο χωρίς επεξεργασία. Η διαφορά στην ηλεκτροφορητική συμπεριφορά είναι εμφανής.

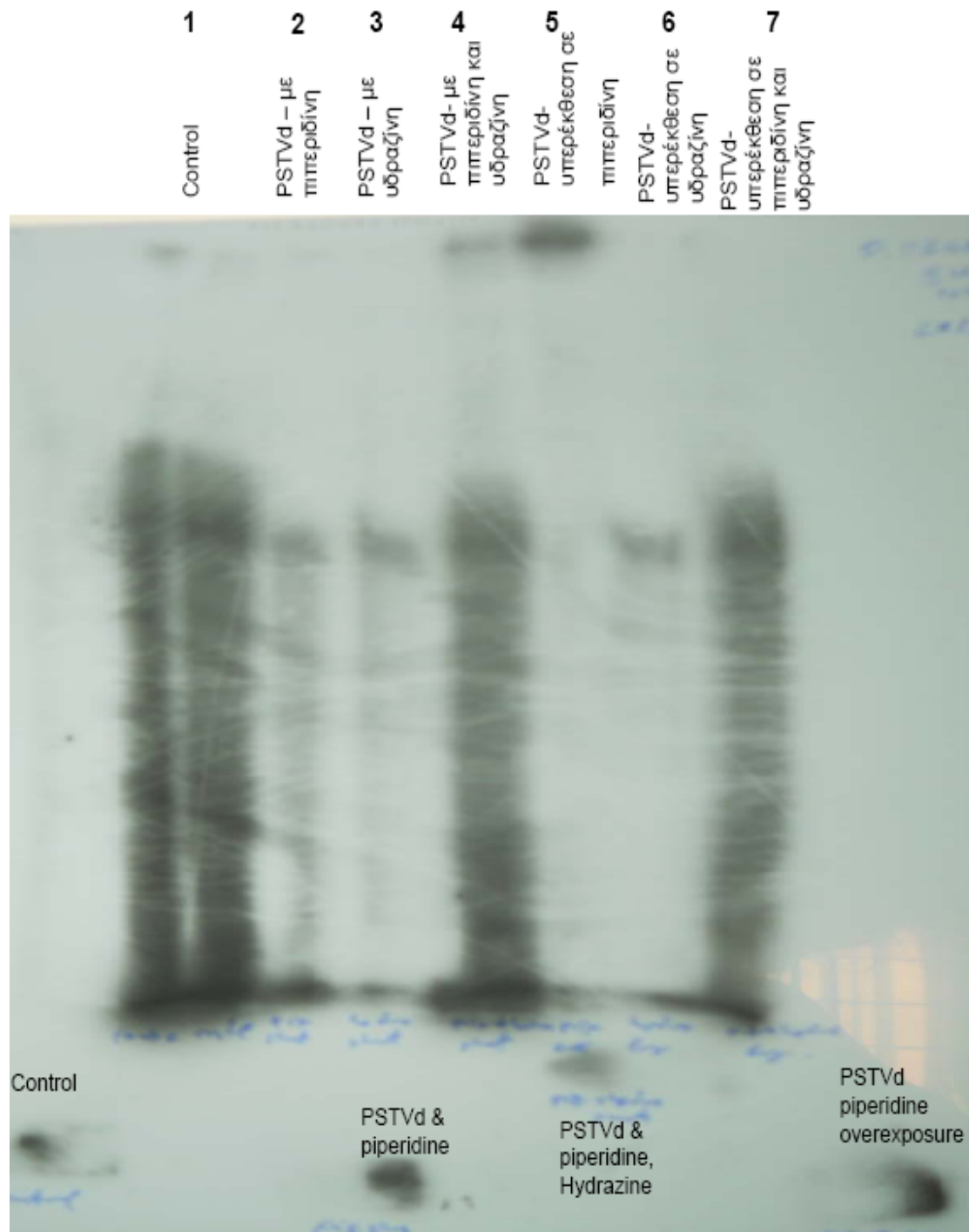
Το RNA επεξεργασμένο με γλυοξάλη συνέχισε να δίνει σήμα, αν και μετά την επεξεργασία σήμα φάνηκε και στην πρωτεΐνη αρνητικού ελέγχου, η προσδεση έγινε δηλαδή λιγότερο εξειδικευμένη



Εικόνα 38 Αυτοραδιογραφία μετά από dot blot. Αριστερά, ως ανιχνευτής έχει χρησιμοποιηθεί γλυοξυλιωμένο μετάγραφο PSTVd αρνητικής πολικότητας. Δεξιά, μετάγραφο PSTVd αρνητικής πολικότητας χωρίς κάποια επεξεργασία. Η ένταση του σήματος δεν είναι απολύτως συγκρίσιμη, καθώς, αν και γλυοξυλιώθηκε η ίδια ποσότητα μεταγράφου με αυτή που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου, ήταν απαραίτητο να κατακρυσταλλιστεί με αιθανόλη πριν χρησιμοποιηθεί, και πιθανόν να υπήρξαν κάποιες απώλειες.



Εικόνα 39 PAGE 5% με 8M ουρίας, βαμμένη με νιτρικό άργυρο (Schumacher et al. 2003) με αρνητικής πολικότητας μετάγραφο του PSTVd. Από αριστερά: PBR 322 Hinf,PSTVd με υπερέκθεση σε υδραζίνη και πιπεριδίνη, PSTVd με υπερέκθεση σε υδραζίνη, PSTVd με υπερέκθεση σε πιπεριδίνη, PSTVd επωασμένο με πιπεριδίνη και υδραζίνη, PSTVd επωασμένο με υδραζίνη, PSTVd επωασμένο με πιπεριδίνη

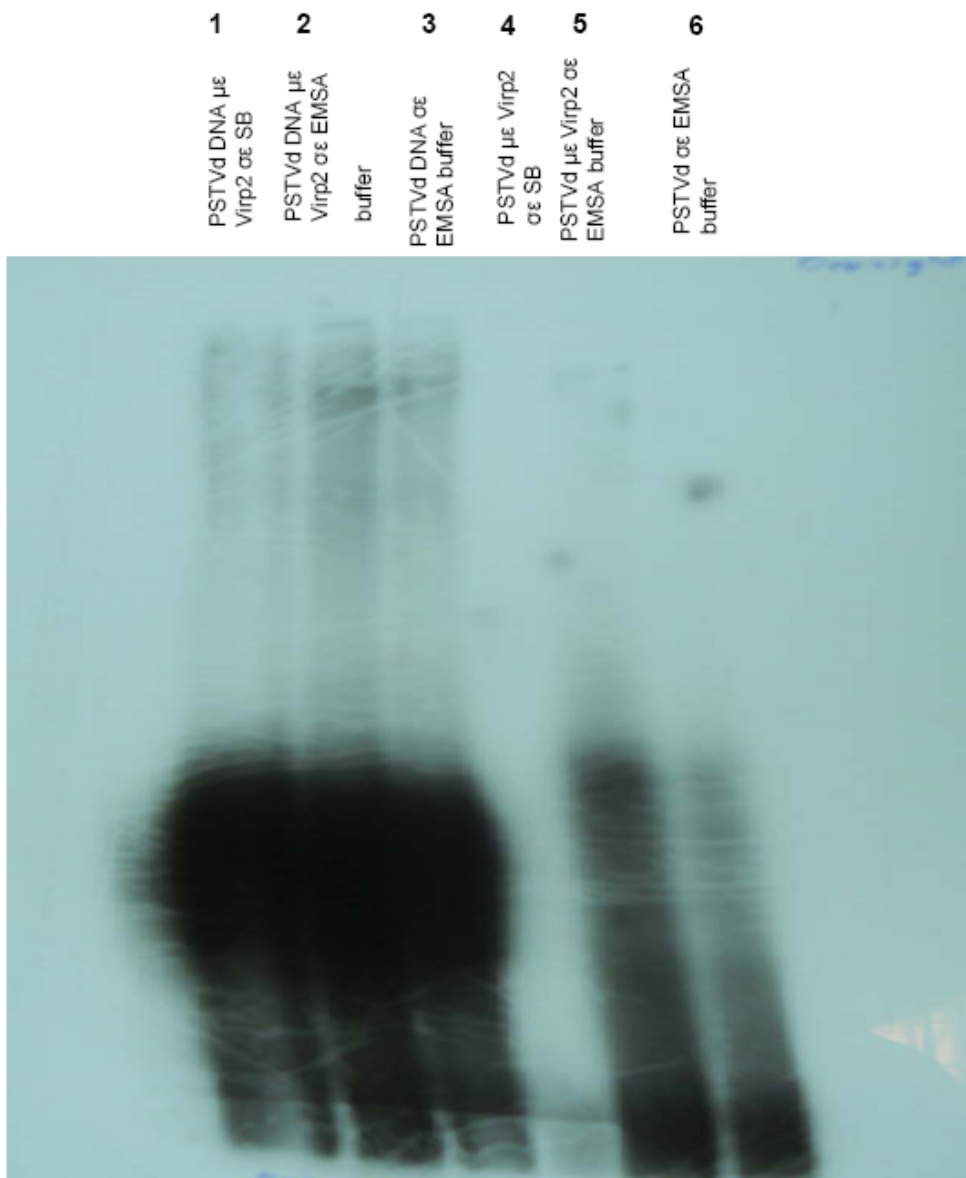


Εικόνα 40 Αυτοραδιογραφία από PAGE 5% με 8M ουρία. Από αριστερά: 2 φορές μετάγραφο PSTVd αρνητικής πολικότητας, επώαση με πιπεριδίνη, επώαση με υδραζίνη, επώαση με πιπεριδίνη και υδραζίνη, υπερέκθεση σε πιπεριδίνη, υπερέκθεση σε υδραζίνη, υπερέκθεση σε υδραζίνη και πιπεριδίνη. Τα Dot blot που φαίνονται είναι: κάτω αριστερά, δείγμα ελέγχου,

κέντρο, επώαση με πιπεριδίνη, κάτω δεξιά υπερέκθεση σε πιπεριδίνη, πάνω δεξιά, επώαση με πιπεριδίνη και υδραζίνη.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση δεν είναι ειδική, αφού, με εξαίρεση τις περιπτώσεις όπου το νουκλεϊκό οξύ στόχος είχε αποικοδομηθεί εντελώς, συνέχιζε να υπάρχει σήμα, η εξασθένιση του οποίου μάλλον είχε πιο πολύ να κάνει με τους κύκλους κατακρήμνισης-επαναδιάλυσης του RNA που αναπόφευκτα προκαλούσαν κάποιες απώλειες, παρά με την αναστολή αναγνώρισης του νουκλεϊκού οξέος από την Virp2.

Το επόμενο βήμα ήταν να γίνουν πάλι EMSA, χρησιμοποιώντας για στόχο και το DNA του PSTVd, αλλά και ως διάλυμα αντίδρασης και το SB, σε μια προσπάθεια να αναπαραχθούν τα αποτελέσματα των dot blots και με αυτή την μέθοδο.



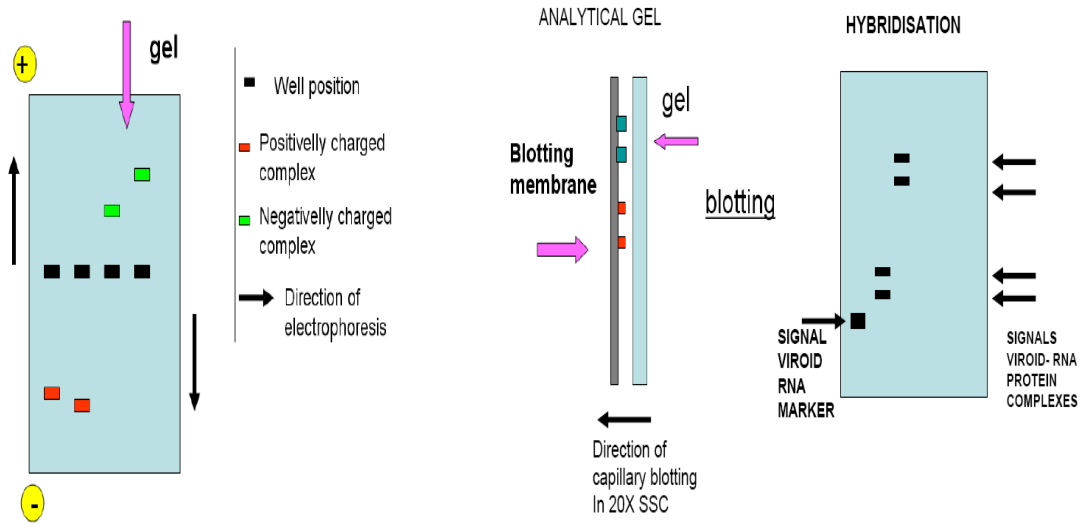
Εικόνα 41 Αυτοραδιογραφία από EMSA 5% με DNA και RNA θετικής πολικότητας του PSTVd. Από αριστερά: DNA με SB και Virp2, DNA σε EMSA buffer με virp2, DNA σε EMSA buffer, RNA σε SB με Virp2, RNA σε EMSA buffer με Virp2, RNA σε EMSA buffer. Με εξαίρεση την αποικοδόμηση του RNA στο SB, που μάλλον οφείλεται σε κάποια πρόσμιξη, δεν υπάρχει κάποια διαφορά σε σχέση με προηγούμενα πειράματα.

B. Ηλεκτροφορητική ανάλυση εκχυλισμάτων φυτικού ιστού σε πηκτές αγαρόζης και ακρυλαμίδης

Αφού δεν κατέστη δυνατό να επιβεβαιωθεί ειδική και ισχυρή πρόσδεση της Vnrp2 στο ιοειδές PSTVd, αναζητήθηκε μία εναλλακτική μέθοδος για εύρεση συμπλόκων πρωτεϊνών-ιοειδούς. Αρχικά, ομογενοποιημένος ιστός από μολυσμένα φυτά διαλυόταν σε 5 όγκους 0,5x TBE (4C) και φυγοκεντρούταν για 5' στις 5.000rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο ηλεκτροφορούταν σε πηκτική αγαρόζης 0,8% με τάση 30V για 6 ώρες. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνταν εκχύλισμα με 0,5x TBE από υγιές φυτό, καθώς και εκχύλισμα από μολυσμένο φυτό, το οποίο στην συνέχεια καθαριζόταν με φαινόλη, ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες πριν την ηλεκτροφόρηση.

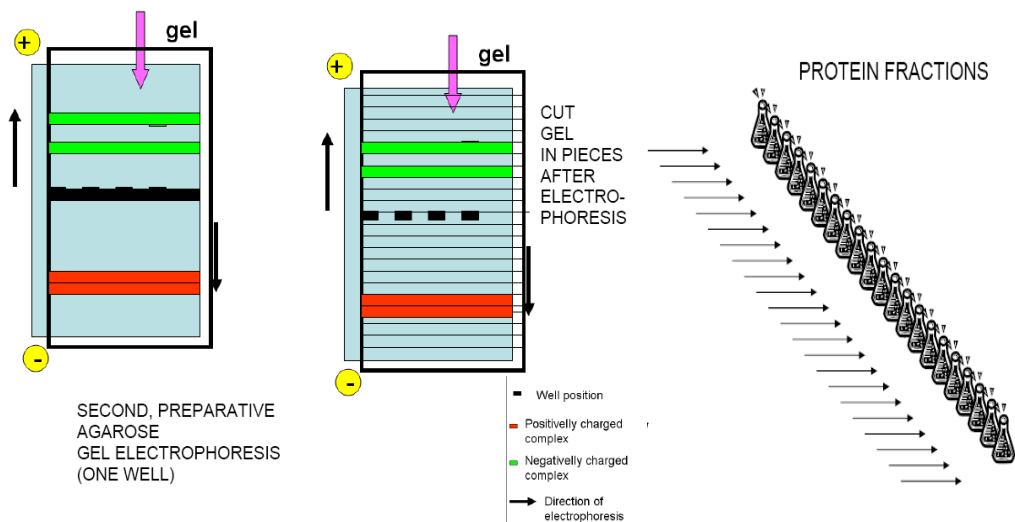
Αντιστοιχώντας την εικόνα από την ανάλυση κατά Northern με την ανάλυση των πρωτεϊνών σε SDS-PAGE 10% είναι δυνατόν να φανεί όχι μόνο το πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης ανάμεσα σε υγιή και μολυσμένα φυτά, αλλά και ποιες πρωτεΐνες πιθανόν να αλληλεπιδρούν με το ιοειδές.

Μετά την ηλεκτροφόρηση του εκχυλίσματος του φυτικού ιστού, ένα κομμάτι από το τζελ χρησιμοποιούταν για ανάλυση κατά Northern, ενώ ένα άλλο, στο οποίο είχαν φορτωθεί τα ίδια δείγματα, κοβόταν σε κομμάτια μήκους 0,5 εκατοστών ανά πηγαδάκι ηλεκτροφόρησης και αυτά τα κομμάτια διηθούνταν με φυγοκέντρηση πάνω σε φίλτρο. Τέλος, οι πηκτές SDS-PAGE 10% στις οποίες αναλύονταν τα πρωτεϊνικά δείγματα βάφονταν με χρώση νιτρικού αργύρου.



FIRST ANALYTICAL NATIVE ELECTROPHORESIS ON AGAROSE

BLOTTING AND HYBRIDISATION FOR VIROID RNA FREE AND IN COMPLEXES

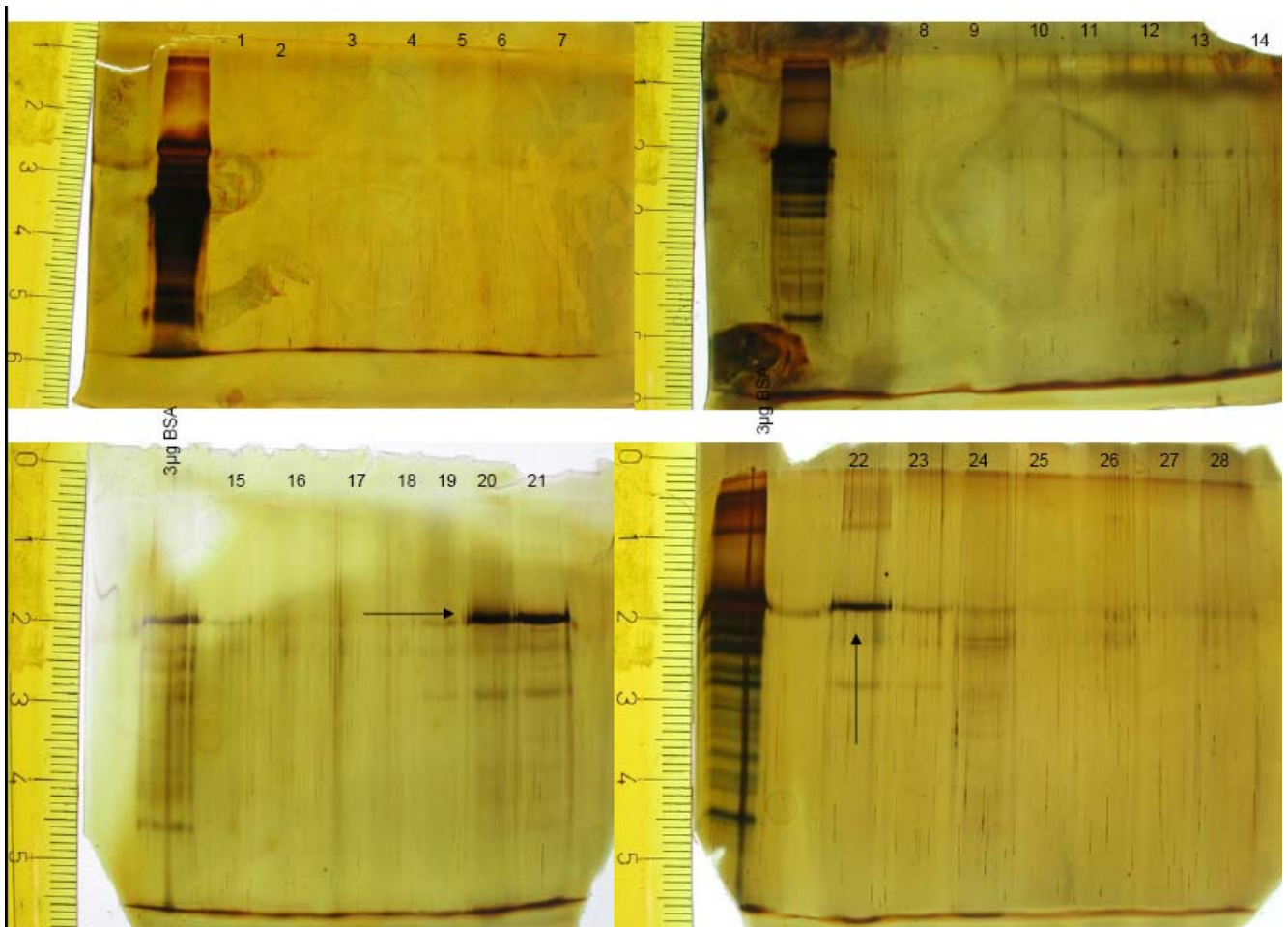


SECOND, PREPARATIVE AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS (ONE WELL)

GEL CUT IN PIECES → AGAROSE LIQUID CENTRIFUGED

Εικόνα 42 Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου. Αρχικά, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε αгарόζη, μετά, το ένα μέρος της πηκτής χρησιμοποιείται για ανάλυση Northern και το υπόλοιπο κόβεται σε ίσα κομμάτια, από τα οποία με διήθηση μέσω φυγοκέντρησης ανακτώνται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, για να αναλυθούν σε SDS-PAGE.

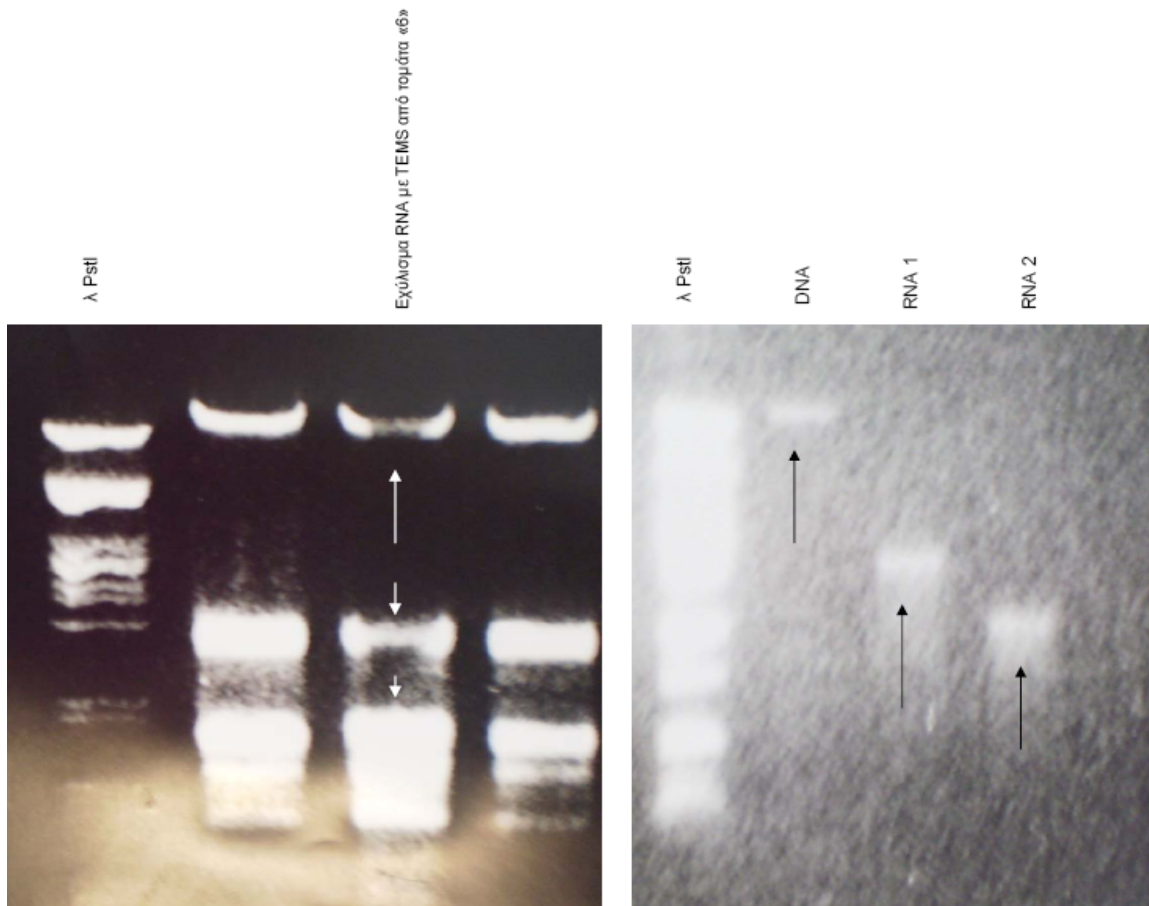
Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 0,8% 17,1μg.BSA Στην συνέχεια, με την μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, έγινε προσπάθεια να ανακτηθούν οι πρωτεΐνες και να αναλυθούν μέσω SDS-PAGE.



Εικόνα 43 SDS-PAGE 10% σε διήθημα αγαρόζης 0,8% όπου είχε ηλεκτροφορηθεί BSA. Πάνω, κομμάτια 1-7 και 8-14. Κάτω, κομμάτια 15-21 και 22-28. Στο ακριανό αριστερό πηγαδάκι κάθε πηκτής έχουν φορτωθεί 3µg BSA. Είναι εμφανής ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης, καθώς και ότι εμφανίζεται καθαρά στα κομμάτια 20-22.

Με φωτομετρήσεις που έγιναν και συνοπολογίζοντας τον συνολικό όγκο που ανακτήθηκε μετά την φυγοκέντρηση των κομματιών της αγαρόζης, υπολογίστηκε ότι συνολικά ανακτήθηκαν 8,6µg BSA. Ως ποσοστό φαίνεται πολύ ενθαρρυντικό, αν και πρέπει να τονιστεί ότι η αξιοπιστία του φωτομέτρου τίθεται εν αμφιβόλω. Σίγουρα, προσμίξεις από την αγαρόζη επηρεάζουν τις μετρήσεις. Δυστυχώς, οι διαθέσιμοι όγκοι είναι τόσο μικροί που δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο όργανο, που χρησιμοποιεί συμβατικές κυβέτες. Επίσης, με την ίδια μέθοδο αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζης, ανακτήθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE παρασκευάσματα Virp2 και οβαλβουμίνης (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται), αν και λόγω προβλημάτων με το φωτόμετρο, δεν ήταν δυνατόν να εξακριβωθεί η ακριβής αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

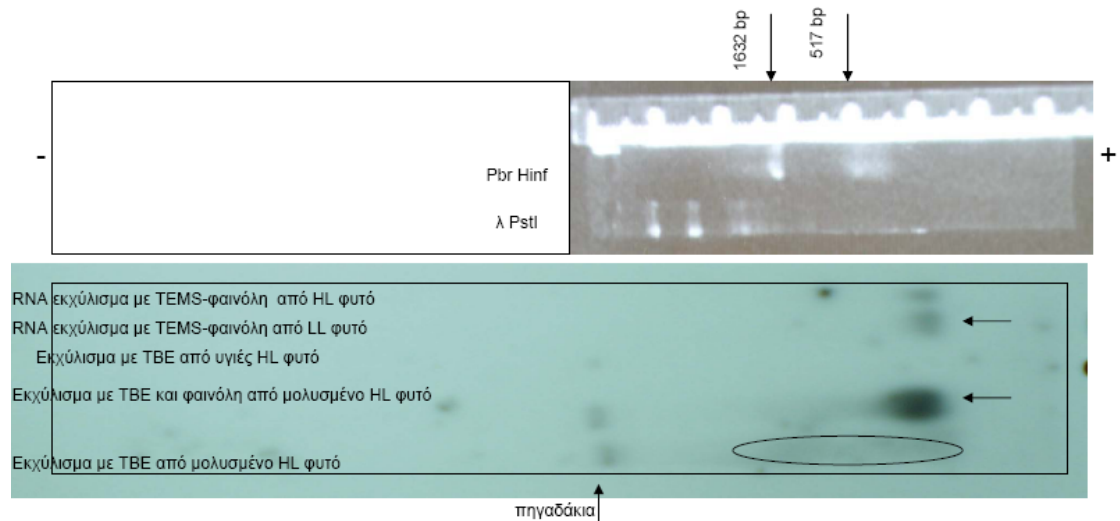
Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου "φυγοκέντρισης" της αγαρόζης μετα την ηλεκτροφόρηση, για ανάκτηση των διαχωριζόμενων ζωνών, έγινε και πείραμα για ανάκτηση συνολικών νουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης 1%. Φορτώθηκαν 3,9μg εκχυλίσματος κουκλεϊκών οξέων από ιστό τομάτας με TEMS. Κόπηκαν με την βοήθεια υπεριώδους φωτός τα κομμάτια της πηκτής που περιείχαν εύκολα αναγνωρίσιμες ζώνες (ριβσομικά RNA's, κυτταροπλασματικά και χλωροπλαστικά) και μετά την φυγοκέντρωση-διήθηση, ηλεκτροφορήθηκαν εκ νέου τα δείγματα.



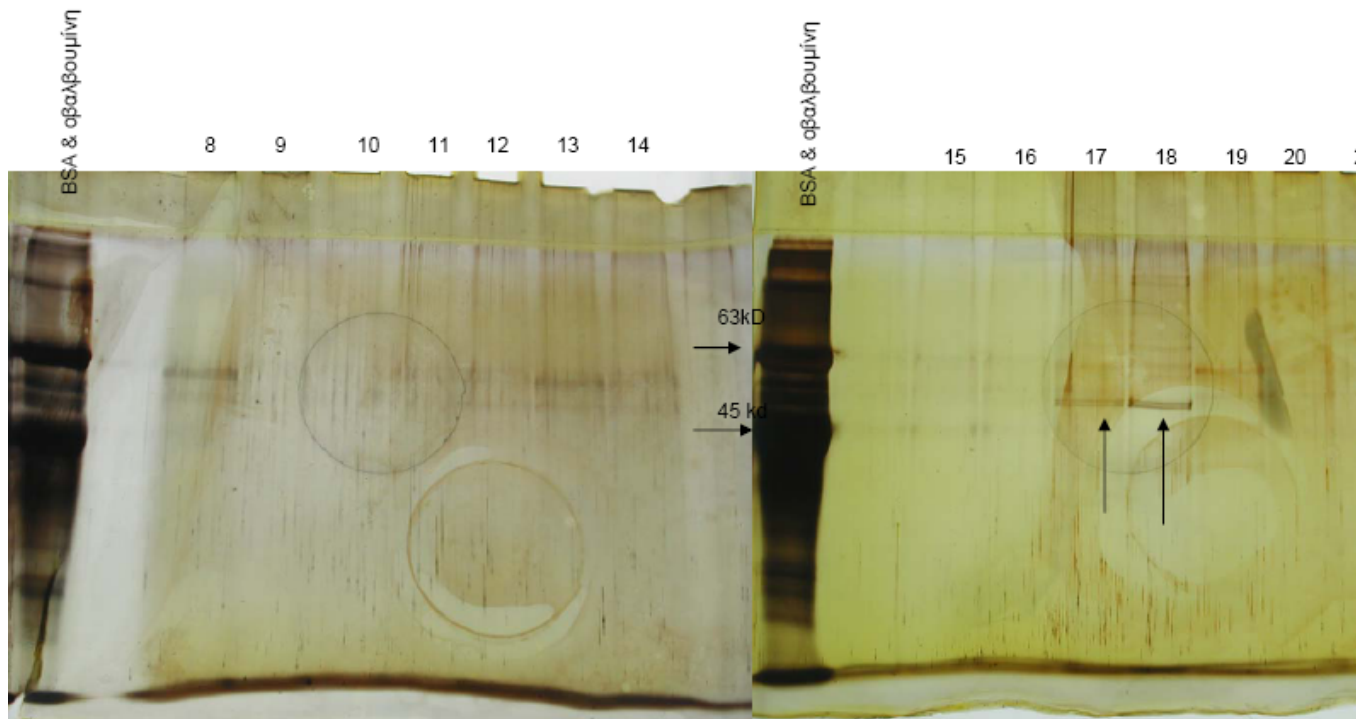
Εικόνα 44 Πηκτές αγαρόζης 1%. Αριστερά, από αριστερά: λPstI και δείγματα εκχυλισμάτων με TEMS φυτών No. 3, 6, 8. Για Την διήθηση της αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το φυτό 6. Δεξιά: από αριστερά, λPstI, DNA από το φυτό 6, και διαδοχικά δύο κομμάτια ριβσομικού RNA.

Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί η περιεκτικότητα του διηθήματος σε νουκλεϊκά οξέα με φωτομέτρηση. Όμως, με δεδομένο ότι στο δεύτερο πήκτωμα αγαρόζης φορτώθηκε μόλις περίπου το 1/5 του όγκου του υγρού που ανακτήθηκε από

την διήθηση μέσω φυγοκέντρωσης, και ότι και οι τρεις ζώνες φαίνονται καθαρά, είναι σαφές ότι η ανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων με απλή φυγοκέντρωση στα κομμάτια της αγαρόζης που περιείχαν τις αντίστοιχες ζώνες ήταν επιτυχής σε ικανοποιητικό βαθμό, δίνοντας μάλιστα συγκρίσιμα αποτελέσματα με το εμπορικό κιτ (Macherey-Nagel) που χρησιμοποιήθηκε σε άλλα πειράματα για τον καθαρισμό DNA από πηκτές αγαρόζης.

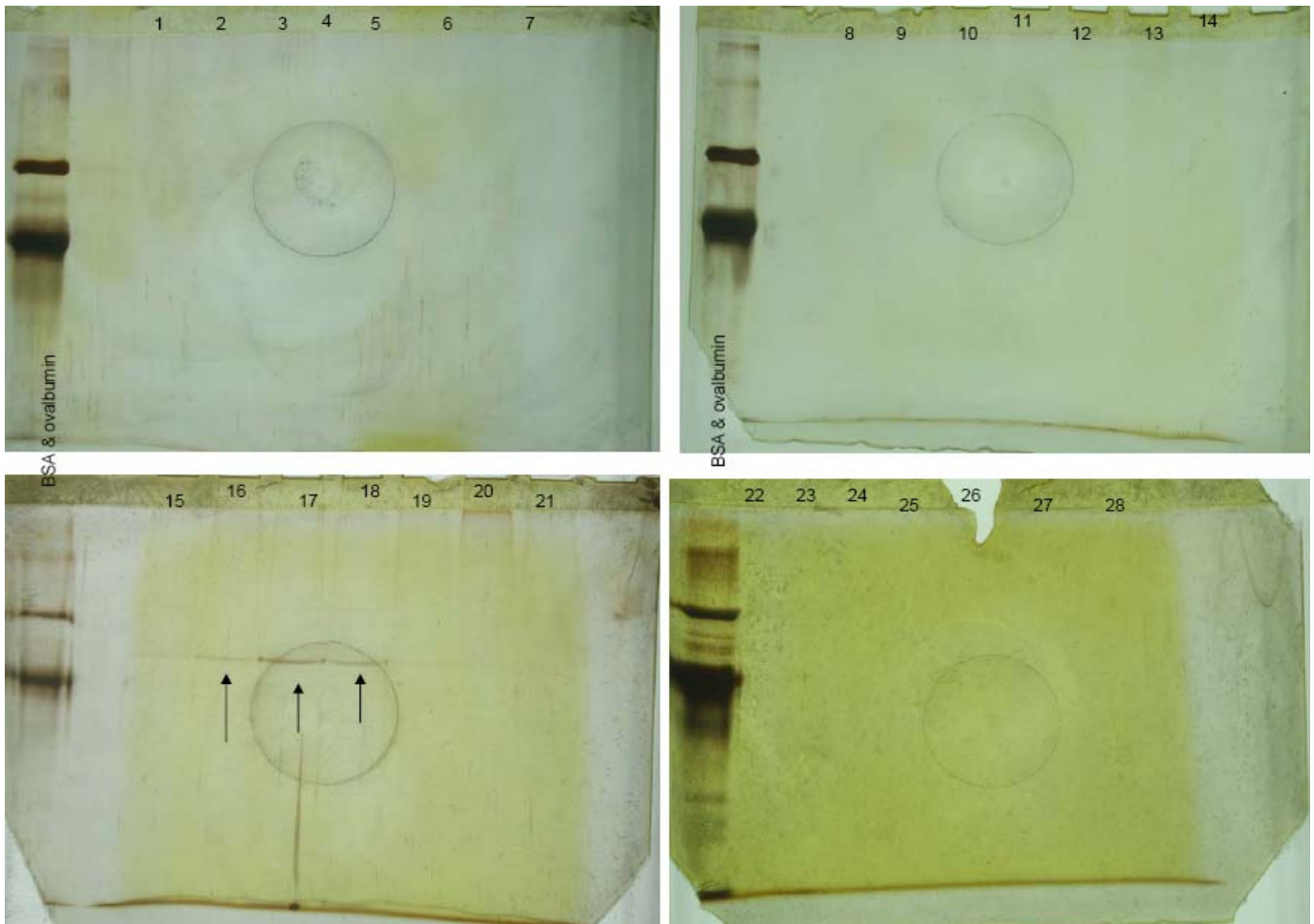


Εικόνα 45 Αυτοραδιογραφία σε μεμβράνη από ανάλυση κατά Northern, σε πηκτική αγαρόζης 0,8%. Έκθεση 7 ημέρες. Σημειώνεται το περίγραμμα της πηκτής. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε DNA με αλληλουχία του PSTVd. Από πάνω: RNA Low Light TEMS-φαινόλη, RNA High Light TEMS-φαινόλη, εκχύλισμα από υγιές φυτό, εκχύλισμα από μολυσμένα High Light φυτά καθαρισμένο με φαινόλη, εκχύλισμα από μολυσμένο High Light φυτά. Είναι εμφανές ότι στο εκχύλισμα χωρίς φαινόλη δεν φαίνεται η έντονη ζώνη, αλλά μια πιο διάχυτη εικόνα, με δύο πιο έντονα σημεία. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιου συμπλόκου PSTVd- πρωτεΐνης. Πάνω, οι μάρτυρες λPstI και PBR 322 Hinf από την ίδια πηκτή, βαμμένοι με βρωμιούχο αιθίδιο.



Εικόνα 46 SDS-PAGE 10% ανάλυση στην μη αποδιατακτική πηκτή. Αριστερά, BSA-οβαλβουμίνη. Το αριστερό τζελ αντιπροσωπεύει τα κομμάτια 8-14, δηλαδή τα 3,5 εγγύτερα προς τα πηγάδια εκατοστά στην ηλεκτραρνητική μεριά του πηκτώματος. Το δεξί τζελ περιέχει τα κομμάτια 15-21, δηλαδή αντιπροσωπεύει τα πρώτα 3,5 εκατοστά της πηκτής προς τον θετικό πόλο. Στο αριστερό πήκτωμα είναι εμφανής η επιμόλυνση σε όλα τα πηγάδια από τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακού βάρους. Στην δεξιά πηκτή, όμως, φαίνεται καθαρά μία διπλή ζώνη σε δύο πηγαδάκια.

Στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκε υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή αγαρόζης 0,8% εκχύλισμα υγιούς φυτικού ιστού. Στην συνέχεια, χωρίστηκε κατά μήκος σε 28 ίσα κομμάτια και μετά την ανάκτηση των πρωτεϊνών με διήθηση με φυγοκέντρηση σε φίλτρο, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE 10%.



Εικόνα 47 SDS-PAGE 10% Από πάνω προς τα κάτω: Κομμάτια 1-7, κομμάτια 8-14, κομμάτια 15-21, κομμάτια 22-28. Στην άκρη κάθε πηκτής έχει φορτωθεί BSA-οβαλβουμίνη ως μάρτυρας μοριακού βάρους. Στην τρίτη πηκτή φαίνονται πάλι οι ίδιες ζώνες με τα μολυσμένα φυτά.

Το συγκεκριμένο πρότυπο εμφανιζόταν με απόλυτη επαναληψιμότητα σε ακόλουθες ηλεκτροφορητικές αναλύσεις. Δεν παρουσιαζόταν κάποια διαφορά ανάμεσα σε εκχυλίσματα από μολυσμένα και υγιή φυτά.

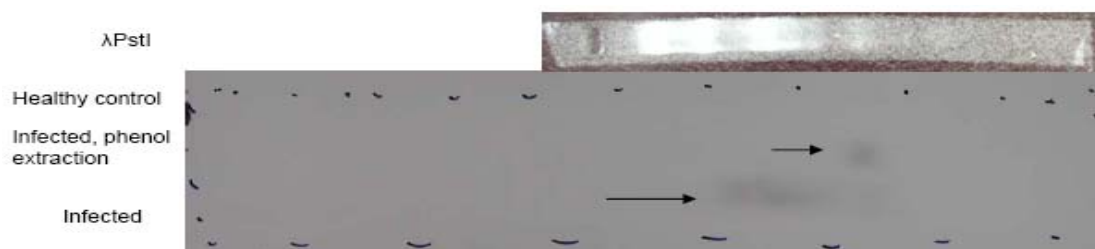
Ούτως ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στην SDS-PAGE και να φανούν ζώνες που δεν είχαν γίνει ορατές, ακολουθήθηκε η εξής στρατηγική: Φορτωνόταν όλο το εκχύλισμα από τα 100μg ιστού σε 4 ή 5 πηγαδάκια ή και σε ένα μεγάλο, ενοποιημένο πηγαδάκι, για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ακολούθως όλα αυτά κόβονταν ανά 0,5 εκατοστά και διηθούνταν με φυγοκέντρηση πάνω από φίλτρο. Το υγρό που συλλεγόταν από κάθε φυγοκέντρηση συγκεντρώθηκε και τελικά λυοφυλλοποιήθηκε με φυγοκέντρηση υπό κενό για 18 ώρες. Το ίζημα που απέμεινε από κάθε διήθημα διαλύθηκε σε SDS-PAGE loading buffer και φορτώθηκε όλο σε πηκτή ακρυλαμίδης 10%. Η συγκέντρωση αλάτων, όμως, ήταν τόσο υψηλή,

που δεν ήταν δυνατόν τα δείγματα να ηλεκτροφορηθούν σωστά (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται).

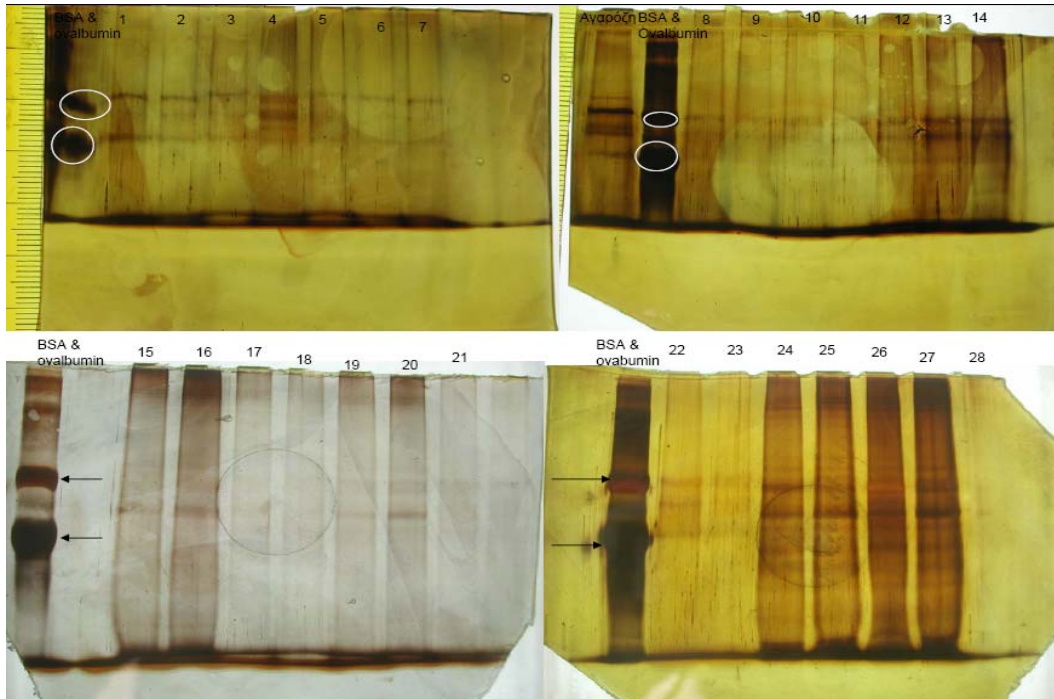
Καθώς δεν ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθεί αυτή η προσέγγιση με επιτυχία, επόμενη δοκιμή ήταν να κοπεί ολόκληρη η λωρίδα που αντιπροσώπευε ένα πηγαδάκι στο πήκτωμα αγαρόζης, να επωαστεί για 18 ώρες σε 0,1% SDS και κατόπιν να εφαρμοστεί πάνω σε πηκτή ακρυλαμίδης 10% και να ηλεκτοφορηθεί. Η χρώση με νιτρικό άργυρο δεν έδειξε καμία ζώνη ή σημάδι στα τζελ, πιθανώς επειδή δεν ήταν δυνατόν να υπάρξει καλή επαφή μεταξύ αγαρόζης και ακρυλαμίδης, ούτως ώστε οι πρωτεΐνες να περάσουν σωστά από την μία πηκτή στην άλλη.

Τέλος, τα αρχικά πειράματα με ανάλυση κατά Northern επαναλήφθηκαν, δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα και με φυτά που είχαν εκτεθεί σε διαφορετικές συνθήκες φωτός.

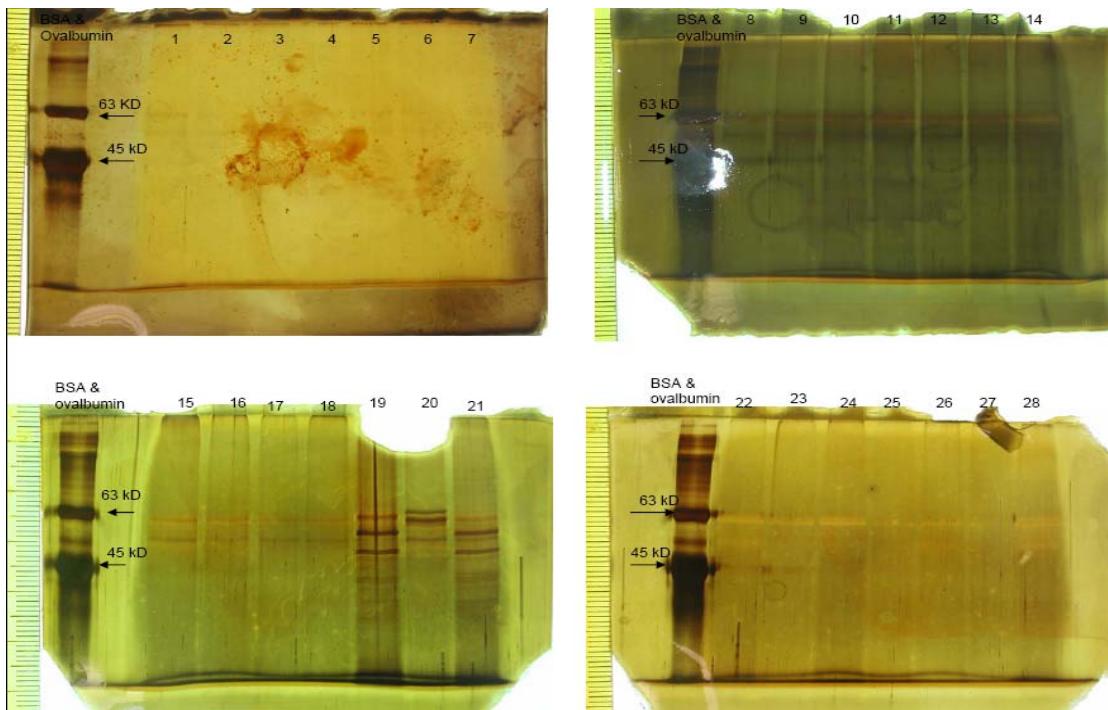
Τελευταίο πείραμα που έγινε για να αυξηθεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στην SDS-PAGE ήταν η κατακρήμνισή τους με ακετόνη. Στην συνέχεια, το ίζημα διαλύθηκε σε 40μl SDS-PAGE loading buffer και φορτώθηκε στην πηκτή ακρυλαμίδης.



Εικόνα 48 Αυτοραδιογραφία από μεμβράνη για Northern. Έκθεση 10 ημέρες. Από πάνω προς τα κάτω: εκχύλισμα από υγιές φυτό, εκχύλισμα από μολυσμένα High Light φυτά καθαρισμένο με φαινόλη, εκχύλισμα από μολυσμένο High Light φυτά. Πάνω, ο μάρτυρας μοριακού μεγέθους λPstI από την ίδια πηκτή.



Εικόνα 49 SDS-PAGE 10% με χρώση νιτρικού αργύρου με τις πρωτεΐνες που ανακτήθηκαν από την πηκτή αγαρόζης από τα υγιή φυτά και στην συνέχεια κατακρημνίστηκαν με 4 όγκους ακετόνη. Από πάνω αριστερά: Δείγματα 1-7, δείγματα 8-14, δείγματα 15-21, δείγματα 22-28. Σε όλες τις πηκτές έχουν ηλεκτροφορηθεί και BSA και οβαλβουμίνη ως μάρτυρες μοριακού βάρους (63kD και 45kD αντίστοιχα). Στο πρώτο πηγάδι της δεύτερης πηκτής έχει φορτωθεί δείγμα αγαρόζης χωρίς πρωτεΐνες. Φαίνεται καθαρά ότι με αυτή την μέθοδο προκύπτουν κάποιες προσμίξεις.



Εικόνα 50 SDS-PAGE 10% με χρώση νιτρικού αργύρου με τις πρωτεΐνες που ανακτήθηκαν από την πηκτή αγαρόζης από τα μολυσμένα φυτά και στην συνέχεια κατακρημνίστηκαν με 4 όγκους ακετόνη. Από πάνω αριστερά: Δείγματα 1-7, δείγματα 8-14, δείγματα 15-21, δείγματα 22-28. Σε όλες τις πηκτές έχουν ηλεκτροφορηθεί και BSA και οβαλβουμίνη ως μάρτυρες μοριακού βάρους (63kD και 45kD αντίστοιχα). Στα δείγματα 19-21 φαίνεται διαφοροποίηση σε σχέση με την εικόνα του υγιούς δείγματος.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης της ντομάτας *Virp2* σε RNA

Με βάση όλα τα πειράματα τα οποία διεξήχθησαν, δεν ήταν δυνατόν να επιβεβαιωθεί οποιαδήποτε πρόσδεση της πρωτεΐνης *Virp2* σε κάποιο στόχο με EMSA. Δοκιμάστηκαν αρκετές διαφορετικές συνθήκες, διαφορετικοί στόχοι, διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου μαγνησίου, EDTA και χλωριούχου ψευδαργύρου, διαφορετικές θερμοκρασίες πρωτύτης επώασης του RNA που ποίκιλλαν από βρασμό μέχρι διατήρηση στους 4C. Όποια προβλήματα παρουσιάστηκαν με επιμολύνσεις στα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα επίσης λύθηκαν. Παρ' όλ' αυτά, όμως, σε κανένα τζελ, είτε αυτά βάφτηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου, είτε εκτέθηκαν για αυτοραδιογραφία, δεν φάνηκε κάποια μετατόπιση ζώνης που θα υποδείκνυε πρόσδεση της *Virp2* στον στόχο.

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα αρχικά πειράματα (Martinez de Alba, Phd thesis 2000) στα οποία βασίστηκαν αυτές οι αναλύσεις δεν είχαν χρησιμοποιήσει EMSA, αλλά βασίζονταν σε σάρωμα cDNA φαγικής βιβλιοθήκης της ντομάτας και ανάλυση κατά Northwestern.

Ενδιαφέρον προκαλούν οι διαφορετικές διαμορφώσεις των μεταγράφων του PSTVd όπως αυτές φαίνονται στις EMSA που βάφτηκαν με νιτρικό άργυρο. Τέτοιες διαφορετικές διαμορφώσεις έχουν περιγραφεί για τα μεταγραφα του ιοειδούς παλιότερα {Pace, 1992} {Hecker, 1988} {Loss, 1991} Καθαρά ως τεχνική, είναι πιο εύκολη από την EMSA με χρήση ραδιενεργά σημασμένου RNA, καθώς όλοι οι χειρισμοί είναι πιο απλοί, ενώ δεν απαιτούνται οι απαραίτητες προφυλάξεις από την ραδιενέργεια. Εξυπακούεται, ότι όσο αυτό είναι δυνατό, είναι και σκόπιμο να περιορίζεται η έκθεση σε οποιαδήποτε ιονίζουσα ακτινοβολία. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την χρώση με νιτρικό άργυρο (Schumacher et al. 1983) είναι πολύ αξιόπιστο, ενώ δεν φάνηκε καμία διαφοροποίηση στην αξιοπιστία ή την ευαισθησία της μεθόδου χωρίς την προσθήκη NaBH₄. Η μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με την αυτοραδιογραφία μπορεί εύκολα να αναπληρωθεί, καθώς όλοι οι χειρισμοί είναι ευκολότεροι και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα μεταγράφου, με μόνο αρνητικό σημείο το αυξημένο κόστος σε αναλώσιμα, όπως

RNA πολυμεράση, νουκλεοτίδια και εκμαγείο για το μετάγραφο. Από την άλλη, η αυξημένη διακριτική ικανότητα σε αυτό το πείραμα έδειξε μια λεπτή διαφορά στην ηλεκτροφορητική συμπεριφορά, η οποία υπό άλλες συνθήκες θα μπορούσε να είναι καθοριστική. Ένα μειονέκτημα της χρώσης με άργυρο είναι ότι βαφονται συγρότως και τα νουκλεϊνικά, και οι πρωτείνες, και έτσι για να διαχωριστεί τι είναι τι, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επώσεις με πρωτεΐνη μόνη, χωρίς RNA καθώς και με πρωτεάση και RNAση χωριστά .

Για τα πειράματα που έγιναν με ανάλυση Northwestern, αρχικά ο θόρυβος ήταν μεγάλο πρόβλημα στα πρώτα πειράματα, αλλά κι όταν αυτό λύθηκε, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος με χαμηλότερη συγκέντρωση $MgCl_2$ και $ZnCl_2$ δεν φάνηκε κάποιο σήμα. Πολύ πιθανόν το πρωτόκολλο επαναδιάταξης των πρωτεϊνών να ήταν ανεπαρκές. Άλλωστε, πολλές φορές οι πρωτεΐνες είναι λειτουργικές σε στερεοδιαμόρφωση που δεν είναι συνολικά ευνοούμενη και βασίζεται για την διατήρησή της σε κάποια τοπικά ελάχιστα ελεύθερη ενέργειας (Frydman 2001, Horwich, 2002). Εξελικτικά, αυτό φαίνεται από την καθολική ύπαρξη και συντήρηση πρωτεϊνών Hsp και τσαπερονινών (συνοδών πρωτεϊνών). Οι τσαπερονίνες βοηθούν αρτιγενείς πρωτεΐνες να πάρουν την κατάλληλη διαμόρφωση, ενώ τα συστήματα Hsp (Heat Shock Protein), που επάγονται από το θερμικό σοκ, έχουν ρόλο κυρίως στην επαναδιάταξη μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Bukau & Horwich, 1998) . Ακριβώς λόγω της συντήρησής τους, θα μπορούσαν να βοηθούν να πάρει η Virp2 την σωστή της διαμόρφωση κατά την υπερέκφραση του γονιδίου της σε βακτηριακά κύτταρα, αλλά μετά από μία SDS-PAGE όχι μόνο θα είχαν αποδιαταχθεί, αλλά θα είχαν και απομακρυνθεί από τα μόρια της Virp2, τα οποία δεν θα μπορούσαν να πάρουν αυθόρμητα την κατάλληλη διαμόρφωση. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο πρωτόκολλο επαναδιάταξης, χρησιμοποιώντας, πχ, Guanidinium chloride σε προοδευτικά φθίνουσες συγκεντρώσεις.

Τα πειράματα με dot blot έδωσαν μία διαφορετική εικόνα. Πρώτον, πρέπει να τονιστεί ότι ως μέθοδος ήταν πολύ πιο κοντά στα πρωτόκολλα με τα οποία είχαν παραχθεί τα αρχικά αποτελέσματα, αφού δεν γίνεται ούτε ηλεκτροφόρηση του συμπλόκου, ούτε αποδιάταξη της πρωτεΐνης μετά τον καθαρισμό. Η Virp2 έδειξε ότι προσδένεται σε διάφορους στόχους, τόσο σε RNA όσο DNA, με πολύ διαφορετικές αλληλουχίες. Με εξαίρεση μια μικρή περιοχή ομολογίας του PSTVd με το pBluescript SK, οι υπόλοιποι στόχοι δεν είχαν κάποια ουσιαστική ομοιότητα.

Score = 22.9 bits (24), Expect = 0.14

Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
Query 111 CCCTTCCTTTCT 122
          |||
Sbjct 107 CCCTTCCTTTCT 118
```

Score = 21.1 bits (22), Expect = 0.51

Identities = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query 218 AACCGCTTTTT 228
          |||
Sbjct 2396 AACCGCTTTTT 2386
```

Η μέθοδος φάνηκε να αποδίδει καλά, καθώς ούτε το UTP, ούτε οι διάφορες άλλες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν σήμα. Τα πειράματα που έγιναν με τις αντιδράσεις μετουσίωσης των βάσεων δείχνουν να επιβεβαιώνουν ότι η αλληλεπίδραση της Virp2 με τα νουκλεϊκά οξέα δεν είναι ειδική, καθώς, με εξαίρεση τις περιπτώσεις όπου το RNA είχε καταστραφεί εντελώς, στις μεμβράνες συνέχιζε να εμφανίζεται σήμα.

Είναι πιθανό, η ασθενής προσδεση στα dot blots να οφείλεται σε μη εξειδικευμένη προσδεση του (αρνητικά φορτισμένου) σκελετού φωσφοδιεστερικων-ριβοζης και -δεσοξυριβοζης του RNA και DNA με θετικά φορτισμένα αμινοξέα της πρωτεΐνης, και όχι σε εξειδικευμένη αλληλεπίδραση διαμόρφωσης των βάσεων με την πρωτεΐνη. Τα πειράματα χημικής μετατροπής των βάσεων (γλυοξαλη, πιπεριδίνη/υδρακίνη) αυτό υποδεικνύουν.

Από τεχνικής άποψης, στην συγκεκριμένο μέθοδο, από τις διάφορες μεταβλητές που εξετάστηκαν, η μόνη που έδειξε να έχει ουσιαστική σημασία ήταν η ποσότητα δισθενών μετάλλων που χρησιμοποιούνταν στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η μονιμοποίηση της πρωτεΐνης με υπεριώδες φως πάνω στην μεμβράνη δεν είχε κάποια ορατή επίδραση, ενώ μεμβράνες τόσο για σάρωμα φαγικής βιβλιοθήκης, όσο και για ανάλυση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία. Η «ηλικία» και η κατάσταση της μεμβράνης έδειξε να παίζει πολύ σημαντικότερο ρόλο από τον τύπο της.

Αναφορικά με τα δισθενή ιόντα, ο ρόλος τους είχε ήδη τονιστεί από τους Saegesser et al. (Nucleic acids research, 1997), σε μια δημοσίευση όπου αναλύεται, εκτός των άλλων, ο ρόλος των δισθενών μετάλλων σε διάλυμα της αντίδρασης στην ανάλυση μιας φαγικής βιβλιοθήκης. Τα αποτελέσματα των δικών μας πειραμάτων συμφωνούν απόλυτα με αυτή την δημοσίευση, καθώς το SB με 0,1mM ZnCl₂ και

0,1mM MnCl₂ έδινε πολύ καλύτερη αναλογία σήματος προς υπόβαθρο, σε σχέση με το SB που περιείχε 0,1%w/v ZnCl₂ και 0,1% w/v MnCl₂ (7,33mM ZnCl₂ και 7,95mM MnCl₂). Αν και εξετάστηκε η πιθανότητα, η πρόσδεση της πρωτεΐνης στα νουκλεϊκά οξέα να γίνεται μόνο σε αυτό το διάλυμα, αναλύσεις με EMSA δεν έδειξαν κάποια μετατόπιση ζώνης.

Συνοψίζοντας για το πρώτο μέρος, τα dot blot έδειξαν σταθερά, επαναλήψιμα αποτελέσματα που στηρίζουν την υπόθεση ότι η Virp2 προσδένει ασθενώς νουκλεϊκά οξέα. Το γεγονός ότι δεν κατέστη δυνατό να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο με EMSA δείχνει ότι τα σύμπλοκα ήταν πολύ ασθενή, με αποτέλεσμα πιθανά να διαλύονται πρακτικά αμέσως στην ηλεκτροφόρηση. Αν η αλληλεπίδραση δεν ήταν τόσο ασθενής, στις αυτοραδιογραφίες θα φαινόταν ένα 'επίχρισμα' (Smear) καθώς τα σύμπλοκα θα διαλύονταν σταδιακά, και το κάθε μόριο θα ξεκινούσε να ηλεκτροφορείται χωρίς την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε διαφορετική χρονική στιγμή. Αντ' αυτού, σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν, η ζώνη των νουκλεϊκών οξέων φαινόταν πολύ καθαρά στο ίδιο ύψος, είτε είχε προστεθεί πρωτεΐνη, είτε όχι.

Επίσης, είναι μάλλον σαφές με βάση τα παραπάνω πειράματα ότι η πρόσδεση της Virp2 σε RNA δεν βασίζεται σε κάποια ειδική αναγνώριση με βάση αλληλουχία ή τριτοταγή δομή. Η πλειάδα στόχων τους οποίους προσδένει, μάλλον δείχνει ότι πρόκειται για κάποια πρωτεΐνη η οποία γενικά προσδένει νουκλεϊκά οξέα, η δε πρόσδεση αυτή οφείλεται πιθανόν μάλλον σε αλληλεπίδραση με τον φωσφοδιεστερικό σκελετό και λιγότερο με τις βάσεις του RNA ή DNA.

Περαιτέρω πειράματα θα μπορούσαν να στοχεύσουν είτε στην σταθεροποίηση του συμπλόκου της πρωτεΐνης με το RNA, είτε στην ταυτοποίηση ποιιάς περιοχής της πρωτεΐνης είναι αυτή που προσδένει τα νουκλεϊκά οξέα.

Η πρώτη προσέγγιση θα βασιζόταν στην προσθήκη Ca²⁺ στο διάλυμα της EMSA, όσο και στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, με την προοπτική ότι τα δισθενή ιόντα θα σταθεροποιούσαν το σύμπλοκο Virp2-RNA επιτρέποντας την διατήρηση του κατά την ηλεκτροφόρηση. Υπάρχουν και αναφορές ότι μικρές δομές RNA έχουν υψηλότερη συγγένεια για νικέλιο ή μαγγάνιο παρά για άλλα δισθενή μέταλλα (Hofmann, 1997).

Ακόμα ευαίσθητες δομές RNA που λειτουργούν ως διακόπτες ('riboswitches') παρουσιάζουν αλλαγή στην δομή τους και παρουσία άλλων μεταβολιτών και χρησιμοποιούνται για μετά-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση, ενώ υπάρχει και ένα παράδειγμα του TPP-riboswitch, που υπάρχει και στα φυτά (Bocobza 2007). Μία

ρυθμιστική περιοχή προσδένει τον στόχο, προκαλώντας αλλαγές στην λειτουργική περιοχή (Bocobza 2008). Κάποιες τέτοιες λεπτές μεταβολές θα μπορούσαν να επηρεάζουν την δομή του PSTVd, υποβοηθώντας, ή εμποδίζοντας την πρόσδεσή της Virp2.

Εναλλακτικά, θα μπορούσε να προστεθεί GABA σε συγκεντρώσεις nM στο διάλυμα της αντίδρασης και της ηλεκτροφόρησης. In silico αναλύσεις έδειξαν ότι η Virp2 έχει μία περιοχή τρανσαμινάσης του GABA (Καραντεμίρης, μεταπτυχιακή διατριβή 2005). Αν η Virp2 πράγματι προσδένει GABA, αυτό θα μπορούσε να δρα ρυθμιστικά, αλλάζοντας την στερεοδιαμόρφωσή της, ώστε να σταθεροποιεί την αλληλεπίδρασή της με τα νουκλεϊκά οξέα.

Η μελέτη για ποιο τμήμα της Virp2 αλληλεπιδρά με τον στόχο θα βασιζόταν σε πέψη του γονιδίου της Virp2 με περιοριστικά ένζυμα για να δημιουργηθούν τμήματα τα οποία θα μπορούσαν να κλωνοποιηθούν και να μεταφραστούν ξεχωριστά. Ιδανικά, το ένα τμήμα θα συνέχιζε να προσδένει RNA dot blot, ενώ το άλλο όχι. Έτσι, προοδευτικά, θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί, με την βοήθεια και in silico εργαλείων μια μικρή αμινοξική αλληλουχία που ευθύνεται για την πρόσδεση των νουκλεϊκών οξέων από την συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Η συγκεκριμένη προσέγγιση πιθανόν να εγκυμονούσε προβλήματα, καθώς, αν αποκόπτονταν μια ρυθμιστική αλληλουχία, ή ένα σημαντικό δομικό κομμάτι της πρωτεΐνης, το υπόλοιπο τμήμα της δεν θα μπορούσε να λάβει την κατάλληλη διαμόρφωση για να προσδέσει νουκλεϊκά οξέα.

2. Συζήτηση για την ηλεκτροφορητική ανάλυση εκχυλισμάτων φύλλων τομάτας

Με βάση τις αναλύσεις κατά Northern επιβεβαιώθηκε ότι σύμπλοκα του PSTVd με πρωτεΐνες του φυτού υπάρχουν σε μολυσμένα φύλλα και είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη και στην συνέχεια σε ακρυλαμίδη. Τα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα και σταθερά και ήταν ουσιαστικά ίδια και για φυτά που είχαν εκτεθεί σε υψηλές ποσότητες φωτός.

Αναφορικά με την δυνατότητα ανάκτησης πολυπεπτιδίων ή νουκλεϊκών οξέων με απλή φυγοκέντρηση της αгарόζης, η μέθοδος δείχνει να λειτουργεί αποτελεσματικά. Με υψηλή επαναληψιμότητα ανακτήθηκαν πρωτεΐνες από πηκτές αгарόζης, δίνοντας

τις ίδιες ζώνες μετά από ανάλυση του υγρού που ανακτώνταν από την φυγοκέντρωση μετά από SDS-PAGE 10%. Πειράματα έδειξαν ότι είναι δυνατόν να ανακτηθεί και DNA και RNA, με αυτή την πολύ απλή διαδικασία, χωρίς να χρειαστεί ειδική επεξεργασία και θέρμανση για να λιώσει η αγαρόζη, όπως γίνεται με το kit της Macherey-Nagel, όπου η θέρμανση θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του RNA. Βεβαία, απομένει να αποδειχθεί ότι το επανακτώμενο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ενζυματικές αντιδράσεις, όπου απαιτείται μεγάλη καθαρότητα από προσμίξεις της αγαρόζης

Δυστυχώς, προσμίξεις στο υγρό που συλλέγεται μετά την φυγοκέντρωση καθιστούσαν τις μετρήσεις του φωτομέτρου πολύ αναξιόπιστες, κάτι που ισχύει και για το kit της Macherey-Nagel. Όμως, με βάση την εικόνες από τα πηκτώματα αγαρόζης και SDS-PAGE, φαίνεται ότι η ανάκτηση των πολυπεπτιδίων βρίσκεται στα επίπεδα του 50%. Αυτό το ποσοστό είναι τουλάχιστον συγκρίσιμο με την αποτελεσματικότητα του εμπορικού kit που χρησιμοποιούταν για τον καθαρισμό DNA από πηκτές αγαρόζης. Είναι μία μέθοδος που φαίνεται αποτελεσματική και είναι πολύ απλή στην εκτέλεσή της, δίνοντας έτσι την δυνατότητα για ανάλυση εκχυλισμάτων πρώτα με βάση το φορτίο των πολυπεπτιδίων ή άλλων συμπλόκων, σε μη αποδιατακτική πηκτή αγαρόζης, και ακολούθως με βάση το μοριακό του βάρος, σε SDS-PAGE. Με εξαίρεση των σχετικά μεγάλο αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων και ακρορυγίων με φίλτρο που απαιτούνται, και του αντίστοιχου φόρτου εργασίας, η μέθοδος αυτή έχει μικρό κόστος, ενώ απαιτεί και σχετικά απλό εξοπλισμό βιοχημικού εργαστηρίου.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου απαιτείται κάποια προσοχή σε συγκεκριμένες λεπτομέρειες. Για την ομαλή διήθηση όλων των δειγμάτων, είναι σκόπιμο όλα τα ακρορύγχια να κόβονται ακριβώς στο ίδιο ύψος. Πολύ σημαντικότερο είναι το γεγονός ότι συνήθως ένα μέρος του υγρού που περνάει το φίλτρο παγιδεύεται στο κάτω μέρος του ακρορύγχιου. Είναι απαραίτητο να συλλεχθεί και αυτό, καθώς μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα πολύ σημαντικό ποσοστό του συνολικού όγκου του υγρού που διηθήθηκε. Τέλος, όπως τονίστηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, αυτή η μέθοδος απαιτεί αρκετά μεγάλες ποσότητες από αναλώσιμα. Για την ανάλυση μια πηκτής μήκους 14 εκατοστών, για παράδειγμα, τυπικά απαιτούνται 56 δοκιμαστικοί σωλήνες των 1,5 ml και 28 ακρορύγχια με φίλτρο.

Ο αρχικός σκοπός ήταν να συνδυαστούν αυτές οι δύο μέθοδοι, ούτως ώστε να φανεί ποιες πρωτεΐνες βρίσκονται στο σημείο όπου βρίσκεται το RNA του ιοειδούς μετά την ηλεκτροφόρηση του εκχυλίσματος, και ακολούθως να ταυτοποιηθεί εάν κάποια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι που αλληλεπιδρά με το RNA του.PSTVd.

Για την εξυπηρέτηση αυτού του σκοπού, η μέθοδος που χρησιμοποιείται έχει ένα μειονέκτημα. Δεν είναι εύκολο να ανακτηθεί επαρκής ποσότητα πρωτεϊνών για να φανεί σε SDS-PAGE με χρώση νιτρικού αργύρου, πολλώ δεν μάλλον με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. Ενδεικτικά, για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 100mg ιστού, από τα οποία ένα ποσοστό της τάξης του 70% είναι απλά νερό. Στα υπόλοιπα 30mg περιέχονται κυτταρικά τοιχώματα και υπόλοιπα μακρομόρια, που καθιζάνουν με την φυγοκέντρηση, καθώς και σάκχαρα, νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Υπό ιδανικές συνθήκες, το κατώτερο όριο ανίχνευσης για μία πρωτεΐνη για την χρώση με νιτρικό άργυρο είναι περίπου 10ng. Αυτό το όριο αντιστοιχεί περίπου σε λιγότερο από 1ppm σε σχέση με την ξηρή μάζα του ιστού που χρησιμοποιείται για το πείραμα, οπότε δεν θα έπρεπε να είναι απαγορευτικό για την ανίχνευση των πρωτεϊνών.

Όμως, μόνο μια διπλή ζώνη εμφανιζόταν στα πηκτώματα SDS-PAGE 10%, τόσο σε μολυσμένα όσο και σε υγιή φυτά και με μεγάλη επαναληψιμότητα. Με βάση το μοριακό της βάρος αλλά και το σημείο στο οποίο εμφανιζόταν οριζόντια, πιθανότατα να είναι η μεγάλη υπομονάδα της Rubisco, με MB 52,94kDa και εκτιμώμενο pI 7.01. Με δεδομένο, άλλωστε, ότι η Rubisco είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη στην φυτική βιόσφαιρα, είναι λογικό ότι σε ένα τέτοιο πείραμα θα ήταν και η πρωτεΐνη που θα είναι πιο εύκολο να ανιχνευτεί.

Η λύση είναι θεωρητικά απλή: να αυξηθεί στο μέγιστο η ποσότητα πρωτεϊνών που φορτώνονται στο πήκτωμα της SDS-PAGE. Για αυτόν τον σκοπό, όλο το εκχύλισμα φορτωνόταν σε όσα πηγάδια της πηκτής αγαρόζης χρειάζονταν και όλο αυτό το τμήμα του τζελ κοβόταν σε κομμάτια με μήκος 0,5 εκατοστά και διηθούταν μέσω φυγοκέντρησης πάνω από φίλτρο. Στην συνέχεια, δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες, ούτως ώστε στην συνέχεια να διαλυθούν σε αρκετά μικρό όγκο loading buffer ώστε όλο το διάλυμα να φορτωθεί σε ένα πηγαδάκι της πηκτής SDS-PAGE 10%. Πρώτα, δοκιμάστηκε να λυοφυλοποιηθούν, με φυγοκέντρηση υπό κενό για 18 ώρες, όμως το πρόβλημα ήταν ότι εκτός από τις πρωτεΐνες, κατακρημνίζονταν αναπόφευκτα και τα άλατα από το TBE που είχε χρησιμοποιηθεί για την ηλεκτροφόρηση. Το αποτέλεσμα ήταν ότι

τελικά το ίζημα είχε τόσα άλατα που ήταν πολύ δύσκολο να διαλυθεί, αλλά ακόμα κι όταν διαλυόταν σε TBE πάλι δεν ηλεκτροφορούταν σωστά.

Η επόμενη προσέγγιση είχε να κάνει με την κατακρήμνιση επιλεκτικά των πρωτεϊνών με την χρήση ακετόνης. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο παρουσίασε πολύ λιγότερα προβλήματα και φάνηκε να δίνει ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν χωρίς προβλήματα και μάλιστα φάνηκε και κάποια διαφορά στο πρότυπο των ζωνών ανάμεσα στα μολυσμένα και τα υγιή φυτά, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ζωνών στα μολυσμένα φυτά παρουσιαζόταν περίπου στο ύψος όπου εμφανίζεται η ζώνη του ιοειδούς στην ανάλυση κατά Northern. Το αρνητικό είναι ότι το δείγμα ελέγχου, που περιείχε υγρό από την πηκτή αγαζόρης χωρίς πρωτεΐνες, έδειξε και αυτό καθαρά κάποιες ζώνες, επομένως η συγκεκριμένη αγαρόζη που χρησιμοποιήθηκε για αυτό το πείραμα (Seakem® LE Agarose, Lonza No. 50004) δεν είναι η ιδανική για αυτό το πρωτόκολλο. Μια σύγκριση ανάμεσα σε διαθέσιμες αγαρόζες από το εμπόριο θα έδειχνε αρκετά απλά ποιά έχει τις λιγότερες, ή και καθόλου προσμίξεις και επομένως, ποια είναι καταλληλότερη για αυτό το πρωτόκολλο.

Συνοψίζοντας, η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση εκχυλίσματος φυτικού ιστού δείχνει καθαρά ότι κάποια ή κάποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το PSTVd in vivo. Ακόμα, η διήθηση των κομματιών πηκτής αγαρόζης μέσω φυγοκέντρησης είναι μία πρωτότυπη, απλή μέθοδος, που δίνει σταθερά και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Χρειάζονται περεταίρω πειράματα για να διευκρινιστούν όλες οι παράμετροί της, και κυρίως η απόδοσή της, ενώ θα ήταν χρήσιμο και να βρεθεί κάποια εναλλακτική για τα ακρορύγχια με φίλτρο, πάντως είναι μία μέθοδος που φαίνεται πολλά υποσχόμενη και ενδιαφέρουσα, τουλάχιστον για μια πρώτη ανάλυση συμπλοκών, (πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων) που μπορούν να μετακινηθούν με ηλεκτροφόρηση. Είναι πιθανό, να είναι δυνατή η σύγκριση τέτοιων συμπλόκων από δύο ή περισσότερες καταστάσεις (π.χ υγιή/ μολυσμένα δείγματα, καταπονημένα/μη καταπονημένα, κλπ.) και εφόσον η ποσοστιαία των συμπυκνωμένων πρωτεϊνών είναι αρκετή, να ταυτοποιηθούν αυτές που διαφέρουν.

6. Βιβλιογραφία

1. Abraitene, Zhao, Hammond, 2008, "Nuclear targeting by fragmentation of the Potato spindle tuber viroid genome", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (2008) σελ. 470–475
2. Baker, Owens, Whitker, Mock, Roberts, Deahl, Averyanov, 2010, "Effect of viroid infection on the dynamics of phenolic metabolites in the apoplast of tomato leaves", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74 (2010) Σελ. 214-220
3. Bendicho Arcas, 2011, "Electrophoretic analysis of extract's plants infected with PSTVd viroid" αναφορά πρακτικής εργαστηριακής άσκησης, Πρόγραμμα Erasmus, Πανεπιστήμιο Κρήτης
4. Bocobza & Aharoni, 2008, "Switching the light on plant riboswitches", *Trends in Plant Science* Vol.13 No.10
5. Bocobza, Adato, Mandel, Shapira, Nudler, Aharoni, 2007, "Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom" *Genes and development*
6. Boubourakas, Voloudakis, Fasseas, Resnick, Koltai, Kyriakopoulou, 2011, "Cellular localization of Peach latent mosaic viroid in peach sections by liquid phase in situ RT-PCR", *Plant Pathology* (2011) 60, σελ. 468–473
7. Bown & Shelp, 1997, "The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid" *Plant Physiology* 115 σελ 1-5
8. Bukau & Horwich, 1998, "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines" *Cell* 92, σελ. 351-366
9. Carbonell A., Flores R., Gago S., 2011, "Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: in vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA", *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 6 σελ. 2432–2444
10. Carbonell A, Martínez de Alba AE, Flores R, Gago S., 2008, "Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families.", *Virology*. 2008 Feb 5;371(1): σελ. 44-53
11. Chuba & Palchaudhuri, 1985, "Requirement for Cysteine in the Color Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels", *Analytical Biochemistry* 156, σελ. 136-139
12. Ciomperlik, Omanov, Schophof, 2011, "An antiviral RISC isolated from Tobacco rattle virus-infected plants" *Virology* 412 σελ. 117-124
13. Clark, Leo, Dhanoa, Cauwenberghe, Mullen, Shelp. 2009, "Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis γ -aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate" *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 6, σελ. 1743–1757

14. Daros, Elena, Flores, 2006, "Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth" *EMBO Reports*
15. Diener, Hammond, Black, Katze, 1993, "Mechanism of viroid pathogenesis: Differential activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, Mr 68 000 protein kinase by viroid strains of varying pathogenicity", *Biochimie* (1993) 75, σελ. 533-538
16. Dierman, Matousek, Junge, Riesner, Steger, 2010, "Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato", *Biol. Chem.*, Vol. 391, σελ. 1379–1390
17. Ding, 2010, "RNA-based antiviral immunity", *Nature reviews* Vol.10 σελ 632- 644
18. Ding, B. 2009, "The Biology of Viroid-Host Interactions", *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009. 47: σελ.105–31
19. Doetsch, Schroeder, Fuertig, 2011, "Transient RNA–protein interactions in RNA folding", *FEBS Journal* 278 (2011) σελ. 1634–1642
20. Du, Topp, Dawe, 2010, "DNA Binding of Centromere Protein C (CENPC) Is Stabilized by Single-Stranded RNA", *PLoS Genetics* February 2010 Volume 6 Issue 2
21. Eiras, Norales, Kitajima, Flores, Daros, 2011, "Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind in vitro specifically Potato spindle tuber viroid RNA", *Arch Virol* (2011) 156:σελ. 529–533
22. Felty, Wong, Wahid, Conn, Cole, 2010, "Magnesium-Dependent Interaction of PKR with Adenovirus VAI RNA", *Journal of Molecular biology*, 2010 Oct 1;402(4) σελ.638-44.
23. Flores, Delgado, Gas, Carbonel, Molina, Gago De la Pena, 2004, "Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication"
24. Forde, Lea, 2001, "Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 9, σελ.. 2339–2358
25. Frydman, 2001, "Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperonins", *Ann. Rev. Biochem.* 70, σελ. 603-640
26. Gaz, Hernandez, Flores, Daros, 2007, "Processing of Nuclear Viroids In Vivo: An Interplay between RNA Conformations", *PLoS Pathogens*
27. Gomez, Martinez, Pallas, 2008, "Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* Plants Are Dependent on RDR6 Activity", *Plant Physiology*, Vol. 148, σελ. 414–423
28. Gozmanova, Denti, Minkov, Tsagris, Tabler, 2003, "Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1", *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 19, σελ. 5534-5543
29. Greco-Stewart, Thibault, Pechat, 2006, "Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA", *Virology* 356 (2006) σελ. 35–44
30. Gudima, Chang, Taylor, 2006, "Restoration in vivo of defective hepatitis delta virus RNA genomes", *RNA* (2006), 12: σελ. 1061–1073

31. Hammond, Zhao, 2000, "Characterization of a Tomato Protein Kinase Gene Induced by Infection by Potato spindle tuber viroid", *MPMI* Vol. 13, No. 9, 2000, σελ. 903–910
32. Harada, 2010, "Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants", *Scientia Horticulturae*, 125, σελ 545-550
33. Hofmann, Limmer, Hornung, Sprinzl, 2006, "Ni²⁺ binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and G-A base pair" *RNA* 1997 3: σελ. 1289-1300
34. Horwich, 2002, "The discovery of protein folding by chaperonins"
35. Huisinga & Elgin, 2009, "Small RNA directed heterochromatin formation in the context of development: what flies might learn from fission yeast", *Biochim Biophys Acta*. 2009 January ; 1789(1): σελ. 3–16.
36. Hutchins, Rathjen, Forster, Symons, 1986, "Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid", *Nucleic Acid Research* Volume 14 Number 9 σελ. 3627-40
37. Itaya, Matsuda, Gonzales, Nelson, Ding, 2002, "Potato spindle tuber viroid Strains of Different Pathogenicity Induces and Suppresses Expression of Common and Unique Genes in Infected Tomato", *The American Phytopathological society* σελ 990-9
38. Itaya, Filimonov, Matsuda, Nelson, Ding, 2001, "Potato spindle tuber viroid as Inducer of RNA Silencing in Infected Tomato", *Molecular Plant Microbe interactions* 2001 Nov;14(11) σελ. 1332-4
39. Kalantidis, Denti, Tzortzakaki, Marinou, Tabler, Tsagris, 2007, "Virp1 Is a Host Protein with a Major Role in Potato Spindle Tuber Viroid Infection in Nicotiana Plants", *JOURNAL OF VIROLOGY*, Dec. 2007, σελ. 12872–12880
40. Kalantidis, Schumacher, Alexiadis, Helm, 2008, "RNA silencing movement in plants", *Biol. Cell* (2008) 100, 1σελ. 3–26
41. Kandel, Schwartz, Jessell, Βασικές αρχές Νευροβιολογίας, , Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης
42. Karantemiris, 2005, «Προς την λειτουργική ανάλυση αλληλεπιδρώντων με PSTVd πρωτεϊνών», πτυχιακή εργασία μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Κρήτης
43. Keese & Symons, 1985, "Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 82, σελ. 4582-4586
44. Kettenberger, Eisenfuer, Brueckner, Theis, Famulok, Cramer, 2006, "Structure of an RNA polymerase II- RNA inhibitor complex elucidates transcription regulation by non-coding RNAs", *Nature Structural & molecular biology* Vol. 13, No.1 Jan. 2006
45. Kim YK, Heo I, Kim VN, 2010, "Modifications of Small RNAs and Their Associated Proteins" *Cell* 143 σελ 703-709

46. Law, Jacobsen, 2010, "Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals", *Nature Reviews*, Vol. 11, March 2010
47. Lewin, 2004, *GENES VIII*, Pearson Prentice Hall, Ακαδημαϊκές εκδόσεις
48. Llave, 2010, "Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant–virus interactions", *Trends in Plant Science*, December 2010, Vol. 15, No. 12, σελ 701-707
49. Ma, 2003, "Plant Reproduction: GABA Gradient, Guidance and Growth", *Current Biology* vol. 13, σελ 834-836
50. Maniataki, Martinez, Saegesser, Tabler, Tsagris, "Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1" *RNA* (2003), 9: σελ.346–354
51. Manoussopoulos & Tsagris, 2009, "Native Electrophoresis and Western Blot Analysis: method and applications", *Methods in Molecular biology, protein blotting and detection*, vol. 535
52. Manoussopoulos, Maiss, Tsagris, 2000, "Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues", *Journal of General Virology* (2000), 81, sel. 2295–2298
53. Martinez de Alba, 2000, "Isolation and characterization of viroid binding proteins", *διαδακτορική διατριβή*, Universiadd del Pais Vasco 2000
54. Martinez de Alba, Denti, Tabler, 2004, "Northwestern Techniques for the Identification of RNA-binding Proteins from cDNA Expression Libraries and the Analysis of RNA–Protein Interactions"
55. Martinez de Alba, Saegesser, Tabler, Tsagris, 2003, "A Bromodomain-Containing Protein from Tomato Specifically Binds Potato Spindle Tuber Viroid RNA In Vitro and In Vivo", *JOURNAL OF VIROLOGY*, Sept. 2003, σελ. 9685–9694
56. Maxam & Gilbert, 1977, "A new method for sequencing DNA", *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 2, σελ. 560-564
57. Merril, Goldman, Sedman, Ebert, 1981, "Ultrasensitive Silver Stain for Proteins", *Science* 211 σελ. 1437-8
58. Michaeli, Fait, Lagor, Nunes-Nesi, Grillich, Yellin, Bar, Khan, Fernie, Turano, Fromm, 2011, "A MITOCHONDRIAL GABA PERMEASE CONNECTS THE GABA SHUNT AND THE TCA CYCLE AND IS ESSENTIAL FOR NORMAL CARBON METABOLISM", *The plant journal*
59. Mirouze, Paszkowski, 2011, "Epigenetic contribution to stress adaptation in plants", *Current Opinion in Plant Biology* 2011, 14: σελ. 267–274
60. Molnar, Melnik, Baulcombe, 2011, "Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs", *Genome Biology*, 12:215

61. Navarro, Pantaleo, Gisel, Moxon, Dalmay, Bisztray, Di Serio, Burgyan, 2010, "Deep Sequencing of Viroid-Derived Small RNAs from Grapevine Provides New Insights on the Role of RNA Silencing in Plant-Viroid Interaction", PLoS November 2009 Volume 4 Issue 11
62. Navarro J.A., Vera A., Flores R., "A Chloroplastic RNA Polymerase Resistant to Tagetitoxin Is Involved in Replication of *Avocado Sunblotch Viroid*" *Virology* 268, σελ.218-225
63. Novakova, Man, Novak, Hozak, Hodny, 2006, "Separation of nuclear protein complexes by blue native polyacrylamide gel electrophoresis", *Electrophoresis* 2006, 27, σελ. 1277–1287
64. Pace, Branch, Robertson, 1992, "Generation of viroid conformational isomers that are stable to incubation with- magnesium ions and in a nuclear extract from tomato plants", *Nucleic Acids Research*, 1992, Vol. 20, No. 24 σελ. 6681 - 6686
65. Pagano, Clingman, Ryder, 2010, "Quantitative approaches to monitor protein-nucleic acid interactions using fluorescent probes", *RNA* 2011 Jan;17(1): σελ. 14-20
66. Palanivelu, Brass, Edlund, Preuss, Hughes, 2003, "Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by POP2, an Arabidopsis Gene that Controls GABA Levels", *Cell*, Vol. 114, σελ. 47–59
67. Papaefthimiou, Hamilton, Denti, Baulcombe, Tsagris, Tabler, 2001, "Replicating Potato tuber Spindle Viroid is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing" *Nucleic acids research*, vol29, σελ. 2395-2400
68. Parisi, Lepoivre, Jijakli, 2011, "Plant-RNA viroid relationship: a complex host pathogen interaction" *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010 14(3), σελ. 461-470
69. Podstolski, Gora-Sochacka, Zagorski, 2005, "Co-inoculation with two non-infectious cDNA copies of PSTVd leads to the appearance of novel fully infectious variants", *Acta Biochemica Polonica*, vol. 52
70. Raza Naqvi, Islam, Choudhury, Mohd, Haq 2009, "The fascinating world of RNA interference", *Int. J. Biol. Sci.* 2009, 5 σελ. 97-117
71. Roumpelaki-Aggelaki, Galatis, Ganotakis, Gani-spyropoulou, Karampourniotis, Kotzampasis, Konstantinidou, Manetas, 2003, *Φυσιολογία Φυτών, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης*
72. Ruiz-Ferrer & Voinet, 2009, "Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses", *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009. 60: σελ. 485–510
73. Saegesser, Martinez, Tsagris, Tabler, 1997, "Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library", *Nucleic Acid Research* Vol. 25, No. 19 σελ. 3816–3822
74. Sambrook & Russel, 2001, *Molecular Cloning*, Γ' έκδοση, Cold Spring Harbor Laboratory Press
75. Schoelz, Harries, Nelson, 2011, "Intracellular Transport of Plant Viruses: Finding the Door out of the Cell" *Molecular Plant* Sept. 2011, σελ. 1–19

- 76.. Sentil-Kumar, Mysore, 2011, Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato" *Plant Biotechnology Journal* (2011), σελ. 1–10
77. Shikanai, Okuda, 2011, "In Vitro RNA-Binding Assay for Studying Trans-Factors for RNA Editing in Chloroplasts", *Methods Mol Biol.* 2011;774: σελ. 199-208
78. Sikora, Greco-Stewart, Miron, Pelchat, 2010, "The hepatitis delta virus RNA genome interacts with eEF1A1, p54nrb, hnRNP-L, GAPDH and ASF/SF2", *Virology* 390 (2009) σελ. 71–78
79. Simon & Gehrke, 2009, "RNA CONFORMATIONAL CHANGES IN THE LIFE CYCLES OF RNA VIRUSES, VIROIDS, AND VIRUS-ASSOCIATED RNAS", *Biochim Biophys Acta.* 2009 ; 1789 σελ.. 9-10
80. Simon & Meyers, 2010, "Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants", *Current opinion in plant biology* 2011 Apr. 14(2): σελ. 148-55
81. Smith BJ, 1984, "Quantification of Proteins by Staining in Polyacrylamide Gels" *Methods Mol Biol.* 1984;1: σελ. 119-25
82. Sponer & Lankas, 2006, "Computational studies of RNA and DNA"
83. Stead & McDowall, 2007, "Two-dimensional gel electrophoresis for identifying proteins that bind DNA or RNA", *Nature Protocols*, Vol.2, No.8
84. Steger, Tabler, Brueggemann, Coplan, Klotz, Saenger, Riesner, 1986, "Structure of viroid replicative intermediates: physico-chemical studies on SP6 transcripts of cloned oligomeric potato spindle tuber viroid", *Nucleic Acids Research*, Volume 14 Number 24, σελ. 9613-30.
85. Stoltenburg, Reineman, Strehlitz, 2007, "SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands", *Biomolecular Engineering* 24 (2007) σελ. 381–403
86. Stonebloom, Burch-Smith, Kim, Meinke, Mindrinis, Zambryski, 2009, "Loss of the plant DEAD-box protein ISE1 leads to defective mitochondria and increased cell-to-cell transport via plasmodesmata", *PNAS* October 6, 2009 vol. 106 no. 40 σελ. 17229–17234
87. Su, 1987, "A refined method for silver staining of nucleic acids fixed on nitrocellulose" *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 163, σελ.535-536
88. Sulieman, 2001, "Does GABA increase the efficiency of symbiotic N₂ fixation in legumes?", *Plant Signaling & Behavior* 6:1, σελ. 32-36
89. Sun, Choi, Nuss, 2009, "A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination", *PNAS* October 20, 2009 vol. 106 no. 42 σελ. 17927–17932

90. Tabler & Tsagris, 2004, "Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents", *TRENDS in Plant Science* Vol.9 No.7
91. Tabler, Saenger, 1985, "Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with the SP6 transcription system", *The EMBO Journal* vol.4 no.9 σελ.2191-2199
92. Takeda, Petrov, Leontis, Ding, 2011, "A Three-Dimensional RNA Motif in Potato spindle tuber viroid Mediates Trafficking from Palisade Mesophyll to Spongy Mesophyll in *Nicotiana benthamiana*", *The Plant Cell*
93. Taliaknsy, Brown, Rajamaki, Valkonen, Kalinina, 2010, "Involvement of the Plant Nucleolus in Virus and Viroid Infections: Parallels with Animal Pathosystems"
94. Taylor & Pelchat, "Origin of hepatitis δ virus", *Future Microbiol.* 2010 March ; 5: σελ. 393–402
95. Tsagris, Martinez de Alba, Gozmanova, Kalantidis, 2008, "Viroids", *Cellular Microbiology* 2008, Nov. 10(11), σελ. 2168–2179
96. Tsagris, Tabler, Saenger, 1991, "Ribonuclease Ti generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation", *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 7
97. Vachev, Ivanova, Minkov, Tsagris, Gozmanova, 2010, "Trafficking of the Potato spindle tuber viroid between tomato and *Orobanche ramosa*" *Virology* 399 (2010) σελ. 187–193
98. Vidalakis, Pagliaccia, Bash, Afunian, Semancik, 2011, "Citrus dwarfing viroid: effects on tree size and scion performance specific to *Poncirus trifoliata* rootstock for high-density planting", *Ann Appl Biol* 158 (2011) σελ. 204–217
99. Vidalakis, Pagliaccia, Bash, Semancik, 2010, "Effects of mixtures of citrus viroids as transmissible small nuclear RNA on tree dwarfing and commercial scion performance on Carrizo citrange rootstock", *Ann Appl Biol* 157 (2010) σελ. 415–423
100. Wallert and Provost Lab, "Protocol for Ponceau S Staining"
101. Wang & Ding, 2009, "Viroids: Small Probes for Exploring the Vast Universe of RNA Trafficking in Plants", *Journal of Integrative Plant Biology* 2010, 52 (1): σελ.28–39
102. Wang & Nagy, 2008, "Tomato bushy stunt virus Co-opts the RNA-Binding Function of a Host Metabolic Enzyme for Viral Genomic RNA Synthesis", *Cell Host & Microbe* 3, σελ.178–187
103. Wang, Bian Wu, Liu, Smith, Isenegger, Wu, Masuta, Vance, Watson, Rezaian, Dennis, Waterhouse, 2004, "On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites", *PNAS* March 2, 2004 vol. 101 no. 9 σελ 3275–3280
104. Wassenegger & Krzcal, 2006, "Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases" *TRENDS in Plant Science* Vol.11 No.3, σελ. 142-151
105. Westermeier, Marchmont, "Blue Native Gel Electrophoresis – a valuable tool in studying membrane protein complexes" *GE Helathcare*

106. Wiesyk, Candresse, Zagorski, Gora-Sochacka, 2010, "Use of random-mutagenized genomic cDNA banks of Potato spindle tuber viroid to screen for viable versions of the viroid genome" *J. Gen. Virol.* 2011 Feb;92(Pt 2):σελ. 457-66
107. Yang, Wang, Gao, Zhu, Guo, 2010, "Isolation of a novel RNA-dependent RNA polymerase 6 from *Nicotiana glutinosa*, NgRDR6, and analysis of its response to biotic and abiotic stresses". *Molecular Biology Report*
108. Youngson, Chong, Whitelaw, 2010, "Gene silencing is an ancient means of producing multiple phenotypes from the same genotype", *Bioessays* 2011 Feb;33(2):σελ. 95-9
109. Zhong & Ding, 2008, "Distinct RNA motifs mediate systemic RNA trafficking", *Plant Signaling & Behavior* 3:1, σελ. 58-59
110. Zuest, Barragan, Habjan, Maier, Neuman, Ziebuhr, Baker, Barchet, Diamond, Siddell, Ludewig, Tiel, 2011, "Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5", *nature immunology* VOLUME 12 NUMBER 2

7. Παράρτημα

1. Η αλληλουχία του γονιδίου της Virp2

1 GTAGGTCGWC GGTATCGATT AAGCATACAA GGMATGAGCC AAGACTAATG
51 GAATAAATGA GAGACATGAA TATAGTTGGC ACCATATACA TGMGGCATGA
101 GGTGATTGAT ATGGGRCCTT TTGTTATAGA TAAAGCGGAG AGGTTCTTAT
151 GTCTATGACG TAAATGGCAA AAAGTACCTT GATTCTATAT CTGGTTTATG
201 GTGCTCAGTA TTAGGGGGGA GTGAGCCTCG TCTTATTGAA GCTGCAAATA
251 AACAACTCAA TAAATTGGCA TTTTACCACT CATTTTGGAA TCGTACCACA
301 ATKTCTTTHT TWTDDGADK CTKGCAAAGG AGCTCATAAA TATGTTTACT
351 GCAAATAAGA TGGGAAAAGT TTTTTTCACA AGTAGTGGAT CAGAAGCTAA
401 TGACACTCAG GTGRAAGTTG GTGTAGGTAT TACAACAATG YCATTGGGAG
451 GACAAAACAA AAAGKRAWTT TTTTCTCGA AAWAATGCAT ACCATGGCTC
501 CACTTATATG RCTGCCGGTC TCTCCGGGCT TMCATCAACA TACAATCTAA
551 AATTTGATTT ACCACTHCA ATATATT

2. Το χρωματόγραμμα από την αλληλούχιση του ενθέματος που κλωνοποιήθηκε σε pBluescript SK

